WWW.PHARMJOURNAL.RU

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

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

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ
ВАК Scopus®

ГРУППА КОМПАНИЙ Лабконцепт 100 лет ГОСМЕТР LABINVENT

ОБНОВЛЕНИЯ 2024 – 2025 ВЭЖХ LicArt 62

- Термостат увеличенного объема с возможностью установки переключающих кранов
- Амперометрический детектор и диодно-матричный детектор с термостатируемой ячейкой и оптикой и с улучшенной чувствительностью
- Функция пробоподготовки в автодозаторе
- Держатель бутылей с весовым модулем контроля расхода растворителей
- Решение для полупрепаративной хроматографии

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

INFO@PHARMJOURNAL.RU

Том 14, № 1. 2025
Volume 14, No. 1. 2025

ЦФА | центр фармацевтической аналитики

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

Посетить сайт:

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?

ЛИДЕР ОТРАСЛИ 2023

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

WWW.PHARMJOURNAL.RU

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

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2025. Том 14, № 1

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2025. Volume 14, No. 1

Цели и задачи журнала

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

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

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

Третий раздел описывает аналитические методики контроля качества.

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

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

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

Мустафин Р. И. – 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 Лулумбы», Москва, Россия

Ваизова О. Е. – доцент, д. м. н., профессор кафедры фармакологии ФБГОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск, Россия

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

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

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

Емшанова С. В. – д. фарм. н., АО «Бинергия»; руководитель отдела разработки, профессор кафедры промышленной фармации НИЯУ МИФИ, Москва, Россия

Зарубина И. В. – профессор, д. биол. н., старший преподаватель, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Министерства обороны Российской Федерации, Москве, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

Медведев Ю. В. – к. фарм. н., доц. кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

ISSN 2305-2066 (Print)	
ISSN 2658-5049 (Online)	
Учредители печатной версии	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 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, 2025
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License (cc) BY 4.0
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-Khfajy – Dr. of Sci. (Pharm.), Assistant professor, Department of Pharmacology and toxicology, College of Pharmacy. Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq

ISSN 2305-2066 (Print)	
ISSN 2658-5049 (Online)	
Print version founders	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 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, Moscowskiy 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, 2025
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 26

Поиск и разработка новых лекарственных средств

Определение таутомерного состава новой потенциально активной фармацевтической субстанции
Т. В. Сотникова, О. Ю. Стрелова, Э. П. Санаева, Д. А. Колесник, И. П. Яковлев 31

Цитостатический эффект извлечений из борщевика Сосновского
Р. И. Лукашов, Н. С. Гурина, В. А. Терлецкая, А. В. Лавровский, Т. М. Дорошенко, А. С. Портянко, А. В. Клемпер, М. Н. Повыдыш 39

Разработка продуцентов терапевтических пептидов на основе *Esherichia coli* BL21 и технологии их культивирования
З. Р. Хасаншина, И. А. Корнаков, Е. А. Буслаева, А. В. Казакова, С. А. Ищук, В. И. Шмурак, В. Б. Сапарова, В. Ф. Латыпов, Р. В. Драй 54

Эффективность и потенциальные возможности применения витаминов и микроэлементов в форме оральных спреев (обзор)
А. Г. Поливанова 67

Разработка состава и технологии суспензии для приема внутрь на основе твердой дисперсии албендазола
Ю. И. Тихомирова, Н. О. Карабинцева, В. И. Евсеенко, Е. С. Метелева, А. В. Душкин, М. В. Зеликман 82

Оптимизация метода рефолдинга Fc-слитого белка, полученного в бактериальной системе экспрессии
П. С. Астрелина, С. А. Ищук, А. В. Кабанова, Р. В. Драй 92

Противоопухолевая активность синтетических производных нафтохинона (обзор)
Е. Л. Головина, В. А. Серебрякова, О. Е. Ваизова 103

Фармацевтическая технология

Фармацевтическая разработка и практические подходы к синтезу радиофармацевтического лекарственного препарата на основе тропантиола ([^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1) для диагностики нейродегенеративных заболеваний (обзор)
Е. П. Павленко, А. О. Малышева, А. А. Ларенков 112

Оценка влияния поливинилпирролидон-винилацетата на свойства кверцетина в составе бинарной твердой дисперсии, полученной методом экструзии горячего расплава
А. А. Данилова, К. А. Гусев, Н. О. Архипова, Л. Г. Данилов, Е. В. Вишняков, Д. Н. Маймистов, Е. В. Флисюк 127

Технологические подходы к повышению биодоступности труднорастворимой субстанции кандесартана цилексетила в мини-таблетках
К. М. Церковная, Е. С. Сурбеева, К. А. Гусев, Е. В. Вишняков, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич 138

Разработка твердой дисперсионной системы сухого экстракта расторопши методом удаления растворителя
Б. А. Перес, И. Е. Каухова, И. И. Тернинко, О. Н. Абросимова, Е. В. Вишняков, Н. С. Пивоварова 151

Фармацевтическая разработка спрея сангвиритрина для лечения воспалительных заболеваний ротовой полости
М. Н. Анурова, Я. А. Дорохина, А. С. Гуленков, Н. Б. Демина, Л. А. Король, П. Г. Мизина 160

Исследование влияния молекулярной массы гиалуроновой кислоты на кинетику высвобождения мангиферина из полимерной матрицы
П. П. Снетков, Р. О. Шайкенов, В. И. Климшина, Ю. Э. Генералова, С. Н. Морозкина 171

Разработка методики определения паропроницаемости для пленкообразующих аэродисперсных систем
М. М. Шумкова, М. В. Помыткина, А. А. Ананян, Г. Пуя, М. М. Агабалян, Е. О. Бахрушина 181

Цеолиты и цеолитоподобные имидазольные каркасы в фармации (обзор)
Е. О. Бахрушина, Н. О. Белявский, В. Н. Кузина, А. И. Ходенок, Н. Б. Демина, Г. В. Раменская 193

Разработка и исследование гранул методом реактивной термоэкструзии на основе интерполимерных сочетаний сополимеров Eudragit® для доставки индометацина
Ш. Ф. Насибуллин, Т. Ван Дуонг, И. Николакакис, К. Какриманис, Г. Ван Ден Мутер, Р. И. Мустафин 223

Методы анализа лекарственных средств

Оценка подлинности цветков каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) методом растровой электронной микроскопии
А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева 245

Особенности проведения теста «Растворение» для суппозиториев вагинальных, содержащих в своем составе натамицин
А. В. Мелешко, А. М. Волкова, В. С. Тюкова, А. В. Панов, С. А. Кедик 254

Сравнительное микробиологическое и фитохимическое исследование извлечений из листьев сортовых форм рода *Mentha* L.
М. А. Казакова, В. А. Куркин, В. М. Рыжов, А. В. Лямин, А. В. Козлов 265

Применение метода капиллярного электрофореза в анализе водорастворимых витаминов представителей рода *Rubus* L.
М. Б. Ильина, Е. В. Сергунова 274

Доклинические и клинические исследования

Оценка эффективности и безопасности цитофлавина в качестве нейропротектора на основе систематического обзора
Е. К. Красова, И. А. Титович, К. О. Сидоров, С. В. Оковитый 285

Экспериментальный неалкогольный стеатогепатит у мышей ассоциирован с поведенческими, когнитивными и периферическими нейрональными нарушениями
В. А. Приходько, Д. А. Орляхина, В. Д. Петрова, В. Е. Карев, Д. Ю. Ивкин, С. М. Напалкова, С. В. Оковитый 319

Применение метода электростимуляционного утомления для выявления миотропных эффектов препаратов метаболического действия у мышей *db*/*db*
В. А. Приходько, Т. М. Матузок, А. Ю. Гришина, В. Е. Кованcков, Ю. И. Сысоев, М. В. Титова, Е. В. Попова, А. М. Носов, Д. Ю. Ивкин, С. В. Оковитый 332

Сравнительная эффективность фармакотерапии хронической сердечной недостаточности в эксперименте
Д. Ю. Ивкин, А. Б. Зеленцова, М. В. Краснова, А. А. Карпов, В. В. Пажельцев, С. М. Напалкова, И. И. Тернинко, И. А. Титович, С. В. Оковитый 349

Коррекция депрессивноподобного состояния у крыс, вызванного социальным стрессом, с помощью нового производного тиетан-1,1-диоксида
Г. Г. Гайсина, И. Л. Никитина, Е. Э. Клен, Р. А. Карагузин, А. В. Самородов 358

Сравнение влияния медного хлорофиллина, рибоксина, индралина и совместного применения глутатиона и аскорбиновой кислоты на выживаемость мышей при фракционированном облучении рентгеновским излучением
Л. А. Ромодин, А. А. Московский, О. В. Никитенко, Т. М. Бычкова, Е. Д. Родионова 365

Исправления 375

CONTENTS

Introduction 10

Events 26

Research and development of new drug products

Determination of the structure of a new potentially active pharmaceutical substance
Tatiana V. Sotnikova, Olga Yu. Strelova, Ella P. Sanaeva, Denis A. Kolesnik, Igor P. Yakovlev 31

Cytostatic effect of extracts from *Heracleum Sosnowskyi*
Raman I. Lukashou, Natalia S. Gurina, Viktoryia A. Tsiarletskaya, Aliaksandr V. Laurouski, Tatiana M. Doroshenko, Anna S. Portyanko Alexey V. Klemper, Maria N. Povydysh 39

Development of therapeutic peptide producers based on *Escherichia coli* BL21 and their cultivation technology
Zukhra R. Khasanshina, Igor A. Kornakov, Evgeniya A. Buslaeva, Angelina V. Kazakova, Sergey A. Ishchuk, Vladimir I. Shmurak, Valeriya B. Saparova, Vitaly F. Latypov, Roman V. Drai 54

Efficacy and potentiality of vitamins and micronutrients oral sprays supplementation (review)
Anna G. Polivanova 67

Development of the composition and technology of suspension for oral administration based on a solid dispersion of albendazole
Yulia I. Tikhomirova, Natalia O. Karabintseva, Veronica I. Evseenko, Elizaveta S. Meteleva, Alexander V. Dushkin, Maxim V. Zelikman 82

Optimization of the Fc-fusion protein refolding method produced from the bacterial expression system
Polina S. Astrelina, Sergey A. Ishchuk, Alyona V. Kabanova, Roman V. Drai 92

Antitumor activity of synthetic naphthoquinone derivatives (review)
Eugenija L. Golovina, Valentina A. Serebryakova, Olga E. Vaizova 103

Pharmaceutical Technology

Pharmaceutical development and practical approach to synthesis of tropantiol radiopharmaceutical ([^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1) for diagnostic of neurodegenerative diseases (review)
Ekaterina P. Pavlenko, Anna O. Malysheva, Anton A. Larenkov 112

Assessment of polyvinylpyrrolidone vinyl acetate effect on quercetin properties in binary solid dispersion prepared by hot melt extrussion
Alexandra A. Danilova, Konstantin A. Gusev, Nadezhda O. Arkhipova, Lavrentii G. Danilov, Evgeniy V. Vishnyakov, Denis N. Maimistov, Elena V. Flisyuk 127

Technological approaches to improve the bioavailability of the poor soluble substance Candesartan Cilexetil in mini-tablets
Ksenia M. Tserkovnaya, Elizaveta S. Surbeeva, Konstantin A. Gusev, Evgeniy V. Vishnyakov, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narkevich 138

Development of solid dispersion system from milk thistle dry extract by solvent method
Bajron A. Perez, Irina E. Kauhova, Inna I. Terninko, Olesya N. Abrosimova, Evgeniy V. Vishnyakov, Nadezhda S. Pivovarova 151

Pharmaceutical development of sangviritrin spray for the treatment of inflammatory diseases of the oral cavity
Maria N. Anurova, Yana A. Dorokhina, Alexander S. Gulenkov, Natalia B. Demina, Lyudmila A. Korol, Praskovya G. Mizina 160

The influence of the molecular weight of hyaluronic acid on the mangiferin release kinetics from the polymer matrix
Petr P. Snetkov, Roman O. Shaikenov, Vladislava I. Klimshina, Yuliya E. Generalova, Svetlana N. Morozkina 171

Development of water vapor permeability determination methodology for spray film-forming systems
Marina M. Shumkova, Maria V. Pomytkina, Arsen A. Ananian, Ghazaleh Pouya, Margarita M. Agabalyan, Elena O. Bakhrushina 181

Zeolites and zeolite imidazole frameworks in pharmacy (review)
Elena O. Bakhrushina, Nikita O. Belyavsky, Vera N. Kuzina, Angelina I. Khodenok, Natalia B. Demina, Galina V. Ramenskaya 193

Development and study of reactive hot-melt extruded granules based on interpolymer combinations of Eudragit® copolymers for indomethacin delivery
Shamil F. Nasibullin, Tu Van Duong, Ioannis Nikolakakis, Kyriakos Kachrimanis, Guy Van den Mooter, Rouslan I. Moustafine 223

Analytical Methods

Assessment of the authenticity of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) flowers by scanning electron microscopy
Alexander D. Dunilin, Olga V. Trineeva 245

Development of the "Dissolution" test method for vaginal suppositories Pimafucin®
Anastasiya V. Meleshko, Aleksandra M. Volkova, Viktoriya S. Tyukova, Aleksey V. Panov, Stanislav A. Kedik 254

Comparative microbiological and phytochemical study of extracts from leaves of varietal forms of the genus *Mentha* L.
Maria A. Kazakova, Vladimir A. Kurkin, Vitaly M. Ryzhov, Artem V. Lyamin, Andrey V. Kozlov 265

Application of the capillary electrophoresis method in the analysis of water-soluble vitamins of representatives of the genus *Rubus* L.
Margarita B. Ilina, Ekaterina V. Sergunova 274

Preclinical and clinical study

Evaluation of the efficacy and safety of cytoflavin as a neuroprotector based on a systematic review
Elena K. Krasova, Irina A. Titovich, Kirill O. Sidorov, Sergey V. Okovityi 285

Experimental murine non-alcoholic steatohepatitis is associated with behavioural, cognitive, and peripheral neuronal dysfunction
Veronika A. Prikhodko, Darya A. Orlyakhina, Veronika D. Petrova, Vadim E. Karev, Dmitry Yu. Ivkin, Svetlana M. Napalkova, Sergey V. Okovityi 319

Use of an electrical stimulation-induced fatigue protocol to evaluate the myotropic effects of metabolic-active agents in *db*/*db* mice
Veronika A. Prikhodko, Tatyana M. Matuzok, Anna Yu. Grishina, Vladislav E. Kovanskov, Yuriy I. Sysoev, Maria V. Titova, Elena V. Popova, Aleksandr M. Nosov, Dmitry Yu. Ivkin, Sergey V. Okovityi 332

Comparative efficacy study of experimental chronic heart failure
Dmitry Yu. Ivkin, Anna B. Zelentsova, Marina V. Krasnova, Andrey A. Karpov, Vasiliy V. Pazheltsev, Svetlana M. Napalkova, Inna I. Terninko, Irina A. Titovich, Sergey V. Okovitiy 349

Correction of depressive-like state in rats induced by social stress using a new 3-substituted thietane-1,1-dioxide derivative
Gulnara G. Gaisina, Irina L. Nikitina, Elena E. Klen, Rail A. Karaguzin, Aleksandr V. Samorodov 358

Comparison of the effects of copper chlorophyllin, riboxin, indralin and the combined use of glutathione and ascorbic acid on the survival of mice during fractionated X-ray irradiation
Leonid A. Romodin, Alexander A. Moskovskij, Olga V. Nikitenko, Taisia M. Bychkova, Elizaveta D. Rodionova 365

Erratums 375

Редакционная статья / Editorial article

XVIII конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Двухдневный XVIII конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» прошел 26 и 27 февраля 2025 года в технопарке «Калибр» в Москве.

The 18th Congress "Drug development and registration"

The two-day 18th Congress "Drug Development and Registration" was held on February 26–27, 2025 at the Caliber technopark in Moscow.

Организаторами конгресса выступают Центр Фармацевтической Аналитики, журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств», журнал «Гербариум» и Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет.

Мероприятие посетили порядка 200 слушателей, с нами были более 60 докладчиков, нас поддержали 20+ партнеров.

Докладчики конгресса – топ-менеджеры крупных фармацевтических компаний, представители государственных органов власти, научных организаций, а также отраслевых ассоциаций и инвестиционных фондов.

Открывала мероприятие **Наталья Вячеславовна Кульджанова**, директор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», руководитель пресс-службы Центра Фармацевтической Аналитики. «*Мы, как организаторы мероприятия, уделяем особое внимание формированию деловой программы конгресса, следим за трендами отрасли, подбираем интересных докладчиков, чтобы Вы, наши слушатели, смогли получить самую актуальную на сегодняшний день информацию. Сегодняшний конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» является уже 18-м по счету, и совсем скоро мы с Вами встретимся на юбилейном 20-м конгрессе*», – отметила Наталья Вячеславовна.

С приветственной речью также выступил генеральный директор Центра Фармацевтической Аналитики, главный редактор журналов «Разработка и регистрация лекарственных средств» и «Гербариум» **Игорь Евгеньевич Шохин**. Игорь Евгеньевич пожелал слушателям продуктивного конгресса, интересных профессиональных знакомств и новых знаний.

Игорь Евгеньевич Шохин

«*Мы рады, что наши мероприятия становятся все более узнаваемыми в отрасли, с каждым годом растет количество слушателей, доклады становятся все интереснее, а дискуссии насыщеннее. Мы приложим максимум усилий, чтобы сохранить этот тренд и в следующем году*», – подчеркнул Игорь Евгеньевич.

На открытии 18-го конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» с приветственным словом выступил также ректор Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета **Игорь Анатольевич Наркевич**. Игорь Анатольевич отметил, что знания и опыт, накопленные участниками, станут основой для плодотворных дискуссий и новых идей.

В качестве почетного гостя конгресса выступил директор ФБУ «ГИЛС и НП» **Шестаков Владислав Николаевич**. Владислав Николаевич выразил уверенность в том, что конгресс будет плодотворным и эффективным, а совместная работа науки, бизнеса и государственных структур станет прочным фундаментом для дальнейшего роста и процветания отечественной фармации. «*Мир сегодня меняется быстрее, чем когда-либо, и фармацевтическая индустрия должна соответствовать этим изменениям. Стандарты GMP, являющиеся правилом для обеспечения качества и безопасности лекарственных средств, теперь дополняются инновационными подходами*», – отметил в своей приветственной речи Владислав Николаевич.

Деловая программа этого года отличалась высокой насыщенностью и разнообразием. В течение двух дней участники конгресса обсудили современные тенденции и перспективы клинических, доклинических и «околоклинических» исследований, регистрацию лекарственных средств и регуляторные вопросы действующего законодательства ЕАЭС, инновационные подходы к моделированию при разработке лекарственных средств. Кроме того, поговорили про разработку и регистрацию биотехнологических лекарственных средств. В фокусе внимания были секции по высокотехнологичным препаратам, особенности их производства и контроля качества и вопросы, связанные с исследованием лекарственного растительного сырья, а также разработкой, регистрацией, производством и изготовлением РФЛП. Отдельная дискуссия была посвящена технологическому суверенитету, трансферу технологий и мерам поддержки в здравоохранении. Вместе мы ответили на вопрос, является ли СМК лишней тратой ресурсов компании или инвестицией в будущее. Впервые в рамках конгресса проводился мастер-класс по ТСКР с участием представителей экспертной панели по биофармацевтическим исследованиям при ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, где был представлен чек-лист по отчетам ТСКР. Наравне с ведущими экспертами отрасли в рамках конгресса с докладами о своих разработках впервые выступили молодые ученые и специалисты.

Открывала мероприятие флагманская секция конгресса – «*Клинические, доклинические и «околоклинические» исследования: современные тенденции и перспективы*». Модераторами секции выступили **Комаров Тимофей Николаевич**, д. фарм. н., директор исследовательского центра ООО «ЦФА» и **Макаренко Игорь Евгеньевич**, к. м. н., руководитель медицинского департамента «ГЕРОФАРМ».

В рамках секции мы обсудили актуальные вопросы проведения клинических, доклинических исследований, их аналитического сопровождения; регуляторные аспекты и изменения требований к проведе-

Владислав Николаевич Шестаков

нию исследований, а также тренды развития отрасли; мнением о проблеме поделились ведущие представители клинических и биоаналитических центров, регуляторных органов, представители ведущих производителей и разработчиков лекарственных средств.

В первой части пленарной сессии **Макаренко Игорь Евгеньевич** представил детальный обзор эволюции клинических исследований в России. В ходе беседы с **Каревой Марией Анатольевной**, директором Департамента клинических исследований АНО «МЦИТ3», мы обсудили поддержку, оказываемую клиническим исследованиям лекарственных препаратов в Москве. **Фёдорова Мария Валерьевна**, генеральный директор ООО «Глобал Клиникал Десижнс», рассказала о возможностях оптимизации процесса клинических исследований. **Дегграве Татьяна Витальевна**, главный аналитик отдела анализа и управления проектами по лекарственным препаратам Центра трансфера медицинских технологий ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ, выступила с докладом «Особенности дизайнов клинических исследований инновационных препаратов». **Багаева Наталья Сергеевна**, руководитель отдела биостатистики ООО «ЦФА», рассказала о распространенных ошибках, возникающих при статистическом анализе данных, и способах их предотвращения. **Комаров Тимофей Николаевич**, д. фарм. н., директор исследовательского центра ООО «ЦФА» поделился обзором 10-летнего опыта ООО «ЦФА» в своем докладе «Биоаналитические исследования: откуда мы идем и куда мы пришли».

Впервые на международном конгрессе прошла молодежная лига. Молодые ученые продемонстрировали свою увлеченность научными идеями, которые они воплощают в жизнь, используя самые современные методы. Первое место занял Пыжов Виктор Сергеевич, аспирант кафедры фармацевтической технологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова. Он получил главный приз — право опубликовать свои результаты в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств». Второе место – Куков Дмитрий Владимирович, РязГМУ им. И. П. Павлова. Третье место – Сурбеева Елизавета Сергеевна, ИЛ ЦККЛС СПХФУ. Приз зрительских симпатий достался аспиранту кафедры химии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Панкову Денису Игоревичу. Денис Игоревич с благодарностью принял предложение пройти стажировку в ООО «Центр Фармацевтической Аналитики».

26 февраля в рамках конгресса впервые прошел мастер-класс «*ТСКР в разработке и регистрации ЛС: самое новое, что есть на сегодня*». Мастер-класс был разделен на две части, в ходе которых опытом поделились **Шохин Игорь Евгеньевич**, д. фарм. н., генеральный директор ООО «ЦФА» и **Фишер Елизавета Николаевна,** к. фарм. н., генеральный директор ООО «ЛФИ». **Еременко Наталья Николаевна,** заместитель начальника управления экспертизы № 1

Наталья Николаевна Еременко

по эффективности и безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля ГЛС ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, поделилась опытом работы экспертной панели по биофармацевтическим исследованиям ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. На мастер-классе по ТСКР были представлены лучшие практики выполнения данного исследования на всех этапах жизненного цикла лекарственных средств. Участники смогли ознакомиться с различными дизайнами исследований, методами выполнения работ и способами обработки полученных результатов. Также впервые был представлен чек-лист по отчетам ТСКР, подготовленный в рамках экспертной панели по биофармацевтическим исследованиям при ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

27 февраля в рамках международного конгресса прошла открытая дискуссия «ВТЛП: особенности производства, регистрации и контроля качества». В дискуссии приняли участие: **Барановский Денис Станиславович** (модератор дискуссии), руководитель Научно-производственного комплекса биотехнологий ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России, **Румянцев Александр Григорьевич**, президент Центра ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Депутат Государственной Думы РФ, Комитет Государственной Думы по охране здоровья, **Филатова Ирина Анатольевна**, депутат Государственной Думы РФ, Руководитель Экспертного сове-

та по защите конкуренции в сфере фармацевтической деятельности, **Грошева Гелена Витальевна**, начальник отдела лицензирования и инспектирования производства лекарственных средств Департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России, **Шегай Петр Викторович**, заместитель генерального директора по науке ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России, **Ларин Сергей Сергеевич**, заместитель директора Института молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, **Клабуков Илья Дмитриевич**, главный технолог Научно-производственного комплекса биотехнологий ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России, **Таубэ Александра Альбертовна**, доцент кафедры экономики и управления ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, генеральный директор ООО «Фармальянс», доцент кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств Сеченовского университета.

В ходе открытой дискуссии была подтверждена необходимость перехода к адаптивному регулированию, интеграции принципов регуляторной науки и внедрения госпитальных исключений для высокотехнологичных препаратов как механизма управляемого доступа пациентов к передовой терапии. Создание рабочей группы при Государственной Думе РФ во взаимодействии с Советом при Президиуме РАН по эволюционной медицине и медицинскому наследию станет важным шагом в разработке научно обоснованных подходов к совершенствованию регулирования. По итогам дискуссии была принята резолюция. Полный текст резолюции Вы сможете прочесть в выпуске журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» (Том 14, № 1 (2025), стр. 14–15).

В секции «*Актуальные вопросы разработки, регистрации, производства и изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов*» представители науки, бизнеса и регуляторных органов обсудили вопросы создания и вывода на рынок инновационных РФЛП. Были рассмотрены ключевые особенности регулирования обращения РФЛП и регуляторные пути их внедрения в медицинскую практику. Спикеры поделились своим опытом в формировании регистрационного досье на РФЛП, а также в проведении доклинических и клинических исследований этих препаратов, поговорили о практике изготовления РФЛП в производственных аптеках. Модераторами секции выступили **Савченко Алла Юрьевна,** зав. кафедрой промышленной фармации НИЯУ МИФИ, сотрудник лаборатории экспериментальной ядерной медицины МРНЦ им. А. Ф. Цыба-филиала – ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, исполнительный директор Ассоциации Калужский фармацевтический кластер и **Багаева Наталья Сергеевна**, руководитель отдела биостатистики ООО «ЦФА».

В рамках секции, посвященной исследованиям лекарственного растительного сырья, состоялась презентация нового научного журнала «Гербариум» с историей о первых шагах издания. Научно-практический рецензируемый журнал «Гербариум» объединяет исследователей и производителей в области фармакогнозии и фармацевтической ботаники, а также в сфере поиска, создания и применения лекарственных средств растительного и иного природного происхождения. Главным редактором журнала «Гербариум» выступает **Шохин Игорь Евгеньевич**.

Благодарим участников конгресса за интерес к нашему мероприятию, активное участие в дискуссиях и отличное настроение!

Партнерами XVIII конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» выступили: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, ЕЭК, «Лабконцепт», «ГЕРОФАРМ», «Статэндокс», «Фармацевтический вестник», CON-PHARM.RU, MEADIA MEDICA, «ОЛФАРМ», AptekaMos.ru, «Московские аптеки», «БелкиАнтитела», Bionika Media, ДИАЭМ, Global Clinical Decisions, «ФармМедПром», PCR.NEWS, NPJ, X7 Research, Sciencefiles, Университет «Сириус», «Фарма РФ», Учебный центр GxP, «Воды здоровья», «РЕАТОРГ», «Сайнтифик Комплайнс».

Редакционная статья / Editorial article

Резолюция открытой дискуссии «ВТЛП, особенности производства, регистрации, контроля качества» международного конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» Москва, 26–27 февраля 2025 г., Технопарк «Калибр»

В рамках международного конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» 27 февраля 2025 г. в Москве состоялась открытая дискуссия «ВТЛП, особенности производства, регистрации, контроля качества».

Resolution of the open discussion HTMP (high-technology medicinal product), features of production, registration, quality control of the international congress "Drug development and registration" Moscow, February 26–27, 2025, Technopark "Caliber"

Within the International Congress "Drug development & registration" was held an open discussion "HTMP, features of production, registration, quality control" in Moscow on February 27, 2025

В дискуссии приняли участие:

Барановский Денис Станиславович (модератор дискуссии)

Руководитель Научно-производственного комплекса биотехнологий ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России.

Румянцев Александр Григорьевич

Президент Центра ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Депутат Государственной Думы РФ, Комитет Государственной Думы по охране здоровья.

Филатова Ирина Анатольевна

Депутат Государственной Думы РФ, Руководитель Экспертного совета по защите конкуренции в сфере фармацевтической деятельности.

Грошева Гелена Витальевна

Начальник отдела лицензирования и инспектирования производства лекарственных средств Департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России.

Шегай Петр Викторович

Заместитель генерального директора по науке ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России.

Ларин Сергей Сергеевич
Заместитель директора Института молекулярной и экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.
Клабуков Илья Дмитриевич
Главный технолог Научно-производственного комплекса биотехнологий ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России.
Таубэ Александра Альбертовна
Доцент кафедры экономики и управления ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, генеральный директор ООО «Фармальянс», доцент кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств Сеченовского университета.

Правовое регулирование препаратов клеточной и генной терапии претерпело сложную эволюцию – от медицинских технологий до биомедицинских продуктов и высокотехнологичных лекарственных препаратов (ВТЛП). Участники дискуссии отмечают, что стремительное развитие этой сферы и появление персонифицированных решений требуют постоянного обновления нормативно-правовой базы для успешного перехода к персонализированной медицине и высокотехнологичному здравоохранению. Действующая система регулирования ВТЛП должна учитывать динамику отрасли и создавать предсказуемую, но гибкую среду, способствующую внедрению передовых технологий.

С целью адаптации научно обоснованного подхода к разработке правовых норм в сфере передовой терапии в России необходимо внедрение «регуляторной науки», отвечающей задачам адаптивного регулирования и обеспечивающей функционирование гибких механизмов правового сопровождения инноваций. Внедрение «регуляторной науки» также позволит создать экспертную систему прогнозирования рисков, что обеспечит более точную оценку рисков ВТЛП и ускорит их трансляцию в клиническую практику. Для эффективного внедрения механизмов адаптивного регулирования, совершенствования процедуры госпитальных исключений предлагается сформировать рабочую группу при Государственной Думе РФ, в состав которой войдут представители профильных министерств, Российской Академии Наук, ведущие эксперты в области биотехнологий и специалисты по правовому регулированию.

Рабочая группа будет функционировать при взаимодействии с профильным Советом при Президиуме РАН по эволюционной медицине и медицинскому наследию, что обеспечит формирование научной повестки «регуляторной науки» в развитии биотехнологий, научно-экспертную поддержку законодательных инициатив, их соответствие мировым стандартам и формирование прогнозируемого правового поля для биотехнологий в здравоохранении и инновационных лекарственных препаратов. Деятельность рабочей группы будет направлена на доработку механизмов госпитальных исключений, обеспечивающих возможность применения незарегистрированных ВТЛП, изготовленных по индивидуальному назначению с соблюдением требований надлежащей производственной практики (cGMP) и фармацевтической системы обеспечения качества. Это позволит гармонизировать российское регулирование с международной практикой и решениями ЕЭК, создать единую систему обращения передовых технологий и повысить инвестиционную привлекательность сектора, обеспечивая единство требований к производству препаратов и обеспечению качества. Участники дискуссии уверены, что госпитальные исключения способны создать эффективный путь к централизованной регистрации ВТЛП, основанный на постепенном накоплении клинических данных и их динамической оценке. Не менее важным направлением работы группы должно стать устранение правовых коллизий в вопросах принудительного лицензирования и расширения его применения в национальных интересах. Дальнейшее развитие системы защиты интеллектуальной собственности должно учитывать баланс между стимулированием инноваций и обеспечением доступа к передовым методам терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытая дискуссия «ВТЛП, особенности производства, регистрации, контроля качества» в рамках международного конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» подтвердила необходимость перехода к адаптивному регулированию, интеграции принципов регуляторной науки и внедрения госпитальных исключений для высокотехнологичных лекарственных препаратов как механизма управляемого доступа пациентов к препаратам передовой терапии. Формирование рабочей группы при Государственной Думе РФ, при взаимодействии с Советом при президиуме РАН по эволюционной медицине и медицинскому наследию, станет важным шагом в разработке научно-обоснованных подходов к совершенствованию существующего регулирования.

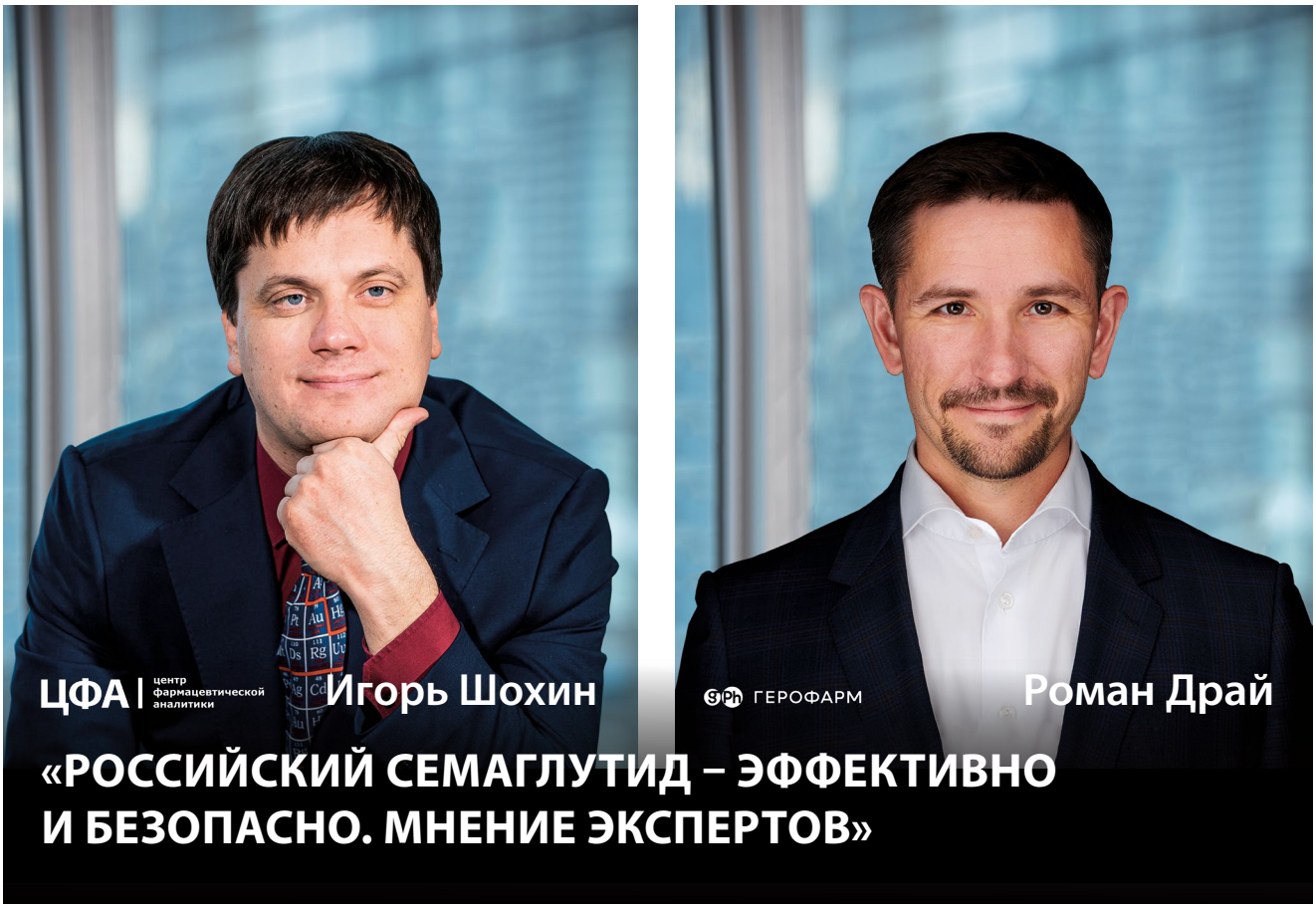
Редакционная статья / Editorial article

Интервью в рамках цикла «Мнение лидеров»

Представляем вашему вниманию новое интервью в рамках цикла «Мнение лидеров». Сегодняшними гостями стали директор департамента исследований и разработок компании «ГЕРОФАРМ» Драй Роман Васильевич и генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» Шохин Игорь Евгеньевич. В роли интервьюера выступила Кульджанова Наталья Вячеславовна, директор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств».

The 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 guests were the director of the research and development department of the GEROPHARM company, Roman V. Drai, and the general director of the LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", Igor E. Shokhin. The interviewer was Natalya V. Kuldzhanova, director of the scientific and production journal "Drug development and registration".



В последние годы российский фармацевтический рынок претерпел изменения: ушли западные компании, возросла активность отечественных производителей и активно развивается общий рынок ЕАЭС. Изменения коснулись и структуры клинических исследований: уменьшается число зарубежных компаний и растет количество исследований, организованных российскими спонсорами. В первой половине 2024 года российские спонсоры чаще всего исследовали дженерики (30,4 % от всех утвержденных протоколов). Например, препараты на основе семаглутида до недавнего времени были доступны только в европейских брендах, но в 2023 году их официальные поставки в Россию прекратились, что привело к появлению нелегальных схем ввоза. Граждане вынуждены были приобретать препарат через неофициальные сайты по завышенным ценам без гарантии качества и эффективности. В рамках обеспечения технологического суверенитета России отечественные компании начали разработку импортозамещающих препаратов на основе семаглутида.

В новом цикле интервью «Мнение Лидеров» мы обсудили, как проводятся исследования лекарственных препаратов и их роль в развитии фармацевтического бизнеса в нашей стране.

Наталья Кульджанова: ***Коллеги, в последнее время на рынке появляется все больше российских аналогов препаратов европейских брендов. Однако у потребителей возникают сомнения в безопасности этих аналогов. Мы хотим быть уверены, что уровень эффективности и безопасности российских препаратов не уступает европейским.***

Роман, первый вопрос я задам Вам. Расскажите, пожалуйста, как выглядит жизненный цикл лекарственного препарата, который выходит на российский рынок, на примере семаглутида.

Роман Драй: Добрый день! Благодарю Вас за приглашение и за интересные вопросы. Прежде всего, хотелось бы отметить, что жизненный цикл, разработка и регистрация всех лекарственных препаратов проходят практически одинаково, независимо от страны происхождения. Это связано с национальными законами, в частности, с ICH, которые действуют во всех странах мира – в США, Европе, России, Японии, Канаде и на Кубе. Мы также адаптировались к этим требованиям, и с 2016 года полностью соответствуем не только российскому законодательству и законодательству ЕАЭС, но и мировому.

Теперь поговорим о жизненном цикле ЛС. В 2023 году компания «ГЕРОФАРМ» вывела на рынок препарат «Семавик» – дженерик ушедшего «Оземпика». Жизненный цикл дженериков значительно проще, чем у оригинальных препаратов, поэтому нам удалось создать «Семавик» в сжатые сроки. Сначала мы должны были понять, зачем мы выводим этот препарат на рынок. Обычно это происходит, когда заканчиваются патенты на оригинальные препараты. Однако в данном случае они все еще действовали, но пациенты тем не менее оказались лишены выбора. Компания «Novo Nordisk» сообщила о прекращении поставок семаглутила и мы решили заместить этот препарат. Это был хороший пример того, как быстро можно отреагировать на необходимость импортозамещения.

Далее мы изучили «Оземпик». Мы знаем, что «Оземпик», или семаглутид, действующее вещество данного препарата, состоит из 31 аминокислоты. Наша задача была сделать наш препарат таким же, как и оригинальный. Мы не можем сделать его лучше или хуже, мы должны создать точную копию. После чего мы закупили несколько серий «Оземпика». Это был препарат приобретенный как на российском, так и европейском рынке. Мы провели сравнительные исследования, изучили концентрацию, молекулярную структуру и примеси. Затем установили целевой профиль качества для нашего препарата. Наши химики синтезировали абсолютно такой же препарат, и после этого мы создали готовую лекарственную форму. Далее мы провели исследование сопоставимости, закупив еще несколько серий «Оземпика», и сравнили наш препарат с оригинальным. Это был второй этап.

Третий этап – проведение клинических исследований. Мы написали протокол КИ, получили одобрение в Министерстве здравоохранения и стали исследовать фармакокинетические свойства нашего препарата (то есть его поступление в кровь) и они оказались абсолютно такие же, как у «Оземпика». Мы проводили сравнительные испытания на здоровых добровольцах. После этого все необходимые документы были направлены в Министерство здравоохранения. После одобрения Минздравом препарат получил регистрационное удостоверение и поступил в продажу.

Наталья Кульджанова: ***Роман, Вы упомянули о клинических исследованиях. Не могли бы Вы рассказать более подробно о том, как проходит этот процесс?***

Роман Драй: В данном случае мы проводили клиническое исследование биоэквивалентности. В нем приняли участие две группы здоровых добровольцев: одна группа получала инъекцию препарата «Оземпик», а другая – «Семавик». В течение недели у участников брали кровь в разное время: сначала – каждый час, затем – каждые 15 минут, а в итоге – раз в сутки. Обычно кровь берут в течение суток или максимум двух, но так как препарат действует в течение недели, мы решили проводить забор крови также в течение этого периода. Кровь центрифугировали, получали сыворотку, замораживали ее и отправляли в независимую лабораторию для измерения в ней концентрации препарата. Лаборатория работала вслепую: ее сотрудники не знали, какой именно препарат отправляют. Затем результаты исследования передавались биостатистикам, которые сравнивали концентрацию нашего препарата и оригинального. Оказалось, что концентрации совпали, что свидетельствует о биоэквивалентности.

Наталья Кульджанова: ***Большое спасибо, Роман. У меня сразу же возник вопрос к Игорю Шохину, генеральному директору ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», которая занималась исследованиями этого лекарственного препарата. Расскажите, пожалуйста, как проходили исследования семаглутида в Вашем центре?***

Игорь Шохин: Благодарю за вопрос. Перед нашим лабораторным комплексом стоит непростая задача: нам присылают мешок с несколькими тысячами пробирок, в каждой из которых содержится плазма крови, заслепленная особым образом. Наша цель – определить концентрацию семаглутида в каждой

пробирке. Важно отметить, что эти концентрации очень малы. Всем, вероятно, хорошо знаком термин «нанотехнология». Приставка «нано» обозначает 10^{-9}. В процессе биоаналитических исследований, в частности при изучении семаглутида, мы имеем дело именно с такими нанограммовыми концентрациями. Максимальные концентрации, с которыми мы сталкиваемся в наших пробах, составляют сотни нанограмм на миллилитр, а минимальные – примерно в сто раз меньше. Таким образом, достоверно измерить эти значения и получить достоверные данные – непростая задача. Семаглутид представляет собой довольно сложный препарат с химической точки зрения.

Как пояснил Роман, это пептидный препарат, состоящий из 31 аминокислоты. Для химиков он представляет собой нечто среднее между обычной малой молекулой и биологическим веществом. Как известно, аминокислоты входят в состав белков, из которых построен организм. Поэтому подходы к анализу таких пептидных препаратов могут быть весьма разнообразными.

Один из них – так называемые методы связывания лиганда, например, иммуноферментный анализ. Это наиболее распространенный метод изучения макромолекул, обладающий рядом преимуществ, таких как высокая чувствительность. Однако есть и сложность: тест-системы для иммуноферментного анализа пептидных препаратов в России не производятся, поэтому их необходимо импортировать. Кроме того, их нужно полностью валидировать, чтобы гарантировать достоверность получаемых данных.

Другой подход – использование высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС). Приборы ВЭЖХ-МС представляют собой сложные дорогостоящие комплексы, для работы с которыми требуются высококвалифицированные операторы, способные разрабатывать и валидировать методики на этих приборах. Однако этот метод с применением масс-спектрометрии позволяет с высокой точностью и минимальными погрешностями определить нанограммовые концентрации препаратов. Важно отметить, что помимо исследования концентрации самого семаглутида, в ряде образцов мы также измеряли его иммуногенность – уровень антител к семаглутиду.

Как известно, наш организм настороженно относится к чужеродным веществам, особенно если они имеют большую молекулярную массу, например, белковой или пептидной природы. В ответ на это организм начинает вырабатывать антитела, которые могут связывать и выводить чужеродные молекулы, а также вызывать собственные реакции, такие как аллергические.

В рамках данного исследования было важно продемонстрировать, что реакции иммуногенности у оригинального препарата и разрабатываемого российского препарата «Семавик» сопоставимы. Только после этого результаты этих исследований могут быть включены в состав регистрационного досье. Затем материалы исследований становятся частью отчета о клиническом исследовании и регистрационного досье, которые передаются в Минздрав.

Наталья Кульджанова: ***Правильно ли я понимаю, что благодаря проведённым сложным исследованиям было доказано, что российский аналог компании «ГЕРОФАРМ» обладает такой же безопасностью и эффективностью, как и препарат европейского бренда?***

Игорь Шохин: Я могу сказать, что в рамках исследований биоэквивалентности, которыми мы занимаемся, сопоставимость препаратов оценивается по их фармакокинетическим параметрам, то есть по тому, сколько препарата поступило в кровь. На основе этих данных мы делаем вывод о сопоставимой эффективности препаратов.

Роман Драй: Иными словами, если два одинаковых химических вещества попадают к месту своего действия одинаково, то и действовать они будут одинаково. Например, если мы хотим вывести оригинальный препарат, то сначала должны провести три фазы исследований, в которых изучаем его эффективность и безопасность. В случае с «Семавиком» этого не требовалось, так как такие исследования уже провела компания «Novo Nordisk». Наша задача – доказать, что структура препаратов одинакова.

Мы разобрали препараты по каждой аминокислоте, полностью их изучили и доказали, что они идентичны.

Нам важно было убедиться, что оба препарата одинаково попадают в кровь. Когда делают инъекцию, под кожей образуется «депо». В течение недели препарат постепенно всасывается в кровь. Наша с Игорем задача заключалась в том, чтобы продемонстрировать, что этот процесс происходит одинаково. Мы проводили клинические исследования, а лаборатория измеряла концентрацию препарата в крови. Мы не стремились доказать эффективность или безопасность препарата. Эти вопросы уже были решены 10 лет назад. Наша цель заключалась в том, чтобы подтвердить, что новый препарат идентичен оригинальному. Мы успешно справились с ней, и теперь все инструкции по медицинскому применению нового препарата полностью соответствуют инструкциям для оригинального препарата. Мы не вносили никаких изменений в оригинальный текст инструкции по применению.

Наталья Кульджанова: ***Хорошо, спасибо, Роман. Что происходит после того, как мы провели клинические испытания лекарственного препарата?***

Роман Драй: После этого препарат поступает в аптеки, его закупают государственные учреждения, и пациенты начинают его применять. В этот момент в дело вступает фармаконадзор. По закону, у нас есть определенный алгоритм, согласно которому мы обязаны проводить фармаконадзор наших препаратов. Это процесс, в рамках которого мы принимаем любые жалобы от пациентов и врачей из разных источников. Например, если пациент сделал инъекцию и почувствовал тошноту после применения «Семавика», но не прочитал, что эта нежелательная реакция уже описана в инструкции по медицинскому применению, он может пожаловаться.

У пациента есть возможность зайти на наш сайт, распечатать анкету или заполнить ее онлайн. Также можно позвонить на горячую линию, номер которой указан на любой упаковке, или заполнить форму в Росздравнадзоре. Полученные жалобы изучаются специалистами фармаконадзора. Они проверяют, есть ли информация об этой реакции в инструкции по медицинскому применению. Если она там есть, мы благодарим пациента и подтверждаем, что уже знаем об этой реакции.

В течение определенного периода мы должны будем составить периодический отчет о безопасности лекарственного средства. В нем мы смотрим, совпадает ли количество нежелательных реакций с тем, что указано в инструкции. Если какой-то реакции не было в инструкции, мы об этом информируем и начинаем исследовать причину, связываться с пациентами. Поэтому фармаконадзор является важной частью жизненного цикла любого лекарственного препарата, включая «Семавик».

Наталья Кульджанова: ***Коллеги, спасибо, что подробно и понятно рассказали о том, как проводятся исследования препаратов!***

Редакционная статья / Editorial article

УДК 615.11

Аптекарский приказ – зарождение и становление. Часть 4

К. С. Гузев✉

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

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

Резюме

В четвертой части статьи перечислены основные лекарственные формы, производимые специалистами Аптекарского приказа. Особый интерес представляет анализ документов, впервые опубликованных К. С. Худиным, которые датируются серединой XVII в. В них приведены наименования лекарственных средств, приготовленных аптекарями и алхимистами из растительного и минерального сырья, а также сведения о принятии этих препаратов (водок, масел, мазей, пластырей, сахаров, сиропов, «конфект», бальзамов и прочее) дьяками Аптекарского приказа.

The apothecary order – the origin and formation. Part 4

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 fourth part of the article presents main pharmaceutical forms made by the Apothecary prikaz's specialists. The key point is for the first time published analysis by K. S. Hudin of XVII century documents. These papers contain lists of medicines made by pharmaceutists and alchemists of minerals and herbal raw material as well as prescriptions of using these drugs (vodkas, oils, ointments, patches, sugars, syr-ups, sweets, balms, etc.) by clerks of the Apothecary prikaz.

ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ АПТЕКАРСКОГО ПРИКАЗА, СВЯЗАННАЯ С АПТЕЧНЫМ ДЕЛОМ

Под аптечным делом понимаем работу Аптекарского приказа по приготовлению лекарственных средств на аптекарском дворе силами штатных сотрудников, по заготовке лекарственного сырья внутри России и по организации закупок лекарственного растительного сырья и готовых лекарственных средств за границей.

Для понимания технологического уровня производственного персонала Аптекарского приказа приведем номенклатуру лекарственных форм, изготавливающихся на аптекарском дворе в XVI–XVII вв.

Как видно из данных таблицы 1, названия лекарственных форм в основном заимствованы из латинского языка. Однако некоторые из них имели как смысловые, так и специфические названия. Так, под названием «водка» подразумевалось три ее разновидности: спиртовая настойка, которую перед употреблением разбавляют водой, настойка или лекарственная вода (отвар), которая готовится без участия спирта, и «водка крепкая» – концентрированная кислота (царская водка). Под названием «экстракт» редко, но все же встречаются его разновидности: «лоох» («эклегма») – сложная смесь водных вытяжек из лекарственных трав с медом, «рооб» – сгущенный сок растений и сгущенные водные вытяжки из плодов. Наравне со словом «порошок» и его латинским аналогом «пульвис» в документах Аптекарского приказа встречаются слова «порох» и «пыль». Аналогичная ситуация наблюдается с формой «сок» – «суккус», «сикус». Мазь, или «масть», иногда называют «мальханом» или латинским аналогом – «унгвентумом». Интересно использование слова «сахар». Оно употреблялось в двух значениях: «тросниковый» сахар (осветленный, очищенный, «скоромный», головной) и «консерво», когда части свежих растений растирают с большим количеством сахара. Сахар также применялся для приготовления «юлепа» – лекарственной формы, представляющей собой раствор лекарственных веществ в ароматных водах с добавлением сахара.

Таблица 1. Основные лекарственные формы, встречаемые в документах Аптекарского приказа

Table 1. Main dosage forms found in the documents of the Pharmacy Order[1]

Жидкие Liquid	Твердые Solid	Мягкие Soft
Водки, микстуры, сиропы, экстракты, соки, электвариумы (кашки), юлепы Vodkas, mixtures, syrups, extracts, juices, electvariums (porridges), juleps	Конфекты, пастилки, пилюли, порошки, специи, сахара Sweets, lozenges, pills, powders, spices, sugars	Мази, пластыри, электвариумы (кашки) Ointments, plasters, electriums (porridges)

Примечание. [1] Олехнович О. Г. Медицинская терминология в «Делах Аптекарского Приказа, XVII в.». Дис. ... канд. филол. н. Екатеринбург; 2000. С. 72. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/meditsinskaya-terminologiya-v-delakh-aptekarskogo-prikaza-xvii-v. Ссылка активна на 05.02.2025.

Note. [1] Olekhnovich O. G. Medical terminology in the "Affaires of the Pharmacy Order, XVII century". [Dissertation.] Yekaterinburg; 2000. P. 72. Available at: https://www.dissercat.com/content/meditsinskaya-terminologiya-v-delakh-aptekarskogo-prikaza-xvii-v. Accessed: 05.02.2025.

Объективную и ранее не опубликованную информацию о выполнении производственной функции Аптекарского приказа можно получить из работы К. С. Худина, в которой, кроме анализа ранее опубликованных документов, представлены два новых артефакта с перечнем фармацевтических субстанций, лекарственного растительного сырья и лекарственных средств, приготовленных на аптекарском дворе[1]. К ним относятся:

1. «Записная книга о выдаче всяких запасов …» (июль – август 1643 г.).
2. «Алфавитный перечень лекарств с обозначением их стоимости (на 14 листах)».

Полное название первого документа звучит следующим образом: «Записная книга о выдаче всяких запасов аптекарямъ и алхимистамъ на водки, масла, сахары, сиропы, пластыри, бальзамы и прочее, и о принятіи маселъ и водокъ, сдѣланныхъ из травъ». В книге представлены записи писарей Аптекарского приказа по выдаче или закупке сырья для приготовления препаратов и по получению на аптекарский двор готовой продукции от аптекарей.

Второй документ – «Алфавитный перечень лекарств…» – демонстрирует всеобъемлющий перечень различных лекарственных средств, применявшихся в русской медицине XVII в., включая лекарственные растения, химические компоненты и готовые лекарственные формы с указанием их стоимости. Документ написан на 14 листах и скреплен в книгу. Он не датирован, но применение альтернативных методов установления времени создания документа позволило автору отнести его к периоду 1646–1658 гг.

Мы проанализировали перечень лекарственных средств, приготовление которых проводили аптекари и алхимисты Аптекарского приказа. К ним относятся:

- водки и вина;
- уксусы, духи и спирты;
- масла, мази и пластыри;
- иные составы.

При переводе некоторых старорусских названий лекарственных растений большую помощь оказали работы О. Г. Олехнович[2, 3].

Приготовление лекарственных средств

Производство водок и вин

Водки и вина имеют сходную рецептуру при производстве, а сами эти слова часто используют в русских источниках как синонимы. В рецептах водка именуется «aqua», а при изготовлении ее на основе виноградного вина – «aqua vinosa». Последнее часто именуют просто вином. Слово «водка» в «Словаре русского языка IX–XVII вв.»[4] трактуется как «лекарственная настойка (на травах, ягодах и т. д.)». Под словом «вино» понимали «различные (в зависимости от перегонки и очистки) сорта спирта». Продукт первой перегонки обозначался словами «простое вино». «Двойным» или «двоенным» называлось хлебное вино (спирт), полученное двойной перегонкой простого вина. Следующей степенью очистки спирта было «тройное» или даже «четвертное» вино, полученное соответственно после тройной или четверной перегонки.

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

[2] Олехнович О. Г. Проблемы перевода фитонимов с латинского языка на русский в документах «Аптекарского Приказа» XVII в. В кн.: Парадигмы культурной памяти и константы национальной идентичности. Нижний Новгород: Изд. ННГУ им. Н. И. Лобачевского; 2020. С. 97–107.

[3] Олехнович О. Г. Медицинская терминология в «Делах Аптекарского Приказа, XVII в.». Дис. ... канд. филол. н. Екатеринбург; 2000. 307 с. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/meditsinskaya-terminologiya-v-delakh-aptekarskogo-prikaza-xvii-v. Ссылка активна на 05.02.2025.

[4] Бархударов С. Г. и др., ред. Словарь русского языка XI–XVII вв. М.: Наука; 1975.

Таблица 2. Наименования водок и вин, обнаруженные К. С. Худиным в новых документах Аптекарского приказа

Table 2. Names of vodkas and wines discovered by K. S. Khudin in new documents of the Pharmacy Order

Водка анисная (анис обыкновенный) Anise vodka (common anise)	Водка календулы, или Водка из цвету календулы (ноготки лекарственные) Calendula vodka, or Calendula flower vodka (medicinal marigold)
Водка анисная сладкая Sweet anise vodka	Водка кардус бенедиктус (ворсянка, кудрявый волчец) Vodka cardus benedictus (teasel, curly thistle)
Вино анисное сладкое Sweet anise wine	Водка коричная (корица, кора деревьев рода *Cinnamomum*) Cinnamon vodka (cinnamon, bark of trees of the genus *Cinnamomum*)
Вино ландышева (ландыш майский) Lily of the valley wine (May lily of the valley)	Водка лактукова (латук посевной) Laktukova vodka (lettuce)
Водка буквицы белой (буковица лекарственная) White initial vodka (medicinal initial)	Водка можжевеловая (можжевельник кавказский) Juniper vodka (Caucasian juniper)
Водка вербены (вербена бонарская) Verbena vodka (verbena bonarica)	Водка очиной помочи? Can vodka help?
Водка вероникова (вероника лекарственная) Vodka Veronikova (Veronica officinalis)	Водка пиролья? Vodka piroglia?
Водка гладышева (гладыш широколистный) Gladysheva vodka (broadleaf gladysh)	Водка полынная (полынь цитварная) Wormwood vodka (wormwood tsitvarnaya)
Водка гуляфная двойная свежего цвету (роза собачья, или шиповник собачий) Double gulyaf vodka fresh flower (dog rose, or dog rose)	Водка попутникова (подорожник средний) Poputnikova vodka (medium plantain)
Водка гуляфная простая Plain gulyaf vodka	Водка портулакова (портула́к огородный) Vodka purslane (purslane)
Водка гуляфная тройная свежего цвету Gulyafnaya vodka triple fresh color	Водка ретешная (редька огородная) Reteshnaya vodka (garden radish)
Водка гуляфная четвертная свежего цвету Vodka gulyafnaya quarter fresh flower	Водка свороборинная (шиповник собачий) Vodka svoroborinnaya (dog rose)
Водка гуляфная четвертная соленого цвету Vodka gulyafnaya quarter salty color	Водка хреновая (хрен обыкновенный) Horseradish vodka (horseradish)
Водка земляничная (земляника садовая) Strawberry vodka (garden strawberry)	Водка цылидоньева (чистотел большой) Vodka Tsylidoneva (great celandine)
Водка из земляного дыму (дымянка лекарственная) Vodka made from earthen smoke (dymyanka officinalis)	Водка щавью людцкова (щаве́ль конский) Vodka sorrel lyudtskova (horse sorrel)

Исходя из содержания источников Аптекарского приказа, К. С. Худин выделяет следующие наименования водок и вин (таблица 2).

Производство уксусов, духов и спиртов

Уксус (acetum), получают «чрез окисление хлебного и виноградного вина или пива». «Уксус нагрет и принят истребляет вредительную мокрость ядовитую из всего тела»[1]. Этот термин часто встречается в документах Аптекарского приказа, так как уксусы являлись компонентом других составов. Из уксусов чаще других встречаются *ренский уксус* («добрый» или «крепкий»), который готовился из рейнского вина, *романейный уксус,* добавлявшийся в пластырь стиптикум, и *шпанский уксус* – основа для приготовления «*духа уксусного*» (ацетона).

Слова «дух» и «спирт» обозначаются одним и тем же словом «spiritus». В отличие от слова «дух», обозначавшего обычно собственно спирт, слово «спирт» в документах Аптекарского приказа употреблялось для обозначения «спиртовой настойки лекарственного назначения». Встречается название «дух уксусный», обозначающее ацетон.

Слово «спирт» почти всегда использовалось с добавлением уточняющих слов. Например, *можжевеловый спирт,* который готовился из можжевеловых ягод. Однако ранее мы указывали, что на Руси существовали различные сорта спирта, в зависимости от количества этапов перегонки и, соответственно, качества получаемого спирта.

Производство масел, мазей и пластырей

Слово «масло» (oleum) имело как минимум три значения. Во-первых, под маслом понимали растительное масло (часто оливковое), во-вторых, животный жир (преимущественно коровье масло), а в-третьих, слово «масло» является синонимом слова «мазь».

[1] Флоринский В. М. Русские простонародные травники и лечебники: собрание медицинских рукописей XVI и XVII столетия. Казань: Тип. Императорскаго ун-та; 1879. С. 128–129.

О маслах, которые «к чему удобны бывают», записано: «Аще то масло смешаем с теми зелиями, кои естеством суть горячи, тогда масло горячество содержит; аще с теми смешаем, кои естеством холодительны, тогда и масло студеностно»[1]. Масла на Руси наравне с водками были самыми употребляемыми лекарственными средствами. Наиболее распространенным маслом было деревянное – низший сорт оливкового масла. Лекарственные масла, как правило, доставляли из-за границы в готовом виде. Однако местные аптекари и алхимисты, как западные, так и отечественные, владели технологией приготовления различных масел и постепенно переносили ее на российскую почву. Масла, полученные в Аптекарском приказе в Москве, часто назывались московскими.

В XVII в. масла получали следующими способами:

1. Настаиванием лекарственного растительного сырья, выращенного на аптекарском огороде (мята, мелисса, анис и т. п.) или завезенного из-за границы (гвоздика, лавр, имбирь, кардамон, кориандр и др.), в *деревянном или бобковом* маслах.
2. Перегонкой с водяным паром (можжевеловое, укропное, полынное и др.). Мятное масло закупалось «за морем в Немецкой земле», но начиная с 1660 г., после четырех лет отсутствия европейских поставок, было налажено изготовление этого масла в Аптекарском приказе.
3. Экстрагированием масла из сырья, предварительно замоченного в водке («*попилемовое* масло» – масло из тополиных почек, «масло *свороборинное*» – масло из лепестков шиповника, «*янтарное* масло» – масло с тонко измельченным янтарным порошком).

В перечне лекарственных средств, представленном К.С. Худиным, выделены 39 разновидностей масел (таблица 3)[2].

Отдельно следует отметить масло купоросное. Его закупали в Европе, и оно представляло собой концентрированную серную кислоту, получаемую из медного купороса.

Мазь («масть», «малхан», «унгвентум») в текстах встречается в широком и узком смыслах. В широком смысле оно включает в себя все субстанции, нанесение которых осуществляется намазыванием и втиранием. К этой группе можно отнести все масла, роль которых часто выполняло оливковое масло. В более узком смысле под мазью понимали собственно лекарственную мазь. Основу для мазей мог составлять воск, смола, сало или «бальзам», который должен быть «смешан с маслом деревянным и поварен гораздо». В «Прохладном вертограде» сказано: «Бальсам есть масло или смола, а течет из дерева бальсамова, а сок того древа сильнее есть, нежели той плод... Для того сок бальсамов много ценен есть и драг»[3].

К. С. Худин перечислил следующие наименования мазей[4].

Пластырь (emplastrum), с точки зрения аптекарей XVII в., представлял собой ту же мазь, но с добавлением для густоты воска, бальзама, смолы или сала, нанесенную на ткань. Иными словами, это «тканевая повязка с нанесенной на нее лекарственной массой, употребляемая в лечебных целях». Отличается от мази густотой и тем, что пластырь накладывается, а мазь – втирается[5].

В другой книге пластырь – это «плат, зелием врачевским намазан и к язве тела обязуем».

В «Записной книге о выдаче всяких запасов» К. С. Худин определил следующие наименования пластырей (таблица 4)[6].

К иным составам, готовившимся в лабораториях Аптекарского приказа, относятся сахара, леденцы и сиропы. Эти изделия передавались в Сытный приказ, ведающий кушаньями и напитками, подававшимися на царский стол. Согласно «Прохладному вертограду» в переводе В. М. Флоринского «сахар с разными благовонными зелии смешан и принят, естество человеческое укрепляет»[7].

В «Записной книге о выдаче всяких запасов»[8] упоминаются следующие названия сахаров, леденцов и сиропов (таблица 5).

Эти формы готовились на аптекарском дворе из сахара. Сахар привозили из Европы в виде крупных голов и в виде мелкокристаллического порошка (са-

[1] Флоринский В. М. Русские простонародные травники и лечебники: собрание медицинских рукописей XVI и XVII столетия. Казань: Тип. Императорскаго ун-та; 1879. С. 130.

[2] Худин К. С. Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. С. 148–158; 260–273. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/dissertation_pdfs/000/000/039/original/5ea675ae2d3360e948e599716479b7aa279a0423.pdf?1614584656. Ссылка активна на 27.02.2024.

[3] Флоринский В. М. Русские простонародные травники и лечебники: собрание медицинских рукописей XVI и XVII столетия. Казань: Тип. Императорскаго ун-та; 1879. С. 139–140.

[4] Худин К. С. Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. С. 260–273. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/dissertation_pdfs/000/000/039/original/5ea675ae2d3360e948e599716479b7aa279a0423.pdf?1614584656. Ссылка активна на 27.02.2024.

[5] Даль В. И. Толковый словарь живого великорусского языка. Т. 3. М.: Русский язык, 1990. С. 121.

[6] Худин К. С. Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. С. 268. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/dissertation_pdfs/000/000/039/original/5ea675ae2d3360e948e599716479b7aa279a0423.pdf?1614584656. Ссылка активна на 27.02.2024.

[7] Флоринский В. М. Русские простонародные травники и лечебники: собрание медицинских рукописей XVI и XVII столетия. Казань: Тип. Императорскаго ун-та; 1879. С. 71.

[8] Худин К. С. Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. С. 269–270. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/dissertation_pdfs/000/000/039/original/5ea675ae2d3360e948e599716479b7aa279a0423.pdf?1614584656. Ссылка активна на 27.02.2024.

Таблица 3. Наименования масел, обнаруженные К. С. Худиным в новых документах Аптекарского приказа

Table 3. Names of oils discovered by K. S. Khudin in new documents of the Pharmacy Order

Масло анисное (анис) Anise oil (anise)	Масло лавендулово (лаванда) Lavendula oil (lavender)
Масло аранцыорум перепускное Arantsiorum bypass oil	Масло лигни родий фереоптими Rhodium ligni oil fereoptimi
Масло бобковое перепускное (оливковое) Bean oil (olive)	Масло маюранное (майронан) Mayuran oil (mayronan)
Масло гвоздичное (гвоздика) Oil of cloves (cloves)	Масло миндальное горькое Bitter almond oil
Масло из цвету мушкатного перепускное Muscat flower oil bypass	Масло миндальное сладкое Sweet almond oil
Масло из червей? Worm oil?	Масло ориганум (душица обыкновенная) Oil of oreganum (oregano)
Масло инпериково (имбирное) Inperic oil (ginger)	Масло полынное Wormwood oil
Масло ис кишнецу (кориа́ндр посевно́й) Is kishnetsu oil (coriander sativum)	Масло попилемовое (из тополиных почек) Poplar oil (from poplar buds)
Масло ис корени ингирю (имбирь) Ingiru root oil (ginger)	Масло рамоновое перепускное (ромашка) Ramon transfer oil (chamomile)
Масло ис салвей (шалфей) Is salvay oil (sage)	Масло розмаринновое Rosemary oil
Масло ис серы горячей комумнис Oil from sulfur hot communis	Масло розмаринновое перепускное Rosemary oil bypass
Масло ис серы горячей перкаранур Oil from sulfur hot perkaranur	Масло свороборинное (из цветов и плодов шиповника) Svoroborin oil (from rosehip flowers and fruits)
Масло ис травы сабины (можжевельник казацкий) Sabina herb oil (Cossack juniper)	Масло скарапионово Scarapion oil
Масло іс травы испулђгїй Oil and herbs are used	Масло скипидарное Turpentine oil
Масло іс травы рюты (рута душистая) Oil from the rue herb (fragrant rue)	Масло тимьянное Thyme oil
Масло кардамоно Cardamom oil	Масло тминное Caraway oil
Масло кишнецово (кориандр) Kishnetsovo oil (coriander)	Масло финиколного Date oil
Масло коричное (корица) Cinnamon oil	Масло цытроное перепускное Citron oil bypass
Масло кроповое (укропное) Crop oil (dill)	Масло янтарное Amber oil

харный песок). Различали «нескоромный» (неочищенный, коричневый) и «добрый» (белый) сахар. Для приготовления сахаров использовали цветы или соки плодов растений. Сахар растворяли в соках, упаривали и высушивали. Для приготовления сиропов применяли, кроме соков и цветов, фрукты (плоды) и травы. Сахарный сироп варили совместно с выбранным ингредиентом, фильтровали, охлаждали и использовали для приготовления лечебных напитков.

В документах Аптекарского приказа фигурирует также «экстракт полынный». Его состав совпадает с ингредиентами водки и вина. Если исходить из определения В.И. Даля[1], что экстракт – это «отвар снадобья, выпаренный до густоты», то полынный экстракт отличался от водки и вина своей консистенцией.

Как видно из представленных данных, в XVII в. в Аптекарском приказе активно формируется российская аптекарская (фармацевтическая) терминология. При этом широко используются как русские названия лекарственных форм и их ингредиентов, так и их латинские аналоги. Количество форм невелико, однако их разнообразие свидетельствует о широком использовании растительного и минерального лекарственного сырья. Причем для этого применяли не только отечественные растения, но и сырье, произрастающее в Индии, Китае и других странах. Что же касается технологических приемов, то можно с уверенностью констатировать, что основными методами получения лекарственных средств были наиболее простые операции – измельчение, просеивание, плавление, растворение, фильтрация, выпаривание, смешивание, перегонка, настаивание и др.

[1] Даль В. И. Толковый словарь живого великорусского языка. Т. 4. М.: Русский язык; 1991. С. 664.

Таблица 4. Наименования мазей и пластырей, обнаруженные К. С. Худиным в новых документах Аптекарского приказа

Table 4. Names of ointments and plasters discovered by K. S. Khudin in new documents of the Pharmacy Order

Наименование мазей Name of ointments	Наименование пластырей Name of patches
Мазь каметиси Kametisi ointment	Пластырь диахиликум гумы (Emplastrum Plumbi simplex) Diahilicum guma patch (Emplastrum Plumbi simplex)
Мазь еспленетиций Esplenetic ointment	Пластырь деранис безо ртути Deranis plaster without mercury
Мазь лубрикорум Lubricorum ointment	Пластырь деранис со ртут(ь)ю Deranis patch with mercury
Мазь диатерница Diaternica ointment	Пластырь катагматикум Catagmaticum patch
Мазь резентифиум Resentifium ointment	Пластырь милилотный Millilot patch
Мазь елебастрини Elebastrini ointment	Пластырь де бетоницы Plaster de concrete
Мазь аранцыорум Ointment arantsiorum	
Мазь нервинум Nervinum ointment	
Мазь марцыатум Ointment marcyatum	
Мазь цытрини Cytrini ointment	
Мазь ариганум Ariganum ointment	

Таблица 5. Наименования сахаров и сиропов, обнаруженные К. С. Худиным в новых документах Аптекарского приказа

Table 5. Names of sugars and syrups discovered by K. S. Khudin in new documents of the Pharmacy Order

Сахар головной добрый Head sugar is good	Сахарный леденец бѣлый White sugar candy
Сахар мелкий добрый Fine sugar	Сахарный леденец красный Sugar candy red
Сахар нескоромный мелкий (неосветленный) Fine sugar (unclarified)	Сыроп барбарорум Barbarorum syrup
Сахар іс цвѣту цытронова Sugar and citrus color	Сыроп диамором Diamore syrup
Сахар полынный Wormwood sugar	Сыроп іс коры цытроновы Cheese and citron bark
Сахар іс цвѣту консолиды Sugar and color consolidum	Сыроп іс соку цытроново Cheese with citronovo juice
Сахар іс цвѣту лавендулова Sugar and lavendula color	Сыроп королковый композита King syrup composite
Сахар іс цвѣту розмаринного Sugar and rosemary color	Сыроп лимонный Lemon syrup
Сахар іс цвѣту фьялкового Sugar and rosemary color	Сыроп полынный Wormwood syrup
Сахар свороборинный Common sugar	Сыроп розарум сулутиус Rosarum sulutius syrup
Сахар циданкорум Sugar cidancorum	Сыроп фьялковый Violet syrup
Сахар цинцигорис Zintzigoris sugar	Сыроп цыдонкорум Tsydonkorum syrup

По предположениям ученых, история появления сахара берет свое начало в Индии в III тысячелетии до н. э. Сахар получали из сахарного тростника. Самые ранние упоминания о продукте встречаются в индийском древнем эпосе «Рамаяна».

Слово «сахар» происходит от санскрита शर्करा, (*sharkarā, шаркара*), что означает «молотый или гравийный сахар» или, по другому источнику, «сладкий». На Среднем Востоке о сахаре узнали в начале IV века до н. э. благодаря арабам, которые завозили его из Индии. В Европе о сахаре из тростника узнали в 325 году до н. э. благодаря Неарку (Νέαρχος, IV век до н. э., военачальник, флотоводец, сподвижник Александра Великого). Однако лишь в начале VII века, когда арабы покорили Азию и завезли растение в Средиземноморье, сахар постепенно начал завоевывать страны. Сахарный тростник удачно акклиматизировался в долине великого Нила и Палестине. Спустя время растение появляется в Сирии, а затем в северной Африке и Испании. Новый этап в популяризации сахара наступил в XII столетии благодаря походам крестоносцев на сирийские и палестинские земли. Так сложилось, что торговля сахаром в XIV–XV веках сконцентрировалась в Венеции, которая стала сахарной столицей. Все поставки сахара из Индии останавливались здесь. Здесь же производили переработку и очистку сырья, придавая сахару форму конуса (головы). После этого продукт распространялся по всему Старому Свету. Впервые сахар в Россию был завезен из Европы в XI–XII веках. В то время он был доступен только состоятельным и богатым людям. Первый завод по производству сахара был открыт Петром I в июне 1720 г. в Санкт-Петербурге и имел название «Сахарная палата». До конца XVII века сырье для производства сладкого продукта завозили из-за границы. Но в 1800 году в России смогли наладить собственное производство сахара из сахарной свеклы[1].

[1] Брокгауз Ф. А., Ефрон И. А., издатели. Энциклопедический словарь. Т. XIIIX. СПб.: Семеновская Типолитография (И. А. Ефрона); 1900. С. 1–32.

Информационная статья / Informational article

«Pharmtech & Ingredients – 2024»

С 19 по 22 ноября 2024 года в Москве прошла 26-я международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства «Pharmtech & Ingredients – 2024».

"Pharmtech & Ingredients –2024"

From November 19 to 22, 2024, the 26th International Exhibition of Equipment, Raw Materials and Technologies for Pharmaceutical Production "Pharmtech & Ingredients – 2024" was held in Moscow.

В этом году выставка продемонстрировала еще больший масштаб по сравнению с предыдущими годами, поставив абсолютный рекорд как по числу участников экспозиции, так и по количеству специалистов, посетивших выставку. И участники, и посетители отметили рост качества представленной экспозиции, а именно представительный состав участников выставки, который развивается от года к году.

«*Конкурентная способность отрасли растет. Надо отметить и технологическое сокращение отставания. Отрадно отметить, что выставка больше, чем годом ранее. Больше желающих показать свой продукт. Больше компаний из дружественных стран. Мне очень приятно, что на сегодняшней выставке представлены отечественные компании, которые занялись производством оборудования для отрасли. Это был главный вопрос. Мы научились синтезировать, работать в биотехе и создавать новые биотехнологические лекарства, но пока на импортном оборудовании. Плавно перешла зависимость от Запада к зависимости от Востока. Мы всегда подчеркивали, что без независимости в оборудовании мы вряд ли сможем сделать шаг вперед. Вот сегодня появились компании, которые не побоялись конкурентной борьбы, и они представлены на этой выставке*», – отметил **Виктор Дмитриев**, генеральный директор Ассоциация российских фармацевтических производителей.

«Pharmtech & Ingredients – 2024» заняла площадь свыше 22 000 м^2. В трех выставочных залах разместились стенды 568 компаний из 13 стран, для 240 из которых участие стало дебютом. Продукцию и свои предложения представили производители и поставщики из Белоруссии, Китая, Индии, Италии, Испа-

нии, Турции, Венгрии, ОАЭ и других стран. В этом году в экспозиции приняли участие 242 российские компании – на 30 компаний больше, чем годом ранее. Нужно отметить, что данный показатель растет из года в год, что отражает рост активности российских компаний на рынке.

Количество посетителей выставки за четыре дня составило рекордные 10 345 специалистов (10 011 в 2023 г.) из 71 региона России (69 в 2023 г.) и 27 стран мира, включая представителей всех стран ЕАЭС (Белоруссия, Армения, Киргизия, Казахстан). Общее количество компаний, посетивших выставку, составило 6330 предприятий (6236 в 2023). Доля новых посетителей составила 52 %: 5350 специалистов не посещали «Pharmtech & Ingredients» годом ранее. Более 2500 посетителей (42 %) представляли компании с закупочными бюджетами от 20 млн и более 50 млн рублей.

Выставку посетили представители крупнейших компаний – производителей лекарственных средств из России и стран ЕАЭС: Sotex, «Акрихин», «Биокад», «Берлин Фарма», «Биосинтез», «Биотэк», «Биннофарм Групп», Борисовский завод медицинских препаратов, «Валента Фарм», «Верофарм», «Генериум», «Герофарм», «Гедеон Рихтер-Рус», «Канонфарма продакшн», НПО «Микроген», УП «Могилевский завод ветпрепаратов», «Нанолек», НПО «Петровакс Фарм», НТФФ «Полисан», «Р-Фарм», РУП «Белмедпрепараты», «СкопинФарм», «Татхимфармпрепараты», «Фармасинтез-Норд», «ФармСтандарт», «Эвалар» и многих других.

Деловая программа

Выставка «Pharmtech & Ingredients – 2024» сопровождалась трехдневной деловой программой, посвященной актуальным темам индустрии. 14 деловых мероприятий посетили 1080 делегатов.

В первый день работы выставки состоялась пленарная сессия **«Фарма будущего: как новые технологии влияют на производство фармацевтической продукции»**, в ходе которой руководители профильных ассоциаций, эксперты отрасли и представители фармацевтических компаний обменялись мнениями на тему актуальности для российской фармпромышленности общемировых трендов по использованию ИИ и цифровых технологий, внедрения новых технологий в производство и перспектив применения ИИ в медицине и фармацевтике России.

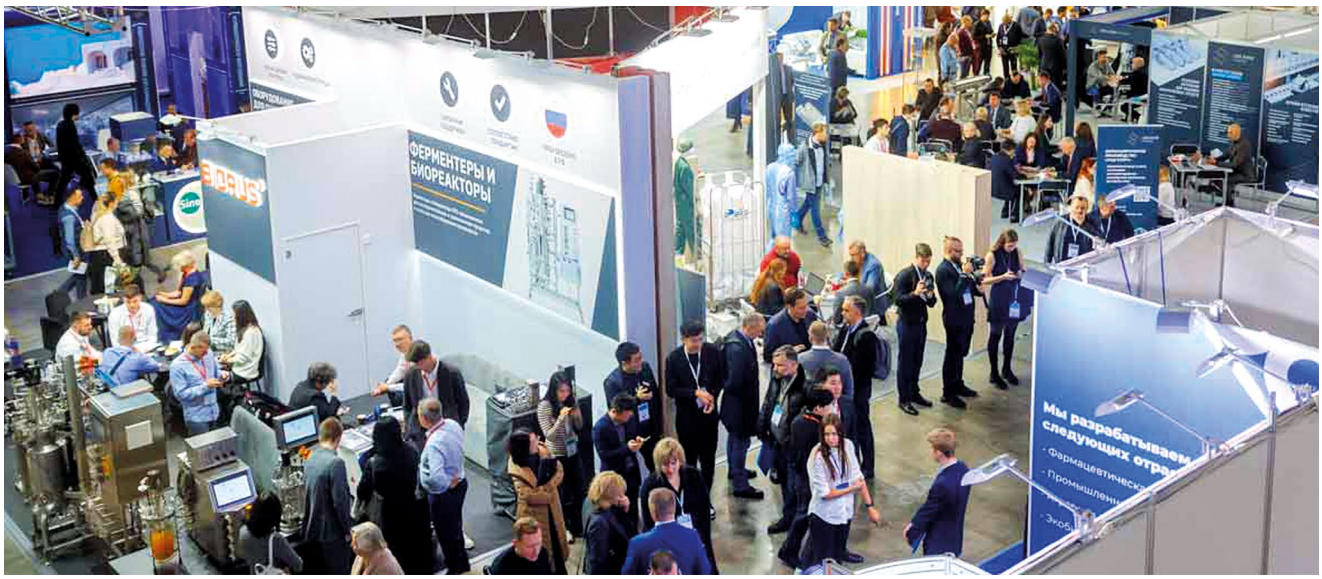
Кроме того, в этот же день состоялся круглый стол **«Сырье для производства АФС: как избавиться от импортной зависимости»**. Как отметили эксперты, сегодня на финальной стадии разработки находится национальный проект технологического ли-дерства, и между химией и фармой важен эффективный диалог, обмен данными для достижения высоких результатов. Также специалисты поделились статистикой отрасли и подчеркнули: рост России в объеме мирового фармрынка обеспечивает глобальное старение населения, более качественная диагностика, вложения в здравоохранение и более ши-

рокие возможности граждан по приобретению фармпрепаратов, а в течение следующих пяти лет ключевыми факторами развития рынка АФС станут растущая распространенность хронических заболеваний, растущий спрос на персонализированную медицину и стимулирование локализации производства АФС для обеспечения устойчивости поставок.

Другим ярким событием первого дня стала презентация инновационных проектов в области качества финалистов конкурса **«GxP-ПРОФИ 2024»**. Мероприятие позволяет представить лучшие инновационные проекты в области качества фармацевтического производства широкой аудитории профессионального сообщества, а также дает возможность специалистам отрасли узнать больше о лидерах в области качества и перенять опыт коллег. Победителями конкурса стали компании «Акрихин», «Валента Фарм» и «Р-Фарм». Среди тем работ, представленных на конкурсе, были проекты в области фармацевтического инжиниринга, улучшения фармацевтической системы качества, цифровизации производственных процессов и внедрения рискориентированного подхода. Организатор: Евразийская академия надлежащих практик.

В рамках выставки традиционно прошел **форум «Фармтехпром»**. Мероприятие, которое ежегодно служит площадкой для представления новейших технологий фармацевтического производства, в этом году включало в себя три сессии. Специалисты российских и зарубежных компаний представили новинки оборудования, рассказали о сырье, ингредиентах, технологиях, а также оборудовании и сопутствующих процессах для фармацевтического производства, а кроме того, об упаковочных решениях для конечных продуктов.

- Круглый стол **«Актуальные вопросы развития рынка БАД в России»**. Участники дискуссии отметили, что к тенденциям рынка БАД относится ужесточение конкуренции, снижение доли импортных БАД и замедление темпов роста сегмента в целом, а также изменение спроса и рост доли e-Com в обороте категории «БАД». К перспективам для брендов эксперты отнесли: знание бренда, маркетинговые ресурсы, нормативные изменения, усиление контрольно-надзорных мероприятий. Кроме этого, спикеры согласились с тем, что важно расширить доступ к БАД и поднять уровень доверия населения к данной категории товаров, а для получения качественного и безопасного продукта нужна сертификация производства БАД по стандартам GMP.
- В рамках деловой программы выставки впервые состоялся круглый стол **«Рынок лекарственных препаратов для ветеринарного применения: его особенности, проблемы и перспективы»**, объединивший широкую аудиторию специалистов. Рынок ветеринарных препаратов в России, по словам экспертов, динамично развивается, импорт при этом постепенно вытесняется отечественными и белорусскими производителями. Отрасль, как подчеркнули специалисты, устойчива к кризисам, что подтверждают последние годы. Как было отмечено, важно создание устойчивой базы для обеспечения животноводства лекарственными препаратами для ветеринарного применения на основе новых конкурентоспособных отечественных технологий производства, обеспечивающих защиту здоровья животных, а также профилактику и лечение сельскохозяйственных животных. Одними из острых моментов, по словам спикеров, остаются переходные периоды в работе по новым правилам, наиболее частые несоответствия при инспектировании площадок и рост цен на российские разработки в связи с зависимостью производителей от импортного сырья, если речь идет о препаратах химического синтеза.
- Сессия **«Роль технического заказчика в создании объектов фармацевтической промышленности»**. На мероприятии был рассмотрен широ-



кий спектр вопросов, затрагивающих проектирование, строительство и ввод в эксплуатацию производственных проектов в фармотрасли. Спикеры, ведущие эксперты в сфере строительства и фарминжиниринга, обсудили текущее состояние института технического заказчика в России, проблемы и перспективы развития, роль технического заказчика на всех этапах инвестиционно-строительного проекта, функции технического заказчика в предпроектной проработке и проектировании, правовые аспекты деятельности технического заказчика, а также поделились практическими рекомендациями по проектированию объектов фармацевтической промышленности.

- Круглый стол **«ВЭД в фармацевтической отрасли: таможенные, правовые и налоговые аспекты»**. К ключевым факторам роста рынка, по словам экспертов, относятся нацпроекты здравоохранения для расширения охвата бесплатными медицинскими услугами, ограниченная стабилизация экономики и ее адаптация к условиям санкционного давления. Среди ключевых факторов ограничения роста рынка: экономическая ситуация в условиях геополитической напряженности, тренд на локализацию и ограничение импорта с целью снижения зависимости от иностранных поставщиков и обеспечения лекарственной безопасности страны, а также сокращение ассигнований из федерального бюджета на закупку ЛС из-за перераспределения финансирования.

Проект «Pharmtech Tutor»

«Pharmtech Tutor» – уникальный проект, целью которого является показать студентам выпускных курсов разнообразие направлений, по которым может развиваться карьера в фармацевтической индустрии. Уже более 10 лет проект объединяет высшую школу и отрасль. Учитывая существенную потребность в квалифицированных кадрах для фармпроизводства сегодня, можно сказать, что значение этого проекта сложно переоценить.

Участниками проекта в 2024 году стали 44 студента из:

- Ярославского государственного медицинского университета (ЯГМУ).
- Ярославского государственного технического университета (ЯГТУ).
- Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова.
- Ярославского промышленно-экономического колледжа (ЯПЭК).
- Ярославского государственного педагогического университета им. К. Д. Ушинского.
- Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова.
- Казанского государственного медицинского института.

Проект «Pharmtech Tutor – 2024» поддержали 28 компаний.

Лауреаты премий

Выставка «Pharmtech & Ingredients» растет и развивается вместе с участниками фармацевтической отрасли вот уже 26 лет. Неотъемлемой частью мероприятия является церемония награждения участников выставки – хороший повод подвести итоги и отметить результаты работы.

В этом году торжественная церемония награждения состоялась 20 ноября. Лауреатами премии стали компании в семи номинациях:

- «Лучший дебют» – **ООО «Полисинтез»**.
- «Эффективная демонстрация продукта на стенде» – **«КВАРКО»**.
- «Лучшая российская экспозиция» – **«ЭКРОСХИМ»**.
- «Яркая презентация международной компании» – **BIOGROWING**.
- «За высокий профессионализм» – **ООО «АРТЛАЙФ ТЕХНО»**.
- «Самый активный участник выставки этого года» – **«АЛЬДОСА»**.
- «За верность и постоянство» – **ГК «Фармтех»**.

Официальная поддержка

В 2024 году выставка «Pharmtech & Ingredients» прошла при официальной поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, Министерства здравоохранения Российской Федерации, Правительства Москвы, Союза профессиональных фармацевтических организаций, Ассоциации российских фармацевтических производителей, Ассоциации независимых аптек.

Команда «Pharmtech & Ingredients» благодарит гостей, участников и партнеров выставки за вклад в организацию и проведение главного бизнес-события фарминдустрии России и стран ЕАЭС. 26-я международная выставка «Pharmtech & Ingredients» состоится 25–28 ноября 2025 года в Москве, МВЦ «Крокус Экспо», павильон 2.

gotoipheb.ru | +7 965 772 7791

IPhEB

Международная выставка и форум по фармацевтике и биотехнологиям

8–10 апреля 2025 | Санкт-Петербург

Генеральный партнер: ФАРМАСИНТЕЗ

Поддержка: МИНПРОМТОРГ РОССИИ; САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ПАЛАТА; СПХФУ; Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

Организатор: РЕСТЭК

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.071

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1885

Check for updates

CC BY 4.0

Определение таутомерного состава новой потенциально активной фармацевтической субстанции

Т. В. Сотникова✉, **О. Ю. Стрелова, Э. П. Санаева, Д. А. Колесник, И. П. Яковлев**

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

✉ **Контактное лицо:** Сотникова Татьяна Васильевна. **E-mail:** tatyana.sotnikova@spcpu.ru

ORCID: Т. В. Сотникова – https://orcid.org/0009-0004-8991-7866;
О. Ю. Стрелова – https://orcid.org/0000-0001-6737-1023;
Э. П. Санаева – https://orcid.org/0009-0005-0483-3370;
Д. А. Колесник – https://orcid.org/0000-0002-5527-6595;
И. П. Яковлев – https://orcid.org/0000-0003-1251-8782.

Статья поступила: 01.08.2024 **Статья принята в печать:** 04.12.2024 **Статья опубликована:** 06.12.2024

Резюме

Введение. Разработка методик анализа новых потенциально активных фармацевтических веществ является важной частью стандартизации субстанций. Комплексный подход к подтверждению структуры вещества является особо важным при возможности существования вещества в разных таутомерных формах, так как свойства вещества могут изменяться в зависимости от таутомерии, влияя в том числе на фармакологическую активность.

Цель. Целью нашего исследования являлось определение таутомерного состава потенциально активной фармацевтической субстанции 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она в твердом состоянии и растворе для последующей разработки его лекарственной формы и определения биодоступности.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась субстанция 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она. Для подтверждения структуры снимали спектры: инфракрасный на приборе PerkinElmer Spectrum 3 (PerkinElmer Inc., США) в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$, ядерного магнитного резонанса ^{1}H и ^{13}C на импульсном широкополосном спектрометре Bruker AM-500 (400 и 100 МГц) (Bruker, Германия) в растворителе ДМСО-d_6, ультрафиолетовый с помощью СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) в области длин волн 250–400 нм; а также была проведена высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Результаты и обсуждение. Особенностью гидроксипроизводных пиримидина является наличие таутомерных форм, которые могут влиять как на физико-химические свойства вещества, так и на его фармакологическую активность. В ходе исследования было обнаружено, что в твердом состоянии 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-он находится в равновесии между дикето-формой и енольной, а при растворении вещества в диметилсульфоксиде (ДМСО) преобладающей формой является енольная. Методом ВЭЖХ-МС/МС подтверждена чистота.

Заключение. Методами ИК- и ЯМР-спектроскопии была подтверждена структура 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она. Получены УФ-спектры, а также для исключения возможного поглощения ультрафиолетового излучения примесями была проведена ВЭЖХ-МС/МС.

Ключевые слова: 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-он, подтверждение структуры вещества, таутомеры

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

Вклад авторов. Т. В. Сотникова, О. Ю. Стрелова спланировали эксперимент. Д. А. Колесник синтезировал образец. Т. В. Сотникова, О. Ю. Стрелова, Э. П. Санаева участвовали в написании текста статьи. Т. В. Сотникова, О. Ю. Стрелова, Э. П. Санаева, Д. А. Колесник, И. П. Яковлев участвовали в обработке данных и обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования (ЦКП) «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России».

Для цитирования: Сотникова Т. В., Стрелова О. Ю., Санаева Э. П., Колесник Д. А., Яковлев И. П. Определение таутомерного состава новой потенциально активной фармацевтической субстанции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):31–38. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1885

© Сотникова Т. В., Стрелова О. Ю., Санаева Э. П., Колесник Д. А., Яковлев И. П., 2025
© Sotnikova T. V., Strelova O. Yu., Sanaeva E. P., Kolesnik D. A., Yakovlev I. P., 2025

Determination of the structure of a new potentially active pharmaceutical substance

Tatiana V. Sotnikova✉, Olga Yu. Strelova, Ella P. Sanaeva, Denis A. Kolesnik, Igor P. Yakovlev

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

✉ **Corresponding author:** Tatiana V. Sotnikova. **E-mail:** tatyana.sotnikova@spcpu.ru

ORCID: Tatiana V. Sotnikova – https://orcid.org/0009-0004-8991-7866;
Olga Yu. Strelova – https://orcid.org/0000-0001-6737-1023;
Ella P. Sanaeva – https://orcid.org/0009-0005-0483-3370;
Denis A. Kolesnik – https://orcid.org/0000-0002-5527-6595;
Igor P. Yakovlev – https://orcid.org/0000-0003-1251-8782.

Received: 01.08.2024 **Accepted:** 04.12.2024 **Published:** 06.12.2024

Abstract

Introduction. The development of methods for analyzing new potentially active pharmaceutical substances is an important part of substance standardization. An integrated approach to confirming the structure of a substance is especially important when the substance may exist in different tautomeric forms, since the properties of the substance may change depending on tautomerism, affecting, among other things, the pharmacological activity.

Aim. The aim of our study was to determine the tautomeric composition of the potential active pharmaceutical substance 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4(3H)-one in solid state and solution for the subsequent development of its dosage form and determination of bioavailability.

Material and methods. The object of the study was the substance 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4(3H)-one. Spectra were taken to confirm the structure: infrared on a PerkinElmer Spectrum 3 device (PerkinElmer Inc., USA) in the frequency range from 4000 to 400 cm^{-1}, nuclear magnetic resonance ^{1}H and ^{13}C on a pulsed broadband spectrometer Bruker AM-500 (400 and 100 MHz) (Bruker, Germany) in DMSO-d_6 solvent, ultraviolet using SF-2000 (LLC "OKB Spektr", Russia) in the wavelength range of 250–400 nm, and high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was also carried out.

Results and discussion. A feature of pyrimidine hydroxy derivatives is the presence of tautomeric forms, which can affect both the physicochemical properties of the substance and its pharmacological activity. The study found that in the solid state, 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4(3H)-one is in equilibrium between the diketo form and the enol form, and when the substance is dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), the enol form is predominant. The purity was confirmed by HPLC-MS/MS.

Conclusion. The structure of 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4(3H)-one was confirmed by IR and NMR spectroscopy. UV spectra were obtained, and HPLC-MS/MS was performed to exclude possible absorption of ultraviolet radiation by impurities.

Keywords: 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4(3H)-one, confirmation of the structure of the substance, tautomers

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 V. Sotnikova, Olga Yu. Strelova planned the experiment. Denis A. Kolesnik synthesized the sample. Tatiana V. Sotnikova, Olga Yu. Strelova, Ella P. Sanaeva participated in writing the text of the article. Tatiana V. Sotnikova, Olga Yu. Strelova, Ella P. Sanaeva, Denis A. Kolesnik, Igor P. Yakovlev participated in data processing and in the discussion of the results.

Funding. The work was carried out on the basis of the Collective Use Center (CCU) "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education SPCPU of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation".

For citation: Sotnikova T. V., Strelova O. Yu., Sanaeva E. P., Kolesnik D. A., Yakovlev I. P. Determination of the structure of a new potentially active pharmaceutical substance. *Drug development & registration*. 2025;14(1):31–38. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1885

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых биологически активных молекул является одним из приоритетных направлений современной фармацевтической химии. Возможным способом создания новой эффективной субстанции является использование в качестве первоисточника уже хорошо изученных групп лекарственных средств [1, 2]. В этом отношении перспективными являются производные пиримидина. Из данных литературы известно, что соединения из данной груп-

пы обладают разнообразной биологической активностью [3–7]. Поэтому из группы производных пиримидин-4,6-диола была выделена потенциально активная фармацевтическая субстанция 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-он, которая, предположительно, обладает противовоспалительной, анальгезирующей, антигипоксической активностью [8]. Субстанция была получена в результате взаимодействия N-фенилбензолкарбоксимидамида с диэтилбутилпропандиоатом в среде диметилформамида при катализе гидрокарбонатом калия [8].

В настоящее время является актуальной разработка требований к стандартному образцу и активной фармацевтической субстанции в соответствии с требованием Государственной фармакопеи РФ (ГФ РФ) XV издания.

Цель исследования – определить таутомерный состава потенциальной активной фармацевтической субстанции 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она в твердом состоянии и растворе для последующей разработки его лекарственной формы и определения биодоступности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом нашего исследования явилась субстанция 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-он, синтезированная на кафедере органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в 2023 г.

Исследование растворимости проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость» ГФ РФ XV издания.

ИК-спектроскопию проводили на приборе Perkin-Elmer Spectrum 3 (PerkinElmer Inc., США) по следующей методике: около 0,01 г вещества вносили в прибор. Снимали инфракрасный спектр в области от 4000 до 400 $см^{-1}$.

Спектроскопию ядерного магнитного резонанса выполняли на спектрометре Bruker AM-500 (400 и 100 МГц) (Bruker, Германия), спектральные данные обработаны с помощью программы ACD/NMR Processor Academic Edition.

Методика: около 0,01 г образца 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она растворяли в ДМСО-d_6 и регистрировали ^{1}H-ЯМР- и ^{13}C-ЯМР-спектры.

Ультрафиолетовые спектры растворов записывали на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия). Для проведения УФ-спектроскопии точные навески (около 0,005) субстанции помещали в мерную колбу объемом 50 мл и растворяли навеску в диметилсульфоксиде. Затем брали аликвоту 2,0 мл полученных растворов, помещали в кювету вместимостью 25 мл и доводили до метки растворителем; спектр записывали в кюветах с толщиной слоя 1 см относительно диметилсульфоксида в интервале длин волн 250–400 нм.

Исследование выполнено методом ВЭЖХ-МС/МС на приборе Agilent 1260 Infinity Triple Quad с детектированием по полному ионизационному току. 25 мг субстанции растворяли в 25 мл этанола, затем брали 1 мл аликвоты и растворяли в 10 мл этанола, потом брали 1 мл аликвоты и растворяли в 10 мл раствора (ацетонитрил : вода – 1 : 1). Отбирали 5 мкл и запускали в дозатор хроматографа. Условия хроматографирования: температура термостата колонки – 30 °C, подвижная фаза: 80 % – ацетонитрил, 20 % – вода, скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Субстанция 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она представляет собой твердый мелкокристаллический порошок белого цвета с желтоватым оттенком. Субстанция практически нерастворима в воде, однако легко растворима в ацетоне и растворима в метаноле и этаноле.

Так как была синтезирована новая серия 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она (DA-5) (синтез 2023 г.) [8], возникла необходимость провести исследования по подтверждению структуры вещества. На данный момент идентификация структуры с использованием только одного метода не считается достаточной. Использование двух и более методов в тандеме может повысить общую специфичность [9–10]. Поэтому в данной работе использовалось несколько методов подтверждения структуры вещества.

Кроме установления самой структуры субстанции, необходимо было определить ее таутомерный состав, так как важной особенностью гидроксипиримидина является наличие таутомерии. Понимание таутомерных процессов, происходящих в потенциальных лекарствах, связано с моделированием их взаимодействия с рецептором, поскольку разные таутомеры обладают разным сродством к рецептору. Из литературных данных известно наличие у 4,6-дигидроксипиримидинов кето-енольной, а также цвиттер-ионной формы [11].

Первым методом идентификации структуры вещества в твердом состоянии была выбрана инфракрасная спектрофотометрия [12]. Важным диапазоном при расшифровке спектра является область 4000–2500 $см^{-1}$ – область валентных колебаний простых связей. Полоса 2956 $см^{-1}$ соответствует валентным колебаниям C-H в sp^2-гибридизации (рисунок 1). В области 2921–2855 $см^{-1}$ на спектре присутствуют две полосы, которые соответствуют валентным колебаниям бутильного радикала. Широкая полоса 2600 $см^{-1}$ соответствует аммонийному катиону, который образуется в результате добавления разбавленной соляной кислоты в процессе синтеза вещества [8]. Широкая полоса 3000–2600 $см^{-1}$, на которую накладываются полосы бутильного радикала и валентные колебания ароматической системы, соответствует енолу, который стабилизирован внутримолекулярной водородной связью и сопряжен с кето-группой.

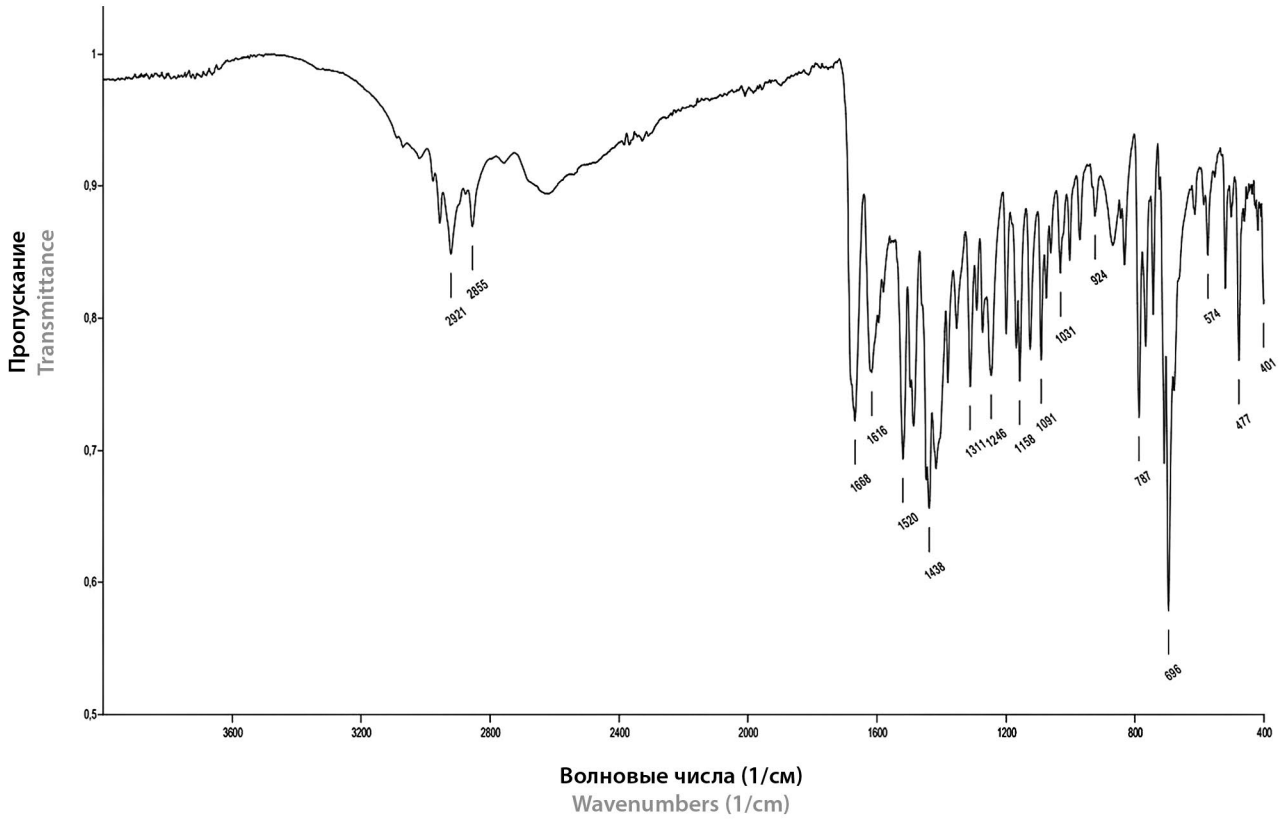


Рисунок 1. **ИК-спектр субстанции DA-5**

Figure 1. **IR-spectrum of DA-5 substance**

Вторым важным диапазоном для расшифровки данного спектра является область валентных колебаний двойных связей. Полоса поглощения 1668 $см^{-1}$ характеризует валентные колебания связи —C═O. Данная полоса образовалась в результате наложения двух кето-групп, что обуславливает ее несимметричность. Полоса 1616 $см^{-1}$ характеризует валентные колебания C═C (ароматическое). Следующая область «отпечатков пальцев» имеет полосы: 1520 $см^{-1}$ – колебания C═C (ароматическое), 1486 $см^{-1}$ – колебания связи —CH_2—, 1438 $см^{-1}$ – связи —CH_3, 1091 $см^{-1}$ принадлежат —C═O, 1031 и 787 $см^{-1}$ – валентные колебания C—H пиримидина, 696 $см^{-1}$ – внеплоскостные деформационные колебания бензольных колец.

На основании полученных данных предполагается, что в твердом состоянии вещество находится в равновесии между дикето-формой и енольной формой (рисунок 2).

Подтверждение структуры в растворе проводили методом ядерного магнитного резонанса. Однако, поскольку для теста чаще всего используют раствор вещества, теряется информация, характеризующая структуру твердого тела, которую можно получить методом ИК [13].

Спектр ЯМР (^{1}H, ДМСО-d_6, δ м.д.) полученного соединения характеризуется наличием резонансных

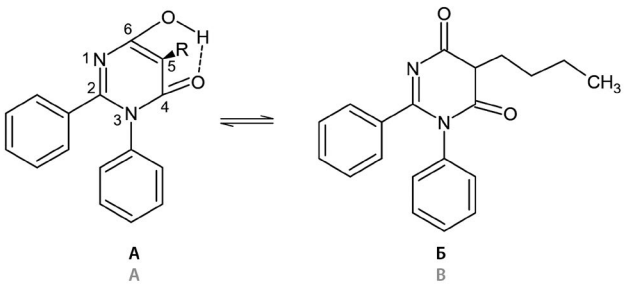


Рисунок 2. **Таутомерные формы DA-5.**
А – енольная форма (R—C_4H_9); В – дикето-форма

Figure 2. **Tautomeric forms of DA-5.**
A – enol form (R—C_4H_9); B – diketo form

сиг-налов протонов бензольных колец 7,33–7,18 м.д. (m, 10H). 11,42 м.д. (s, 1H) соответствует —OH, сопряженной с фрагментом —C═C—, сигналы протонов группы —CH_3 – в области 0,89–0,93 (t, 3H, J = 7,3) и сигналы групп —CH_2— – в области 1,29–2,38 м.д (q, 4H) (рисунок 3).

Таким образом, число сигналов соответствует числу типов протонов в молекуле, интегральная интенсивность прямо пропорциональна числу протонов данного типа в молекуле. Также стоит отметить наи-

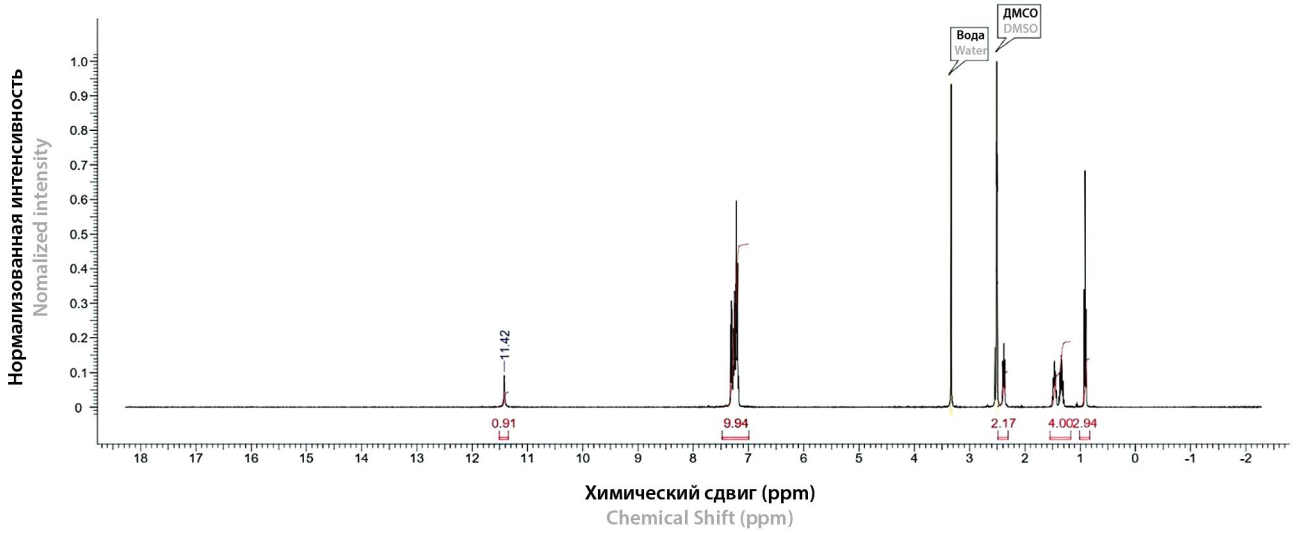


Рисунок 3. **Спектр ^{1}H-ЯМР DA-5**

Figure 3. **^{1}H NMR spectrum of DA-5**

более важный сигнал для исследования таутомерии – 11,42 м.д., который соответствует протону ОН-группы при двойной связи.

Спектр ^{13}С-ЯМР (ДМСО-d_6), δ, м.д.: 14.40 (CH_3), 22.78–30.28 (CH_2), 101.15 (C_5), 128.00–138.33 (Ar), 156.95 (C_2), 163.73 (C_6), 164.46 (C_4) (рисунок 4). Число линий в спектре соответствует числу неэквивалентных атомов углерода в молекуле, а химические сдвиги подтверждают структуру молекулы [10]. Методом ЯМР-спектроскопии также была подтверждена структура молекулы. Полученные результаты свидетельствуют о преобладании в растворе енольной структуры вещества (рисунок 2, А).

Ультрафиолетовая спектроскопия проводилась в среде диметилсульфоксида (ДМСО) [11]. На спектре обнаруживается один широкий максимум при 293 ± 2 нм. Затем в раствор добавляли по каплям (1 мл содержит 21 каплю) 5%-й спиртовой раствор натрия гидроксида и после каждого добавления снимали спектр. Как и предполагалось, при добавлении 1 капли щелочи в раствор наблюдали увеличение значения оптической плотности при сохранении значения длины волны (рисунок 5). Гиперхромный эффект объясняется переходом $\pi \rightarrow \pi^*$. Также появлялся дополнительный низкоинтенсивный максимум при длине волны 375 ± 2 нм, что, предположительно, объясняется переходом $n \rightarrow \pi^*$.

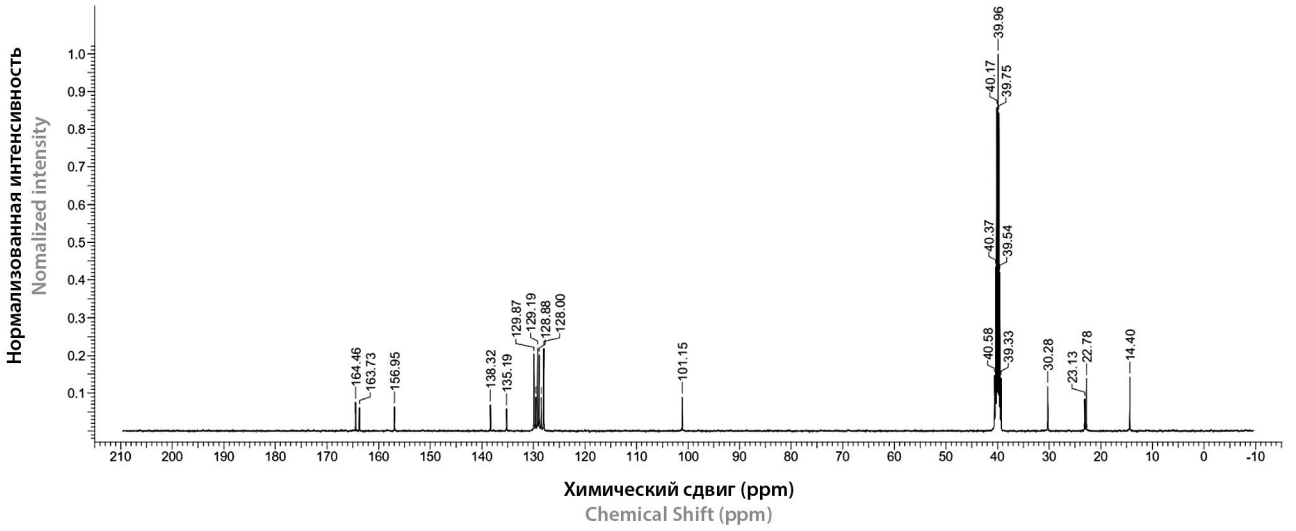


Рисунок 4. **Спектр ^{13}С-ЯМР DA-5**

Figure 4. **^{13}C NMR spectrum of DA-5**

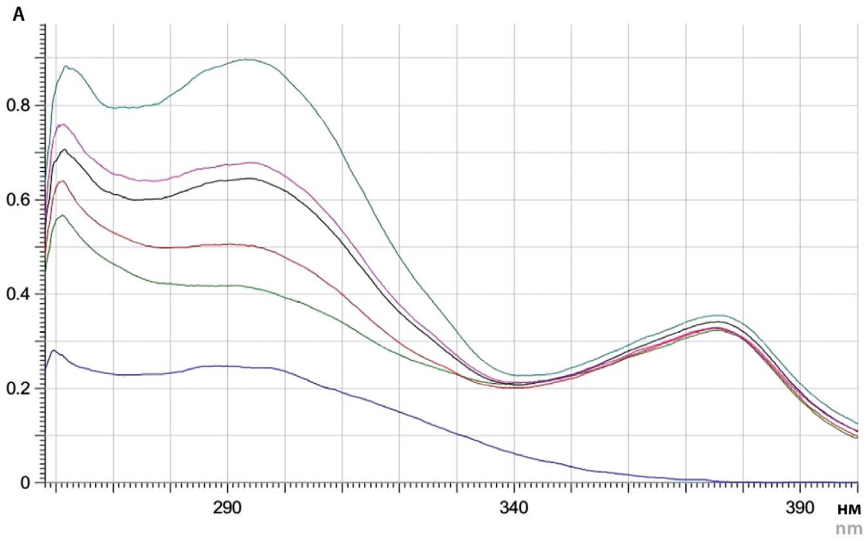


Рисунок 5. **УФ-спектры раствора DA-5 с добавлением спиртового 5%-го натрия гидроксида**

Figure 5. **UV spectra of a solution of DA-5 with the addition of alcoholic 5 % sodium hydroxide**

По данным литературы [11], при добавлении щелочи равновесие смещается в сторону енольных таутомеров, поэтому происходит увеличение максимума (рисунок 2, А). Отсутствие максимума дикето-таутомера в данной области можно объяснить тем, что он поглощает излучение при более низких длинах волн.

Проводили анализ чистоты изучаемой субстанции для исключения возможного наличия поглощающей в УФ примеси. Для этой цели была выбрана высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), как высокочувствительный, селективный, обладающий высокой производительностью метод (рисунок 6).

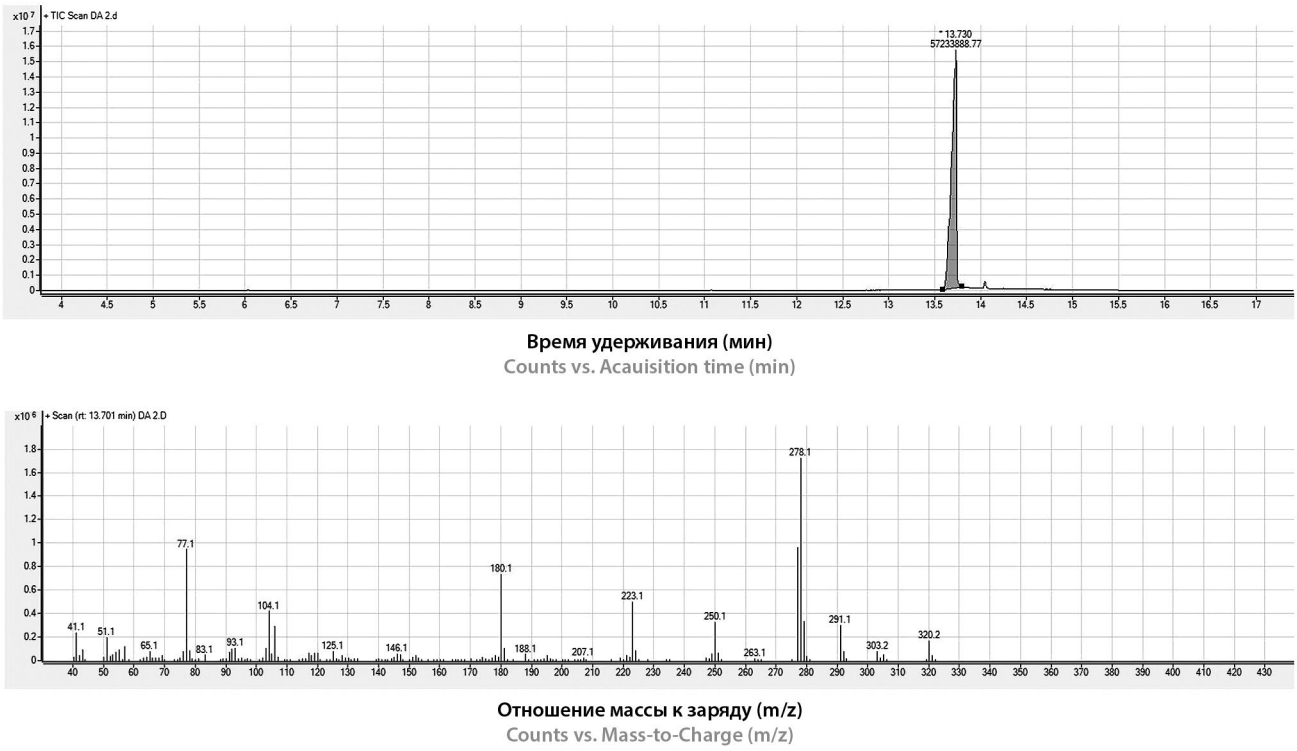


Рисунок 6. **Хроматограмма и масс-спектр DA-5**

Figure 6. **Chromatogram and mass-spectrum of DA-5**

С помощью подобранной методики были определены время удерживания 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она, которое составило 13,730 мин, и масс-спектр с пиком молекулярного иона с 320,2 m/z, что соответствует молекулярной массе вещества.

На основании ВЭЖХ-МС/МС можно сделать вывод, что субстанция является хроматографически чистой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования спектральных характеристик 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она предполагается, что в твердом состоянии вещество находится в равновесии между дикето-формой и енольной, а в растворе преобладает енольная структура вещества. Исследования таутомерного состава субстанции 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она в твердом виде и в растворах ДМСО при различных значениях кислотного показателя могут быть в дальнейшем использованы для последующих исследований по выбору и разработке его лекарственной формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bharatam P. V., Valanju O. R., Wani A. A., Dhaked D. K. Importance of tautomerism in drugs. *Drug Discovery Today*. 2023;28(4):103494. DOI: 10.1016/j.drudis.2023.103494.
2. Taylor A. P., Robinson R. P., Fobian Y. M., Blakemore D. C., Jones L. H., Fadeyi O. Modern advances in heterocyclic chemistry in drug discovery. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2016;14(28):6611–6637. DOI: 10.1039/c6ob00936k.
3. Самотруева М. А., Цибизова А. А., Ясенявская А. Л., Озеров А. А., Тюренков И. Н. Фармакологическая активность производных пиримидинов. *Астраханский медицинский журнал*. 2015;10(1):12–29.
4. Кодониди И. П., Новиков О. О., Кулешова С. А., Рябухин Ю. И., Шатохин С. С., Ивченко А. В., Кодониди М. И., Жилина О. М. Синтез новых n-гидроксифенильных и толильных производных пиримидин-4(1н)-она, обладающих противовоспалительной активностью. *Фармация и фармакология*. 2017;5(6):556–567. DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-6-556-567.
5. Muhammad M. T., Khan K. M., Khan A., Arshad F., Fatima B., Choudhary M. I., Syed N., Moin S. T. Syntheses of 4,6-dihydroxypyrimidine diones, their urease inhibition, in vitro, in silico, and kinetic studies. *Bioorganic Chemistry*. 2017;75:317–331. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.08.018.
6. Joshi K. A., Pandya H. B., Mahida A. K., Modasiya I. J., Dubal G. G. Synthesis and Antimicrobial Activity of New Dihydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2024;50(2):304–312. DOI: 10.1134/s1068162024020134.
7. Vyshtakalyuk A. B., Semenov V. E., Parfenov A. A., Shashyn M. S., Belyaev G. P., Galyametdinova I. V., Zobov V. V. "Double" pyrimidine derivatives: synthesis and primary assessment of hepatoprotective properties in vitro. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2020;46(6):1067–1073. DOI: 10.1134/S1068162020060369.
8. Колесник Д. А., Куваева Е. В., Семакова Т. Л., Стрелова О. Ю., Яковлев И. П. 5-Замещенные-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4-(3H)-оны и способ их получения. Патент РФ на изобретение RU 2738605 C1. 14.12.2020.
9. Лутцева А. И., Боковикова Т. Н., Яшкир В. А., Стронова Л. А., Кузьмина Н. Е., Агапкина М. В., Панова Л. И., Попова Е. Н., Гадасина Н. В., Буланова Л. Н., Прокофьева В. И. Методологические подходы к выбору методов установления подлинности лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(2):71–76.
10. Моисеев С. В., Кузьмина Н. Е., Лутцева А. И. Разработка методик подтверждения подлинности фармацевтических субстанций трипторелина ацетат и гозерелина ацетат методом ЯМР-спектроскопии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(1):54–63. DOI: 10.30895/1991-2919-2019-9-1-54-63.
11. Vu T. Q., Yudin N. V., Kushtaev A. A., Nguyen T. X., Maltsev S. A. Spectroscopic study of the basicity of 4,6-dihydroxypyrimidine derivatives. *ACS Omega*. 2021;6(22):14154–14163. DOI: 10.1021/acsomega.1c00671.
12. Song Y., Cong Y., Wang B., Zhang N. Applications of Fourier transform infrared spectroscopy to pharmaceutical preparations. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2020;17(4):551–571. DOI: 10.1080/17425247.2020.1737671.
13. Моисеев С. В., Крылов В. И., Кузьмина Н. Е., Яшкир В. А., Меркулов В. А. Использование метода ЯМР-спектроскопии в фармакопейном анализе. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(2):53–57.
14. Attia A. K., Abdel-Moety M. M., Abdel-Hamid S. G. Thermal analysis study of antihypertensive drug doxazosin mesilate. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10(1):S334–S338. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.08.006.
15. Золотов С. А., Пономарев Е. С., Даин И. А., Демина Н. Б., Золотова А. С. Изучение физико-химических свойств субстанции этравирина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):28–35. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-28-35.

REFERENCE

1. Bharatam P. V., Valanju O. R., Wani A. A., Dhaked D. K. Importance of tautomerism in drugs. *Drug Discovery Today*. 2023;28(4):103494. DOI: 10.1016/j.drudis.2023.103494.
2. Taylor A. P., Robinson R. P., Fobian Y. M., Blakemore D. C., Jones L. H., Fadeyi O. Modern advances in heterocyclic chemistry in drug discovery. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2016;14(28):6611–6637. DOI: 10.1039/c6ob00936k.
3. Samotrueva M. A., Tsibizova A. A., Yasenyavskaya A. L., Ozerov A. A., Tyurenkov I. N. Pharmacological activity of pyrimidine derivatives. *Astrakhan Medical Journal*. 2015;10(1):12–29. (In Russ.)
4. Kodonidi I. P., Novikov O. O., Kuleshova S. A., Rjabukhin J. I., Shatokhin S. S., Ivchenko A. V., Kodonidi M. I., Zhilina O. M. Synthesis of new n-hydroxyphenyl and tolyl derivatives of pyrimidine-4(1h)-one with anti-inflammatory activity. *Pharmacy & Pharmacology*. 2017;5(6):556–567. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-6-556-567.

5. Muhammad M. T., Khan K. M., Khan A., Arshad F., Fatima B., Choudhary M. I., Syed N., Moin S. T. Syntheses of 4,6-dihydroxypyrimidine diones, their urease inhibition, in vitro, in silico, and kinetic studies. *Bioorganic Chemistry*. 2017;75:317–331. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.08.018.
6. Joshi K. A., Pandya H. B., Mahida A. K., Modasiya I. J., Dubal G. G. Synthesis and Antimicrobial Activity of New Dihydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2024;50(2):304–312. DOI: 10.1134/s1068162024020134.
7. Vyshtakalyuk A. B., Semenov V. E., Parfenov A. A., Shashyn M. S., Belyaev G. P., Galyametdinova I. V., Zobov V. V. "Double" pyrimidine derivatives: synthesis and primary assessment of hepatoprotective properties in vitro. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2020;46(6):1067–1073. DOI: 10.1134/S1068162020060369.
8. Kolesnik D. A., Kuvaeva E. V., Semakova T. L., Strelova O. Yu., Yakovlev I. P. 5-Substituted-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4-(3H)-ones and method for their preparation. Patent RUS RU 2738605 C1. 12.14.2020 (In Russ.)
9. Lutseva A. I., Bokovikova T. N., Yashkir V. A., Stronova L. A., Kuzmina N. E., Agapkina M. V., Panova L. I., Popova E. N., Gadasina N. V., Bulanova L. N., Prokofieva V. I. Methodological approaches to the choice of identification test methods for medicines. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(2):71–76. (In Russ.)
10. Moiseev S. V., Kuz'mina N. E., Luttseva A. I. Development of identification test methods for triptorelin acetate and goserelin acetate substances using NMR spectroscopy. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(1):54–63. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2019-9-1-54-63.
11. Vu T. Q., Yudin N. V., Kushtaev A. A., Nguyen T. X., Maltsev S. A. Spectroscopic study of the basicity of 4,6-dihydroxypyrimidine derivatives. *ACS Omega*. 2021;6(22):14154–14163. DOI: 10.1021/acsomega.1c00671.
12. Song Y., Cong Y., Wang B., Zhang N. Applications of Fourier transform infrared spectroscopy to pharmaceutical preparations. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2020;17(4):551–571. DOI: 10.1080/17425247.2020.1737671.
13. Moiseev S. V., Krylov V. I., Kuzmina N. E., Yashkir V. A., Merkulov V. A. The use of NMR-spectroscopy in pharmacopoeial analysis. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):53–57. (In Russ.)
14. Attia A. K., Abdel-Moety M. M., Abdel-Hamid S. G. Thermal analysis study of antihypertensive drug doxazosin mesilate. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10(1):S334–S338. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.08.006.
15. Zolotov S. A., Ponomarev E. S., Dain I. A., Demina N. B., Zolotova A. S. Study of the physicochemical properties of the etravirine substance. *Drug development & registration*. 2021;10(4):28–35. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-28-35.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.322; 615.275; 582.795

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1978

Check for updates

CC BY 4.0

Цитостатический эффект извлечений из борщевика Сосновского

Р. И. Лукашов[1]✉, Н. С. Гурина[1], В. А. Терлецкая[1], А. В. Лавровский[1], Т. М. Дорошенко[2], А. С. Портянко[2], А. В. Клемпер[3], М. Н. Повыдыш[3]

[1] Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ). 220083, Республика Беларусь, г. Минск, проспект Дзержинского, д. 83

[2] Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова». 223040, Республика Беларусь, Минский район, аг. Лесной, Новодворский сельсовет, д. 66

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

✉ **Контактное лицо:** Лукашов Роман Игоревич. **E-mail:** r_lukashov@mail.ru

ORCID: Р. И. Лукашов – https://orcid.org/0000-0001-5234-6319;
Н. С. Гурина – https://orcid.org/0009-0009-9150-5728;
В. А. Терлецкая – https://orcid.org/0009-0000-8848-4617;
А. В. Лавровский – https://orcid.org/0009-0009-2730-5836;
Т. М. Дорошенко – https://orcid.org/0000-0002-8751-421X;
А. С. Портянко – https://orcid.org/0000-0003-2399-117X;
А. В. Клемпер – https://orcid.org/0000-0003-2995-7570;
М. Н. Повыдыш – https://orcid.org/0000-0002-7768-9059.

Статья поступила: 18.11.2024 **Статья принята в печать:** 26.12.2024 **Статья опубликована:** 27.12.2024

Резюме

Введение. Поиск новых противоопухолевых агентов среди растений местной флоры является одним из вариантов расширения существующего перечня химиотерапевтических лекарственных средств. Перспективным источником таких агентов может являться инвазивный и сорный вид для территории Республики Беларусь и Российской Федерации – борщевик Сосновского. Данный вид содержит кумарины, для которых установлены противоопухолевые свойства, поэтому борщевик Сосновского может считаться перспективным сырьевым источником данных биологически активных веществ.

Цель. Изучить цитостатический эффект извлечений из травы, соцветий и корней борщевика Сосновского на культурах опухолевых клеток *in vitro*.

Материалы и методы. Объект исследования – воздушно-сухие трава и соцветия, заготовленные в период цветения, и корни, собранные в период отмирания надземной части, борщевика Сосновского. Получали водно-спиртовые извлечения, из которых отгоняли растворитель, полученный сухой остаток растворяли в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4. Идентификацию и количественное определение кумаринов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Противоопухолевый (цитостатический) эффект *in vitro* изучали на следующих культурах клеток: карциномы легкого A549, аденокарциномы предстательной железы PC-3, меланомы кожи MeWo, аденокарциномы шейки матки Hela и иммортализованных фибробластов крайней плоти BjhTERT. Оценку жизнеспособности клеток выполняли в условиях МТТ-теста на планшетном спектрофотометре. Контроль метаболической активности осуществляли при помощи 4,5-диметилтиазолли-2-ил-2,5-дифенилтетразолия бромида. Формировали отрицательный контроль (буфер), контроль роста клеток, положительный контроль (доксорубицин) и исследуемые пробы.

Результаты и обсуждение. Извлечения из травы борщевика Сосновского проявляли статистически значимый цитостатический эффект в отношении линий опухолевых клеток A549, PC-3, Hela и MeWo; из корней и соцветий – в отношении линий клеток Hela и MeWo. Цитостатический эффект зависел от концентрации кумаринов в пересчете на ксантотоксин. Извлечения из травы оказывают цитостатическое действие на нормальные клетки BjhTERT; корни и соцветия значимо не влияют на их рост. Цитостатический эффект извлечений из травы борщевика Сосновского в отношении клеток линий A549 и PC-3 превосходил, в отношении клеток линий MeWo и BjhTERT сопоставим с доксорубицином. При сравнении полуэффективных концентраций выявлено, что все изученные извлечения вызывают подавление роста в более низких концентрациях, то есть имеют более высокую активность по сравнению с доксорубицином. Извлечения из травы сильнее подавляют рост клеток линии A549; из корней и соцветий – Hela.

© Лукашов Р. И., Гурина Н. С., Терлецкая В. А., Лавровский А. В., Дорошенко Т. М., Портянко А. С., Клемпер А. В., Повыдыш М. Н., 2025

© Lukashou R. I., Gurina N. S., Tsiarletskaya V. A., Laurouski A. V., Doroshenko T. M., Portyanko A. S., Klemper A. V., Povydysh M. N., 2025

Заключение. Трава, корни и соцветия борщевика Сосновского обладают выраженным цитостатическим эффектом *in vitro*, что делает целесообразным дальнейшее изучение данного растения в рамках выделения кумаринов и установления механизмов влияния на рост опухолевых клеток в сравнении с нормальными.

Ключевые слова: борщевик Сосновского, цитостатический эффект, трава, корни, соцветия, кумарины, клеточные линии опухолевых клеток, дозозависимый эффект

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

Вклад авторов. Р. И. Лукашов – обработка и представление экспериментальных данных. Н. С. Гурина – планирование фитохимического эксперимента, методологическая помощь. В. А. Терлецкая – статистическая обработка результатов, подготовка образцов к клеточным экспериментам. А. В. Лавровский – заготовка сырья, получение экстрактов и растворов. Т. М. Дорошенко – выполнение эксперимента на клетках. А. С. Портянко – планирование клеточного эксперимента, методологическая помощь. А. В. Клемпер – заготовка сырья, методологическая помощь. М. Н. Повыдыш – обсуждение результатов, разработка концепции исследования.

Финансирование. Выполнено в рамках задания «Оценить цитотоксические свойства и биодоступность *in vitro* индивидуальных биологически активных веществ и суммарных фито- и микоэкстрактов в культурах опухолевых клеток» [программа «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», подпрограмма «Синтез и направленное модифицирование регуляторов биопроцессов (Биорегуляторы)»].

Для цитирования: Лукашов Р. И., Гурина Н. С., Терлецкая В. А., Лавровский А. В., Дорошенко Т. М., Портянко А. С., Клемпер А. В., Повыдыш М. Н. Цитостатический эффект извлечений из борщевика сосновского. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):39–53. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1978

Cytostatic effect of extracts from *Heracleum Sosnowskyi*

Raman I. Lukashou[1]✉, Natalia S. Gurina[1], Viktoryia A. Tsiarletskaya[1], Aliaksandr V. Laurouski[1], Tatiana M. Doroshenko[2], Anna S. Portyanko[2], Alexey V. Klemper[3], Maria N. Povydysh[3]

[1] Educational institution "Belarusian State Medical University". 3, Dzerzhinsky Avenue, Minsk, 220083, Republic of Belarus
[2] N. N. Alexandrov national cancer centre of Belarus. 66, Novodvorsky village council, Lesnoy, Minsk district, 223040, Republic of Belarus
[3] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Raman I. Lukashou. **E-mail:** r_lukashov@mail.ru

ORCID: Raman I. Lukashou – https://orcid.org/0000-0001-5234-6319;
Natalia S. Gurina – https://orcid.org/0009-0009-9150-5728;
Viktoryia A. Tsiarletskaya – https://orcid.org/0009-0000-8848-4617;
Aliaksandr V. Laurouski – https://orcid.org/0009-0009-2730-5836;
Tatiana M. Doroshenko – https://orcid.org/0000-0002-8751-421X;
Anna S. Portyanko – https://orcid.org/0000-0003-2399-117X;
Alexey V. Klemper – https://orcid.org/0000-0003-2995-7570;
Maria N. Povydysh – https://orcid.org/0000-0002-7768-9059.

Received: 18.11.2024 **Accepted:** 26.12.2024 **Published:** 27.12.2024

Abstract

Introduction. The search for new antitumor agents among plants of local flora is one of the options for expanding the existing list of chemotherapeutic drugs. A promising source of such agents may be an invasive and weedy species for the territory of the Republic of Belarus and the Russian Federation – *Heracleum Sosnowskyi*. This species contains coumarins, for which antitumor properties have been established, so *Heracleum Sosnowskyi* can be considered a promising raw material source of these biologically active substances.

Aim. To analyze the cytostatic effect of extracts from the herb, inflorescences and roots of *Heracleum Sosnowskyi* on tumor cell cultures *in vitro*.

Materials and methods. The object of the study was air-dried herbs and inflorescences harvested during the flowering period and roots harvested during the dying off period of the above-ground part of *Heracleum Sosnowskyi*. Aqueous-alcoholic extracts were obtained, from which the solvent was distilled off, the resulting dry residue was dissolved in phosphate-salt buffer pH 7.4. Identification and quantification of coumarins were carried out by high performance liquid chromatography. Antitumor (cytostatic) effect in vitro was studied on the following cell cultures: lung carcinoma A549, prostate adenocarcinoma PC-3, skin melanoma MeWo, cervical adenocarcinoma Hela and immortalized foreskin fibroblasts BjhTERT. Cell viability was assessed under MTT test conditions on a flatbed spectrophotometer. Metabolic activity was monitored using 4,5-dimethylthiazolyl-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide. Negative control (buffer), cell growth control, positive control (doxorubicin) and test samples were formed.

Results and discussion. Extracts from the herb of *Heracleum Sosnowskyi* showed a statistically significant cytostatic effect on the tumor cell lines A549, PC-3, cervical adenocarcinoma Hela and MeWo. Extracts from roots and inflorescences showed a statistically significant cytostatic effect on the cell lines Hela and MeWo. The cytostatic effect depended on the concentration of coumarins in terms of xanthotoxin. Extracts from the herb had a cytostatic effect on normal BjhTERT cells; roots and inflorescences did not significantly affect their growth. The cytostatic effect of extracts from *Heracleum Sosnowskyi* herb on A549 and PC-3 cell lines was superior to the effect of doxorubicin, on MeWo and BjhTERT cell lines it was comparable to that of doxorubicin. When comparing semi-effective concentrations, it was found that all studied extracts caused growth suppression at lower concentrations, i.e. they had higher activity compared to doxorubicin. Extracts from herb more strongly inhibit the growth of A549 cells; Extracts from roots and inflorescences more strongly inhibit the growth of Hela cells.
Conclusion. Herb, roots and inflorescences of *Heracleum Sosnowskyi* have a pronounced cytostatic effect in vitro, which makes it expedient to further study this plant within the framework of coumarins isolation and establishment of mechanisms of influence on the growth of tumor cells in comparison with normal cells.

Keywords: *Heracleum Sosnowskyi*, cytostatic effect, herb, roots, inflorescences, coumarins, tumor cell lines, dose-dependent effect

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

Contribution of the authors. Raman I. Lukashou – processing and presentation of experimental data. Natalia S. Gurina – planning of phytochemical experiment, methodological assistance. Victoryia A. Tsiarletskaya – statistical processing of results, preparation of samples for cell experiments. Alexandr V. Laurouski – harvesting of raw materials, preparation of extracts and solutions. Tatiana M. Doroshenko – execution of experiment on cells. Anna S. Portyanko – planning of cell experiment, methodological assistance. Alexey V. Klemper – harvesting of raw materials, methodological assistance. Maria N. Povydysh – discussion of results, development of research concept.

Funding. Performed within the framework of the assignment "To evaluate cytotoxic properties and in vitro bioavailability of individual biologically active substances and total phyto- and mycoextracts in tumor cell cultures" [program "Chemical processes, reagents and technologies, bioregulators and bioorgchemistry", subprogram "Synthesis and directed modification of regulators of bioprocesses (Bioregulators)"].

For citation: Lukashou R. I., Gurina N. S., Tsiarletskaya V. A., Laurouski A. V., Doroshenko T. M., Portyanko A. S., Klemper A. V., Povydysh M. N. Cytostatic effect of extracts from *Heracleum Sosnowskyi*. *Drug development & registration*. 2025;14(1):39–53. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1978

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение заболеваний, вызванных опухолевым перерождением клеток, и устойчивость перерожденных клеток к химиотерапевтическим лекарственным препаратам актуализирует поиск новых источников противоопухолевых лекарственных средств[1] [1]. В открытии новых противоопухолевых лекарственных средств значимое место занимают растительные источники [2]. Однако, помимо традиционных таксанов, алкалоидов, кампотецинов, подофиллоксинов, последнее время привлекают внимание новые классы природных соединений – терпеноидной и фенольной природы [3, 4]. Интерес среди них вызывают фенольные соединения, которые способны участвовать в окислительно-восстановительных процессах, в том числе подавлять свободнорадикальное окисление [5]. Среди данной группы биологически активных веществ (БАВ) особое место занимают кумарины, которые в последние десятилетия широко исследуют на предмет наличия и механизмов реализации противоопухолевых свойств [6–9].

Среди растений, содержащих кумарины, особое место занимает инвазивный для территории Республики Беларусь и Российской Федерации борщевик Сосновского, рассматриваемый как злостный сорняк, с которым необходимо бороться [10]. Однако высокое содержание кумаринов в различных органах борщевика Сосновского делает его перспективным источником этих БАВ, основными кумаринами являются умбеллиферон, ксантотаксин и бергаптен [11–15].

[1] Глобальное бремя онкологических заболеваний растет параллельно с ростом потребности в услугах. Доступно по: https://www.who.int/ru/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services. Ссылка активна на 18.11.2024.

Противоопухолевые свойства данного вида растений практически не изучены, имеются некоторые данные о подобных свойствах его кумаринов. Кумарин и умбеллиферон ингибируют рост злокачественных опухолевых клеточных линий человека: A549, ACHN, Caki-2, Dakiki, HS-Sultan, H727, HCT-15, HL-60, K562, LNCaP, PC-3, Du 145 COLO-232, MCF-7 и RP-1788. Ингибирование было дозозависимым, зависело от времени экспозиции, однако было обратимым при удалении клеток из среды, содержащей кумарины [16]. Изучена также противоопухолевая активность умбеллиферона на онкоген-трансформированных фибробластах мыши. Происходит обратимое ингибирование ras- и myc-индуцированных неопластических свойств в трансформированных фибробластах путем селективного понижения уровней ретровирусной РНК. Однако эти изменения в характеристиках роста клеток различных онкоген-трансформируемых мышиных фибробластов были временными, так как удаление умбеллиферона из культур привело к повторному появлению преобразованных свойств этих клеток в течение 6 дней [17].

Кумарин и умбеллиферон подавляли рост опухоли саркомы-180 у мышей и увеличивали время выживаемости опухолевых животных. Лечение кумарином повысило активность миграции макрофагов при наличии и отсутствии липополисахаридов и увеличило высвобождение оксида азота. *In vitro* кумарины индуцировали интерлейкин-12 в макрофагах мыши и аддитивно увеличивали его высвобождение, вызванное липополисахаридами [18].

Изучены генотоксические эффекты борщевика Сосновского в отношении *Allium cepa*. Корни растения обрабатывали соком борщевика различной концентрации в течение 96 ч без попадания солнечного и прямого света. Митотический индекс был значительно снижен. Образование микроядер при ядерном бутонировании было обнаружено при концентрациях 100 мл l^{-1} и 300 мл l^{-1}. Общая частота возникновения митотических аномалий (хромосомное отставание), хромосомных аберраций (осколков, мостов) и микроядер значительно увеличилась при концентрациях 10–300 мл l^{-1} сока. В тесте с использованием *Allium cepa* степень токсического, мутагенного эффекта напрямую зависит от концентрации экстрактов [19, 20].

Таким образом, согласно литературным данным, высокое содержание кумаринов, а также перспективность их использования как противоопухолевых агентов делает борщевик Сосновского перспективным объектом для изучения противоопухолевых (цитотоксических) свойств.

Цель исследования – изучить цитостатический эффект извлечений из травы, соцветий и корней борщевика Сосновского на культурах опухолевых клеток *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили трава и соцветия борщевика Сосновского, заготовленные в фазу массового цветения в июне 2022 г., а также корни растения, собранные после отмирания надземной части в октябре 2022 г. Заготовку произвели в местах естественного произрастания растения в д. Новое Поле Минского района с соблюдением техники безопасности, в том числе с использованием респиратора и при отсутствии открытых участков тела. Сырье подвергли воздушно-теневой сушке.

Экстракцию выполняли следующим образом: к точной навеске массой около 1,0 г измельченного до 500 мкм и менее сырья прибавляли 10,0 мл 70%-го спирта этилового (по объему), экстракцию проводили в круглодонной колбе с обратным холодильником в течение 2 ч при температуре 60 °С на водяной бане. После чего охлаждали до комнатной температуры, фильтровали, при необходимости доводили до нужного объема и использовали на всех последующих этапах исследования.

Для проведения исследований на клетках использовали следующие клеточные линии: опухолевые клетки A549 (карцинома легкого), PC-3 (аденокарцинома предстательной железы), MeWo (меланома кожи), Hela (аденокарцинома шейки матки) и нормальные клетки BjhTERT (иммортализованные фибробласты крайней плоти).

Для исследований на клетках полученный фильтрат упаривали в роторном испарителе RV 3 eco с баней HB eco (IKA, Германия) при температуре 60–80 °С до состояния сухого остатка. Полученный остаток растворяли в аналогичном объеме фосфатного буферного раствора (ФБР), для приготовления 1,0 л которого использовали 8,00 г NaCl; 0,20 г KCl; 1,44 г Na_2HPO_4; 0,24 г KH_2PO_4 (все реактивы квалификации «ч.д.а.», ОДО «ХимХром»), растворяли в 800 мл воды очищенной и доводили pH до 7,4 на иономере Hanna (HANNA Instruments) кислотой хлористоводородной или натрия гидроксидом, затем доводили водой очищенной до 1,0 л.

В растворе, полученном после растворения сухих остатков, определяли содержание кумаринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно методике [11]. Идентификацию кумаринов проводили путем сопоставления времен удержания и спектров поглощения веществ в извлечениях с данными, полученными на стандартных образцах Sigma-Aldrich: умбеллифероне (кат. № 54826); бергаптене (кат. № GL5991|); ксантотоксине (кат. № 56448). Расчет количественного содержания обнаруженных кумаринов выполнили методом одного стандарта. При расчете концентрации провели пересчет суммарного содержания кумаринов на доминирующий ксантотоксин.

Клетки изучаемых линий рассевали в лунки 96-луночного планшета на адгезию так, чтобы на следующий день конфлюэнтность составляла 20–25 % (около 5000 клеток на лунку). Спустя одни сутки меняли на модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM) в каждом варианте опыта и добавляли растворенные в ФБР сухие остатки (исследуемые растворы). Предварительно их пропускали через мембранный фильтр 0,2 μ. Клетки инкубировали 72 ч в CO_2-инкубаторе (5 %, +37 °C) (NU-5100E, NuAire, США), затем удаляли среду во всех лунках. Промывали лунки фосфатным забуференным солевым раствором Дульбекко, содержащим 0,2 % человеческого сывороточного альбумина, так, чтобы не повредить монослой. Это необходимо для удаления остатков исследуемых растворов и среды, которые могут повлиять на результат МТТ-теста. Затем добавляли в каждую лунку 10%-й раствор МТТ (*3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5 мг/мл*) на DMEM без фенолового красного. После 4 ч инкубации при 5%-м CO_2 и температуре +37 °C среду отбирали и в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора диметилсульфоксида. Далее инкубировали 10 мин на шейкере при комнатной температуре. Оптическую плотность полученного раствора формазана в диметилсульфоксиде измеряют на планшетном спектрофотометре при длине волны 492 нм ($A_{исслед.}$). Также формировали отрицательный контроль (A_0), где в лунки вносили ФБР в эквивалентном объеме, и положительный контроль ($A_{исслед.}$), где в лунки вносили лекарственный препарат сравнения – доксорубицин, используемый для лечения широкого спектра опухолевых заболеваний. Также формировали контроль роста клеток без добавления исследуемых растворов, лекарственного препарата сравнения и ФБР.

Расчет процента подавления роста опухолевых или нормальных клеток (ППРО(Н)К) произвели по формуле:

$$ППРО(Н)К = (A_0 - A_{исслед.})/A_0 \cdot 100\ \%,$$

где A_0 – оптическая плотность в лунках отрицательного контроля; $A_{исслед.}$ – оптическая плотность в лунках с исследуемыми растворами или доксорубицином.

Статистическую обработку проводили при помощи компьютерной программы STATISTICA 12.6. Каждое испытание проводили три раза ($n = 3$). Результаты представляли в виде:

$$\bar{X} \pm \Delta_{\bar{x}}.$$

где $\bar{X}$ – среднее значение выборки; $\Delta_{\bar{x}}$ – полуширина доверительного интервала средней величины.

Для оценки значимости отличий использовали критерии Манна – Уитни и Краскелла – Уоллиса. Для оценки влияния концентрации на ППРО(Н)К использовали дисперсионный анализ. Значения статистически значимо различались при p-значении (p) < 0,05. Для вывода уравнений зависимости ППРО(Н)К от концентрации использовали регрессионный анализ. Подходящими для расчета считали уравнения с максимальным значением коэффициента аппроксимации (R^2). Сравнение цитостатического эффекта (эффективности) и активности извлечений и доксорубицина провели с использованием E_{max} (максимальный ППРО(Н)К) и EC_{50} (полуэффективная концентрация, вызывающая эффект, равный 50 % от максимального), которую получали путем расчета, исходя из полученных уравнений зависимостей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено, что добавление ФБР значимо не влияло на подавление роста всех изучаемых линий опухолевых клеток (ППРОК составил от 6,1 до 13,0 % для отрицательного контроля), однако при внесении в объемах более 20 мкл подавлялся рост нормальных клеток (ППРНК составил от 20,8 до 26,5 % для отрицательного контроля), что было учтено при последующем расчете ППРНК.

Внесение в культуру исследуемых растворов, полученных из травы борщевика Сосновского, и доксорубицина вызывало статистически значимое подавление роста опухолевых клеток в 2,3–5,5 ($p = 3{,}49 \cdot 10^{-3} - 1{,}43 \cdot 10^{-2}$) и 3,0–4,2 раза ($p = 1{,}85 \cdot 10^{-5} - 5{,}39 \cdot 10^{-4}$) соответственно и нормальных клеток в среднем в 2,3 ($p = 2{,}49 \cdot 10^{-3}$) и 3,0 раза ($p = 9{,}95 \cdot 10^{-5}$) соответственно во всех изученных концентрациях по сравнению с отрицательным контролем, что указывало на выраженный цитостатический эффект.

Результаты оценки подавления роста клеток карциномы легкого A549, аденокарциномы предстательной железы PC-3, меланомы кожи MeWo, аденокарциномы шейки матки Hela и иммортализованных фибробластов крайней плоти BjhTERT кумаринами травы борщевика Сосновского и доксорубицином в зависимости от концентрации представлены на рисунках 1–9.

Подавление роста клеток карциномы легкого A549 (рисунки 1 и 2), аденокарциномы предстательной железы PC-3 (рисунки 3 и 4), меланомы кожи MeWo (рисунки 5 и 6), аденокарциномы шейки матки Hela (рисунок 7) и иммортализованных фибробластов крайней плоти BjhTERT (рисунки 8 и 9) кумаринами травы борщевика Сосновского ($p = 0{,}040$; $F = 7{,}27$; $F_{крит.} = 6{,}59$; $p = 2{,}50 \cdot 10^{-3}$; $F = 34{,}7$; $F_{крит.} = 6{,}59$; $p = 0{,}040$; $F = 7{,}27$; $F_{крит.} = 6{,}59$; $p = 2{,}23 \cdot 10^{-2}$; $F = 6{,}27$; $F_{крит.} = 4{,}38$; $p = 0{,}015$; $F = 50{,}29$; $F_{крит.} = 4{,}38$; $p = 0{,}030$; $F = 45{,}02$; $F_{крит.} = 4{,}38$ соответственно) и доксорубицином ($p = 3{,}00 \cdot 10^{-4}$; $F = 7{,}27$; $F_{крит.} = 5{,}99$; $p = 2{,}10 \cdot 10^{-3}$; $F = 26{,}7$; $F_{крит.} = 5{,}99$; $p = 1{,}68 \cdot 10^{-4}$; $F = 337$; $F_{крит.} = 5{,}99$; $p = 3{,}66 \cdot 10^{-6}$; $F = 258$; $F_{крит.} = 5{,}99$ соответственно) значимо зависело от концентрации, что говорило о наличии дозозависимого эффекта.

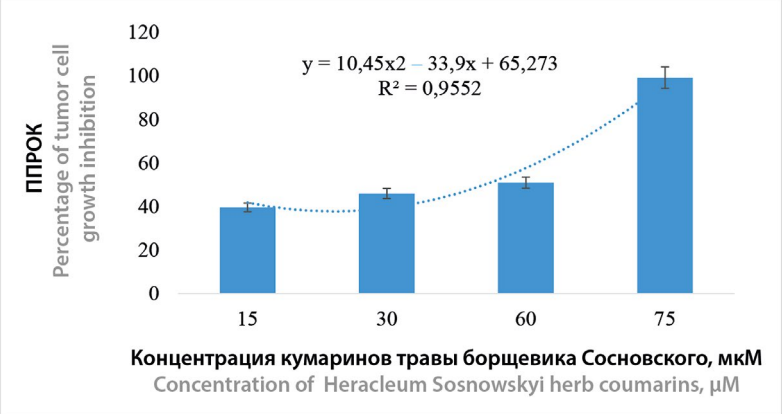


Рисунок 1. **Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток карциномы легкого А549 от концентрации кумаринов травы борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин**

Figure 1. **Dependence of the tumor cell growth inhibition percentage of lung carcinoma A549 on the Heracleum Sosnowskyi herb coumarins concentration in terms of xanthotoxin**

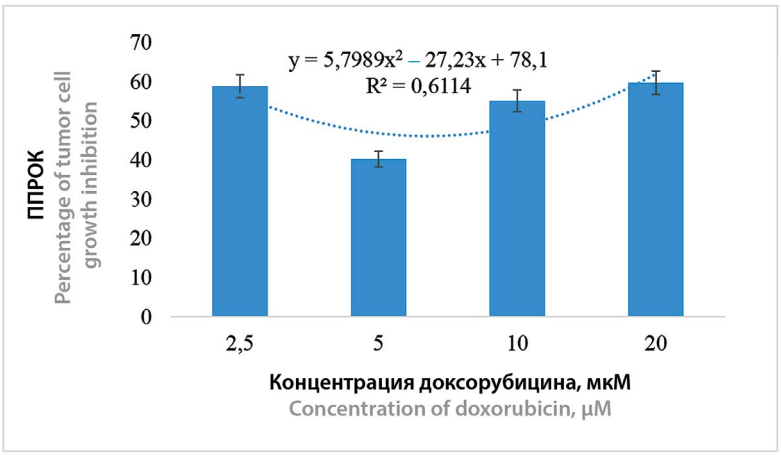


Рисунок 2. **Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток карциномы легкого А549 от концентрации доксорубицина**

Figure 2. **Dependence of tumor cell growth inhibition percentage of lung carcinoma A549 on doxorubicin concentration**

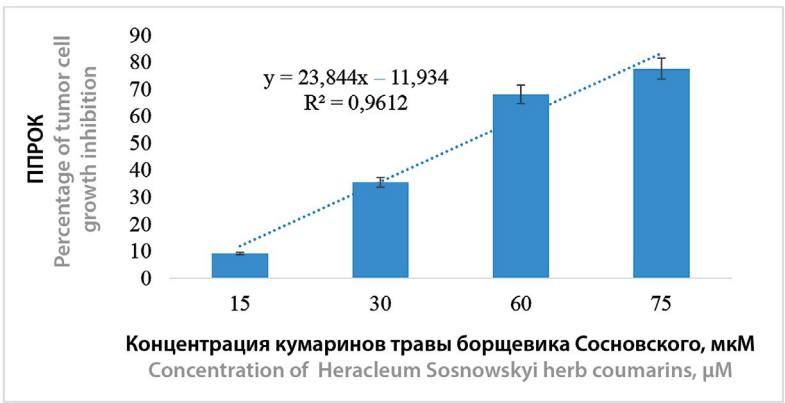


Рисунок 3. **Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток аденокарциномы предстательной железы РС-3 от концентрации кумаринов травы борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин**

Figure 3. **Dependence of the tumor cell growth inhibition percentage of prostate adenocarcinoma PC-3 on the Heracleum Sosnowskyi herb coumarins concentration in terms of xanthotoxin**

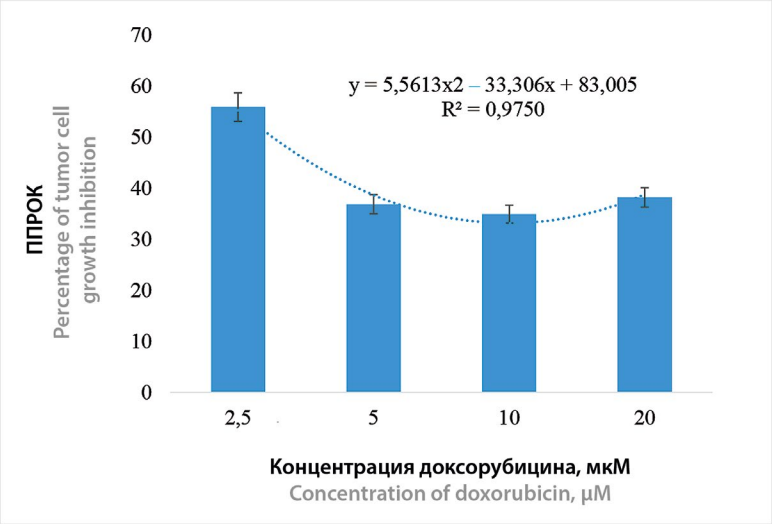


Рисунок 4. Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток аденокарциномы предстательной железы PC-3 от концентрации доксорубицина

Figure 4. Dependence of tumor cell growth inhibition percentage of prostate adenocarcinoma PC-3 on doxorubicin concentration

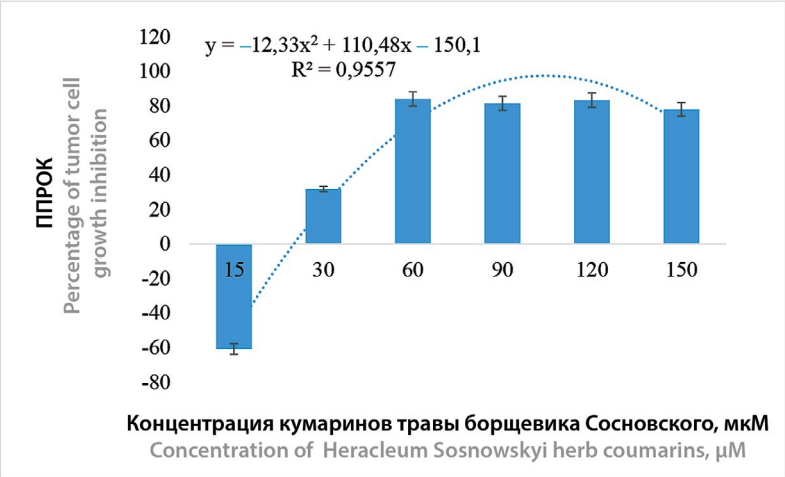


Рисунок 5. Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток меланомы кожи MeWo от концентрации кумаринов травы борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин

Figure 5. Dependence skin of tumor cell growth inhibition percentage of skin melanoma MeWo on the Heracleum Sosnowskyi herb coumarins concentration in terms of xanthotoxin

Практически во всех случаях (кроме действия кумаринов на клетки PC-3, где выявлена прямая линейная зависимость) наблюдали аппроксимацию зависимости эффекта от концентрации полиномом второй степени. При действии кумаринов на клетки карциномы легкого A549 в концентрациях от 15 до 60 мкМ наблюдали плавный рост цитостатического эффекта с резким, практически в 2 раза, увеличением к 75 мкМ.

В концентрации 15 мкМ кумаринов травы в отношении клеток меланомы кожи MeWo наблюдали усиление роста клеток (инверсия цитостатического эффекта). Начиная с концентрации 30 мкМ происходило увеличение подавления роста с максимумом при 60 мкМ (в 2,6 раза более, чем при 30 мкМ). В диапазоне от 75 мкМ до 115 мкМ происходило незначительное снижение от 3,1 до 4,3 %. В отношении клеток аденокарциномы шейки матки Hela выявлено, что в концентрациях 90–150 мкМ наблюдалось плато максимального эффекта.

Максимум цитостатического действия на иммортализованные фибробласты крайней плоти BjhTERT

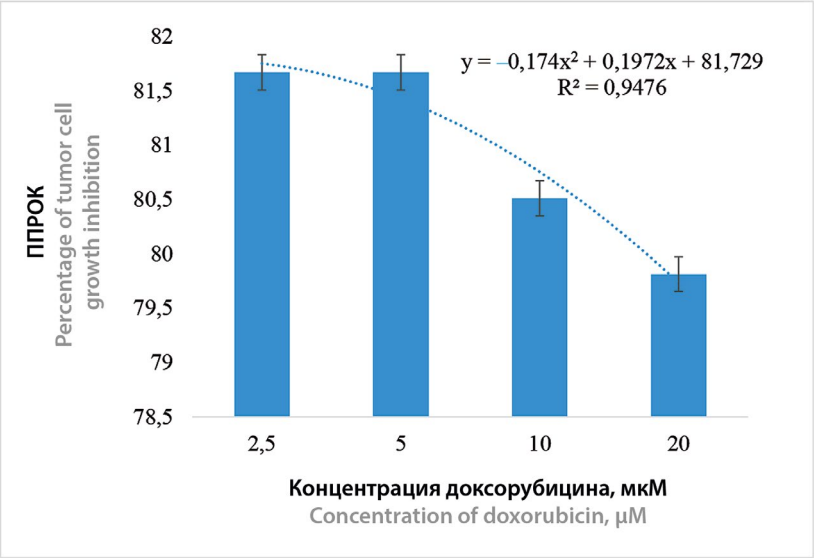


Рисунок 6. **Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток меланомы кожи MeWo от концентрации доксорубицина**

Figure 6. **Dependence of the tumor cell growth inhibition percentage of skin melanoma MeWo tumor cells on doxorubicin concentration**

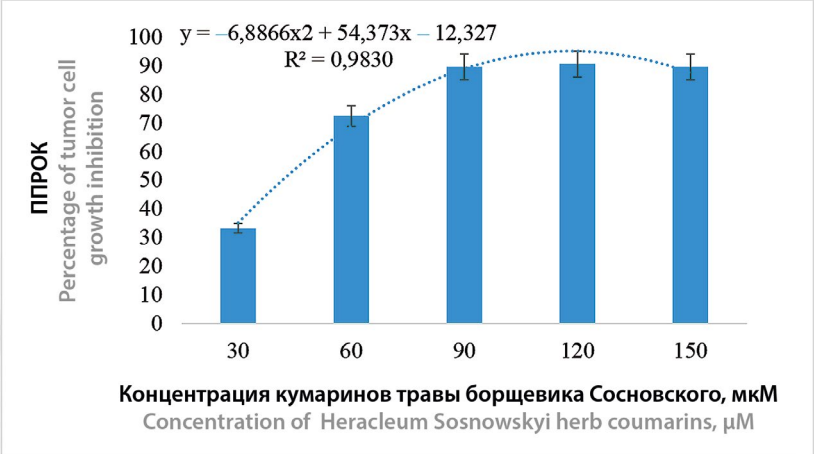


Рисунок 7. **Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток аденокарциномы шейки матки Hela от концентрации кумаринов травы борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин**

Figure 7. **Dependence of the tumor cell growth inhibition percentage of cervical adenocarcinoma tumor Hela on the Heracleum Sosnowskyi herb coumarins concentration in terms of xanthotoxin**

наблюдали при концентрации 30 мкм, дальнейшее увеличение концентрации снижало эффект от 8,3 до 21,4 %.

Максимальный цитостатический эффект кумаринов травы борщевика Сосновского в отношении линий клеток A549 и PC-3 превосходил аналогичный параметр доксорубицина в 1,7 ($p = 2{,}01 \cdot 10^{-2}$) и 1,6 ($1{,}95 \cdot 10^{-2}$) раза соответственно. Максимальные эффекты в отношении линий клеток MeWo и BjhTERT значимо не различались ($p = 0{,}29$ и 0,15 соответственно) (таблица 1).

Полуэффективные концентрации для кумаринов значимо ниже: в диапазоне от 17,4 % ($p = 0{,}038$) до 5,5 раза ($p = 2{,}03 \cdot 10^{-4}$) – в сравнении с доксорубицином (см. таблицу 1). Таким образом, по активности кумарины травы борщевика Сосновского превосходили доксорубицин на всех изученных линиях клеток.

Цитостатическое действие доксорубицина на все изучаемые клеточные линии одинаково ($p = 0{,}94$; $F = 0{,}12$; $F_{крит.} = 3{,}49$) в отличие от кумаринов травы борщевика Сосновского ($p = 1{,}04 \cdot 10^{-2}$; $F = 4{,}56$; $F_{крит.} = 2{,}96$). Более выраженное цитостатическое действие

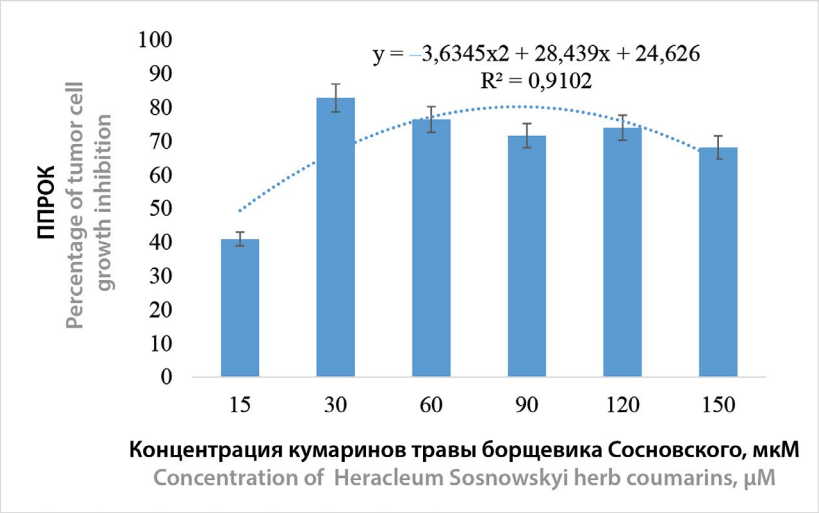


Рисунок 8. **Зависимость процента подавления роста клеток иммортализованных фибробластов крайней плоти BjhTERT от концентрации кумаринов травы борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин**

Figure 8. **Dependence of the cell growth inhibition percentage of immortalized foreskin fibroblasts BjhTERT on the Heracleum Sosnowskyi herb coumarins concentration in terms of xanthotoxin**

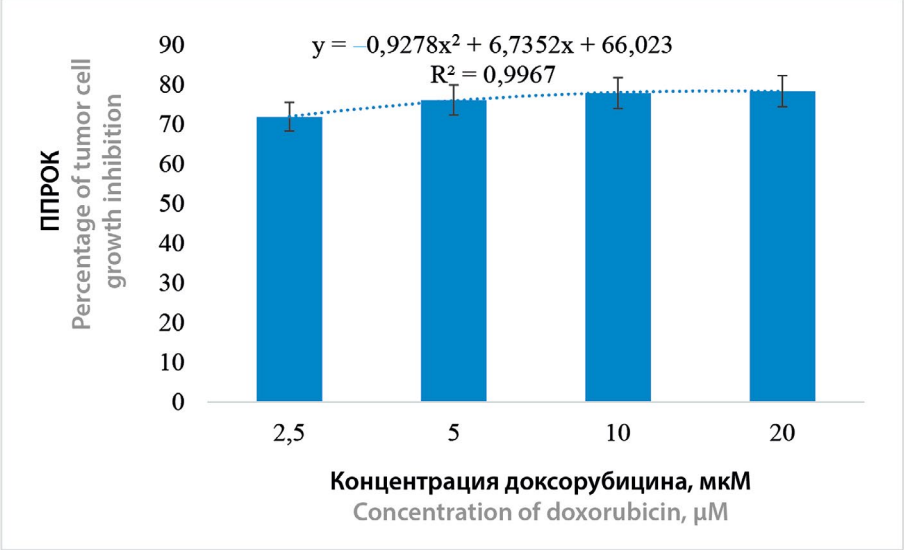


Рисунок 9. **Зависимость процента подавления роста клеток иммортализованных фибробластов крайней плоти BjhTERT от концентрации доксорубицина**

Figure 9. **Dependence of the cell growth inhibition percentage of immortalized foreskin fibroblasts BjhTERT on doxorubicin concentration**

кумаринов травы среди изучаемых клеток определено в отношении линии карциномы легкого A549.

Внесение в культуру исследуемых растворов, полученных из корней и соцветий борщевика Сосновского, в концентрациях от 80 мкМ до 200 мкМ вызывало статистически значимое подавление роста опухолевых клеток в 2,0–4,0 ($p = 1{,}25 \cdot 10^{-3} – 2{,}88 \cdot 10^{-2}$) и 2,0–2,3 раза ($p = 4{,}00 \cdot 10^{-3} – 3{,}01 \cdot 10^{-2}$) соответственно и во всех изученных концентрациях [за исключением 40 мкМ, которая усиливала рост в среднем в 2,3 раза, и 120–200 мкМ кумаринов корней, которые подавляли рост в 2,2–4,4 раза ($p = 2{,}59 \cdot 10^{-4} – 4{,}06 \cdot 10^{-3}$)] значимо не влияло на рост нормальных клеток по сравнению с отрицательным контролем, что указывало на цитостатический эффект в отношении опухолевых клеток без подавления роста нормальных, за исключением кумаринов корней в высоких концентрациях.

Таблица 1. Максимальные значения процента подавления роста опухолевых (нормальных) клеток (E_{max}, %) и полуэффективные концентрации (EC_{50}) кумаринов травы борщевика Сосновского и доксорубицина

Table 1. Maximum values of the tumor (normal) cells growth inhibition percentage (E_{max}, %) and semi-effective concentrations (EC_{50}) of Heracleum Sosnowskyi herb coumarins and doxorubicin

Клеточная линия *Cell line*	E_{max}, %		EC_{50}, мкмоль/л	
	Кумарины травы *Herb coumarins*	Доксорубицин *Doxorubicin*	Кумарины травы *Herb coumarins*	Доксорубицин *Doxorubicin*
A549	99,1 ± 2,4	59,8 ± 2,4	2,9 ± 0,4	3,4 ± 0,6
PC-3	91,1 ± 2,8	55,9 ± 1,9	1,4 ± 0,2	4,0 ± 0,7
MeWo	83,9 ± 1,9	81,7 ± 2,0	10,7 ± 0,6	15,9 ± 0,9
Hela	90,5 ± 2,6	–	7,7 ± 0,8	–
BjhTERT	82,8 ± 4,6	78,2 ± 2,8	7,1 ± 0,6	39,1 ± 1,2

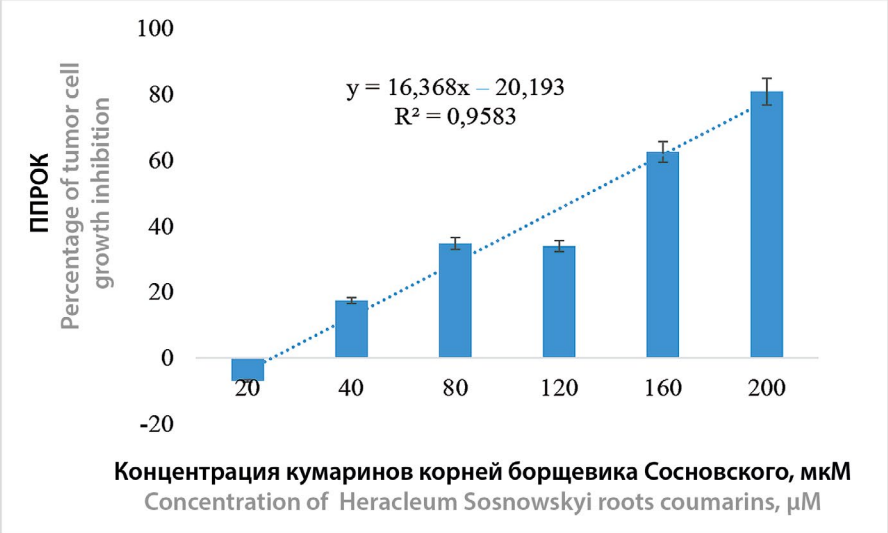


Рисунок 10. Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток аденокарциномы шейки матки Hela от концентрации кумаринов корней борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин

Figure 10. Dependence of the tumor cell growth inhibition percentage of cervical adenocarcinoma Hela on the Heracleum Sosnowskyi roots coumarins concentration of in terms of xanthotoxin

Результаты оценки подавления роста клеток аденокарциномы шейки матки Hela, меланомы кожи MeWo и иммортализованных фибробластов крайней плоти BjhTERT кумаринами корней и соцветий борщевика Сосновского в зависимости от концентрации представлены на рисунках 10–15.

Доксорубицин в концентрации 20 мкМ подавляет рост клеток аденокарциномы шейки матки Hela в диапазоне от 86,5 до 96,7 %.

Подавление роста клеток аденокарциномы шейки матки Hela (рисунки 10 и 11) и меланомы кожи MeWo (рисунки 12 и13) кумаринами корней (p = 0,032; F = 7,90; $F_{крит.}$ = 5,99; p = 0,020; F = 9,12; $F_{крит.}$ = 5,99 соответственно) и соцветий борщевика Сосновского (p = 0,038; F = 6,67; $F_{крит.}$ = 5,99; p = 0,035; F = 7,00; $F_{крит.}$ = 5,99 соответственно) значимо зависело от концентрации, что говорило о наличии дозозависимого эффекта. Для кумаринов корней и соцветий характерно, как правило, увеличение цитостатического эффекта с ростом концентрации с максимумом в области 160–200 мкМ (прямая линейная зависимость). При этом в концентрациях 20 мкМ и 40 мкМ наблюдали некоторое усиление роста опухолевых клеток.

Максимальный цитостатический эффект кумаринов корней и соцветий борщевика Сосновского на линии клеток MeWo уступал доксорубицину на 20,5 % (p = 0,043) и 79,6 % (p = 0,016) соответственно. Полуэффективные концентрации для кумаринов корней и соцветий значимо – в 4,3 ($p = 2{,}04 \cdot 10^{-4}$) и 3,9 раза ($p = 1{,}01 \cdot 10^{-4}$) соответственно – ниже, чем у доксорубицина (таблица 2). Таким образом, по активности кумарины корней и соцветий борщевика Сосновского превосходили доксорубицин.

Более выраженное цитостатическое действие кумаринов корней и соцветий среди изучаемых клеток определено в отношении линии аденокарциномы шейки матки Hela.

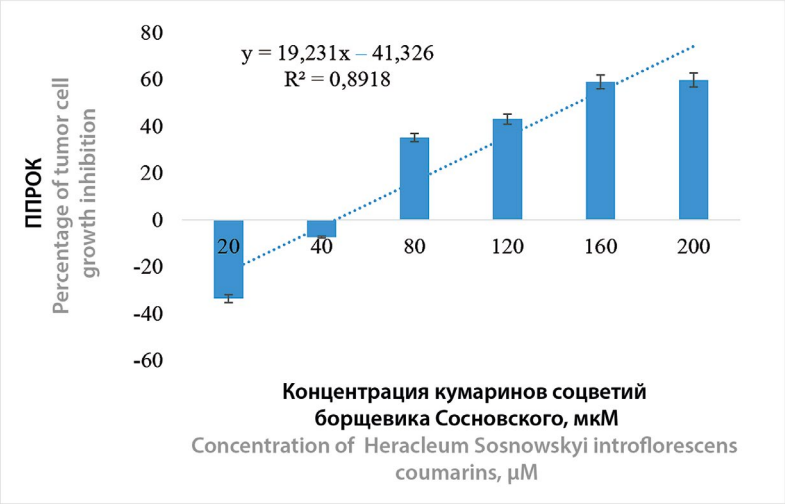


Рисунок 11. **Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток аденокарциномы шейки матки Hela от концентрации кумаринов соцветий борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин**

Figure 11. **Dependence of the tumor cells growth inhibition percentage of cervical adenocarcinoma Hela on the Heracleum Sosnowskyi introflorescens coumarins concentration of in terms of xanthotoxin**

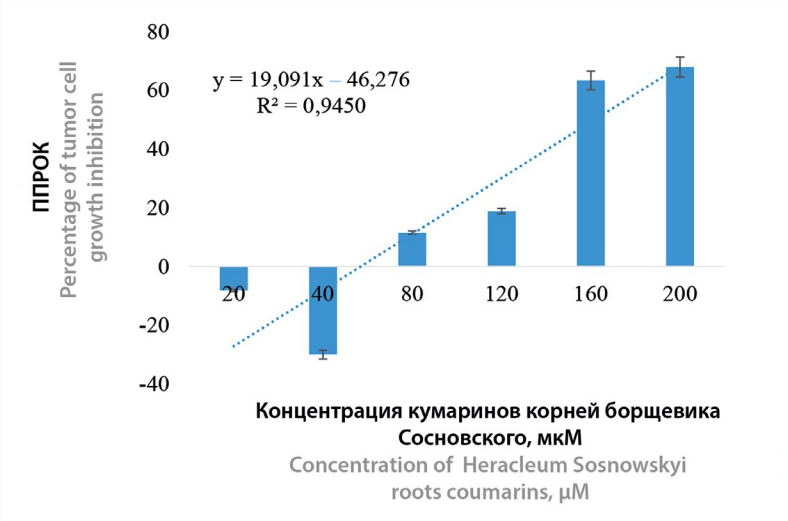


Рисунок 12. **Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток меланомы кожи MeWo от концентрации кумаринов корней борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин**

Figure 12. **Dependence of the tumor cells growth inhibition percentage of skin melanoma MeWo on the Heracleum Sosnowskyi roots coumarins concentration of in terms of xanthotoxin**

Таблица 2. **Максимальные значения процента подавления роста опухолевых клеток (E_{max}, %) и полуэффективные концентрации (EC_{50}) кумаринов корней и соцветий борщевика Сосновского**

Table 2. **Maximum values of tumor cell growth inhibition percentage (E_{max}, %) and semi-effective concentrations (EC_{50}) of Heracleum Sosnowskyi roots and inflorescences coumarins**

Клеточная линия *Cell line*	E_{max}, %		EC_{50}, мкмоль/л	
	Кумарины корней *Roots coumarins*	Кумарины соцветий *Introflorescens coumarins*	Кумарины корней *Roots coumarins*	Кумарины соцветий *Introflorescens coumarins*
Hela	80,7 ± 1,2	59,8 ± 1,6	3,7 ± 0,6	4,2 ± 0,4
MeWo	67,8 ± 2,0	45,5 ± 1,9	3,7 ± 0,8	4,2 ± 0,3

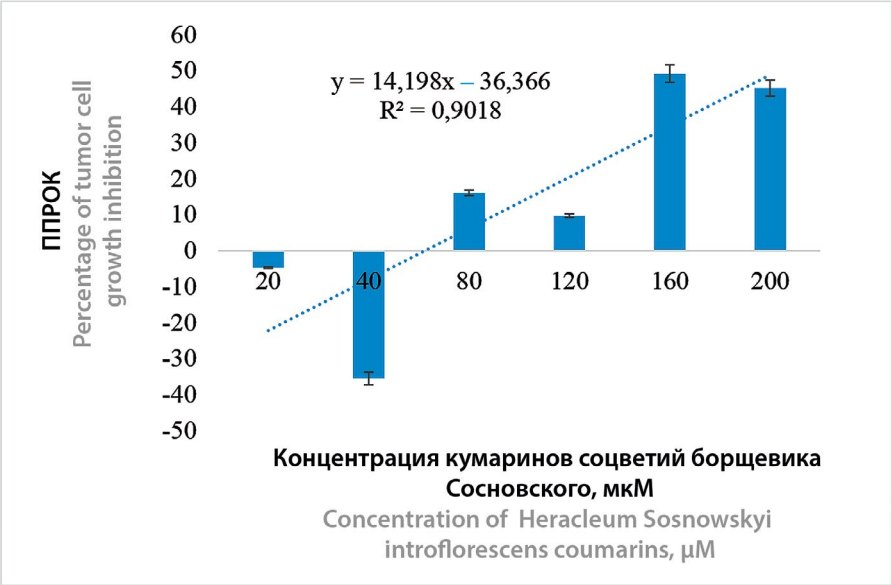


Рисунок 13. **Зависимость процента подавления роста опухолевых клеток меланомы кожи MeWo от концентрации кумаринов соцветий борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин**

Figure 13. **Dependence of the tumor cells growth inhibition percentage of skin melanoma MeWo on the Heracleum Sosnowskyi introflorescens coumarins concentration of in terms of xanthotoxin**

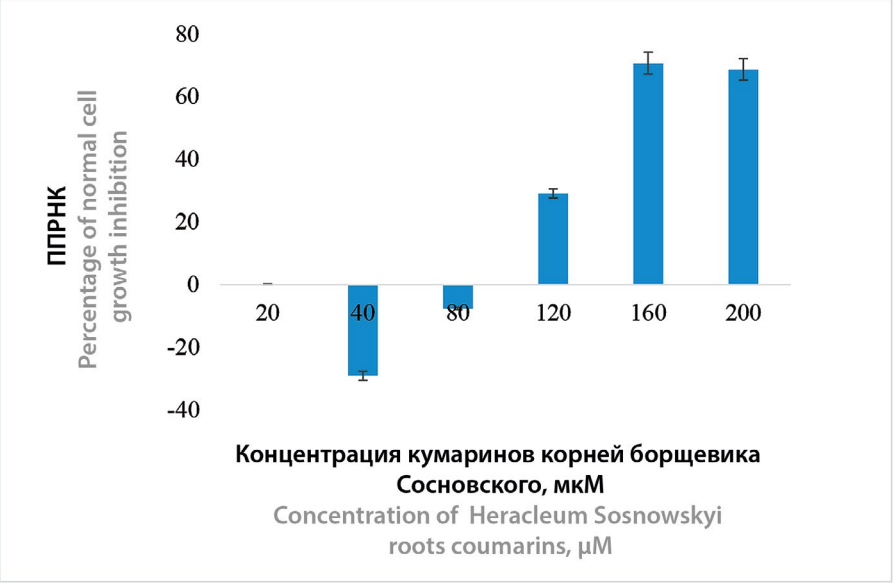


Рисунок 14. **Зависимость процента подавления роста клеток иммортализованных фибробластов крайней плоти BjhTERT от концентрации кумаринов корней борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин**

Figure 14. **Dependence of the cell growth inhibition percentage of immortalized foreskin fibroblasts BjhTERT on the Heracleum Sosnowskyi roots coumarins concentration of in terms of xanthotoxin**

Цитостатический эффект кумаринов травы в отношении клеток линий MeWo и Hela превосходил на 23,7 % ($p = 0,029$), 84,4 % ($p = 0,018$), корней и соцветий – на 11,2 % ($p = 0,060$), 51,3 % ($p = 0,027$) соответственно. Полуэффективные концентрации кумаринов корней и соцветий в 2,8 раза ниже, чем для травы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Водно-спиртовые извлечения травы борщевика Сосновского, содержащие кумарины в пересчете на ксантотоксин, проявляли статистически значимый цитостатический эффект в отношении линий

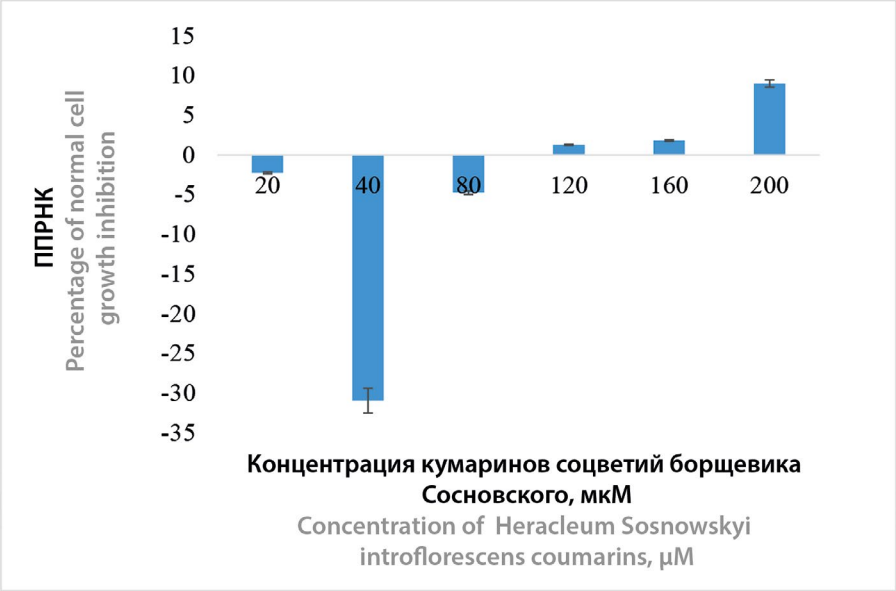


Рисунок 15. Зависимость процента подавления роста клеток иммортализованных фибробластов крайней плоти BjhTERT от концентрации соцветий травы борщевика Сосновского в пересчете на ксантотоксин

Figure 15. Dependence of the cell growth inhibition percentage of immortalized foreskin fibroblasts BjhTERT on the Heracleum Sosnowskyi introflorescens coumarins concentration of in terms of xanthotoxin

опухолевых клеток карциномы легкого A549, аденокарциномы предстательной железы PC-3, аденокарциномы шейки матки Hela и меланомы кожи MeWo; корней и соцветий – в отношении клеток аденокарциномы шейки матки Hela и меланомы кожи MeWo. Выявленный цитостатический эффект зависел от концентрации кумаринов. Водно-спиртовые извлечения травы также оказывают цитостатическое действие на нормальные клетки иммортализованные фибробласты крайней плоти BjhTERT в отличие корней и соцветий, которые не влияют на рост этих клеток, за исключением кумаринов корней в высоких концентрациях.

Цитостатический эффект кумаринов травы борщевика Сосновского в отношении клеток линий A549 и PC-3 превосходил, в отношении клеток линий MeWo и BjhTERT сопоставим с доксорубицином; для корней и соцветий эффект на линии MeWo уступал ему. Однако при сравнении полуэффективных концентраций показано, что кумарины травы, корней и соцветий вызывают подавление роста в более низких концентрациях, то есть имеют более высокую активность по сравнению с доксорубицином.

Кумарины травы сильнее подавляют рост клеток линии A549; корней и соцветий – Hela в сравнении с другими изученными линиями. В отношении линий клеток Hela и MeWo трава в сравнении с корнями и соцветиями показывает больший процент подавления роста и меньшую активность, так как имеет более высокую полуэффективную концентрацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова Т. О., Багина У. С. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. Экологические аспекты. *Принципы экологии*. 2012;2(2):4–21. DOI: 10.15393/j1.art.2012.921.
2. Shah U., Shah R., Acharya S., Acharya N. Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2013;11(1):16–23. DOI: 10.1016/S1875-5364(13)60002-3.
3. Zlatnik E. Yu., Sagakyants A. B. Nepomnyashchaya E. M., Zakharova N. A., Ulianova Yu. V. Possibilities of using secondary plant metabolites as antitumor agents *Kazan Medical Journal*. 2024;105(5):813–824. DOI: 10.17816/KMJ634368.
4. Siddiqui A. J., Jahan S., Singh R., Saxena J., Ashraf S. A., Khan A., Choudhary R. K., Balakrishnan S., Badraoui R., Bardakci F., Adnan M. Plants in anticancer drug discovery: from molecular mechanism to chemoprevention. *BioMed Research International*. 2022;2022(1):542548. DOI: 10.1155/2022/5425485.
5. Pan L., Chai H.-B., Kinghorn A. D. Discovery of new anticancer agents from higher plants. *Frontiers in Bioscience*. 2012;4(1):142–156. DOI: 10.2741/257.
6. Wu Y., Xu J., Liu Y., Zeng Y., Wu G. A review on anti-tumor mechanisms of coumarins. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:592853. DOI: 10.3389/fonc.2020.592853.
7. Koley M., Han J., Soloshonok V. A., Mojumder S., Javahershenas R., Makarem A. Latest developments in coumarin-based anticancer agents: mechanism of action and structure-activity relationship studies. *RSC Medicinal Chemistry*. 2024;15(1):10–54. DOI: 10.1039/d3md00511a.

8. Al-Warhi T., Sabt A., Elkaeed E. B., Eldehna W. M. Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: An up-to-date review. *Bioorganic Chemistry*. 2020;103:104163. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104163.
9. Bisi A., Cappadone C., Rampa A., Farruggia G., Sargenti A., Belluti F., Di Martino R. M. C., Malucelli E., Meluzzi A., Iotti S., Gobbi S. Coumarin derivatives as potential antitumor agents: Growth inhibition, apoptosis induction and multidrug resistance reverting activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;127:577–585. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.01.020.
10. Ламан Н. А., Усик А. В. Локализация и состав кумаринов в корнях борщевика сосновского (H*eracleum Sosnowskyi* Manden.). *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2020;65(1):71–75. DOI: 10.29235/1029-8940-2020-65-1-71-75.
11. Статкевич В. С., Лукашов Р. И. Хроматографический анализ кумаринов в органах растений борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.). *Ботаника (исследования): сборник научных трудов*. 2023;52:282–293.
12. Агеев В. П., Шляпкина В. И., Куликов О. А., Заборовский А. В., Тарарина Л. А. Качественный и количественный анализ основных производных псоралена сока борщевика Сосновского. *Фармация*. 2022;71(3):10–17. DOI: 10.29296/25419218-2022-03-02.
13. Копылова Н. А., Ламан Н. А., Прохоров В. Н. Биологически активные соединения в экстрактах тканей борщевика Сосновского (*Heracleum Sosnowskyi* Manden.). *Ботаника (исследования): Сборник научных трудов*. 2014;43:250–259.
14. Bahadori M. B., Dinparast L., Zengin G. The Genus Heracleum: A Comprehensive Review on Its Phytochemistry, Pharmacology, and Ethnobotanical Values as a Useful Herb. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016;15(6):1018–1039. DOI: 10.1111/1541-4337.12222.
15. Hosseinzadeh Z., Ramazani A., Razzaghi-Asl N. Plants of the Genus Heracleum as a Source of Coumarin and Furanocoumarin. *Journal of Chemical Reviews*. 2019;1(2):78–98.
16. Marshall M. E., Kervin K., Benefield C., Umerani A., Albainy-Jenei S., Zhao Q., Khazaeli M. B. Growth-Inhibitory Effects of Coumarin (1,2-Benzopyrone) and 7-Hydroxycoumarin on Human Malignant Cell Lines In Vitro. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1994;120:S3–S10. DOI: 10.1007/BF01377114.
17. Seliger B., Pettersson H. 7-Hydroxycoumarin Inhibits Oncogene-Induced Transformation of Murine Fibroblasts. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1994;120:S23–S27. DOI: 10.1007/BF01377119.
18. Stefanova T. H., Nikolova N. J., Toshkova R. A., Neychev H. O. Antitumor and Immunomodulatory Effect of Coumarin and 7-Hydroxycoumarin Against Sarcoma 180 in Mice. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 2007;6(2):107–115.
19. Pesnya D. S., Romanovsky A. V., Serov D. A., Poddubnaya N Ya. Genotoxic Effects of Heracleum Sosnowskyi in the Allium Cepa Test. *International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*. 2017;70:55–61.
20. Песня Д. С., Серов Д. А., Вакорин С. А., Прохорова И. М. Исследование токсического, митозмодифицирующего и мутагенного действия Борщевика Сосновского. *Ярославский педагогический вестник*. 2011;3(4):50–56.

REFERENCES

1. Volkova T. O., Bagina U. S. Ecological aspects of the multidrug resistance to chemotherapy agents. *Principles of Ecology*. 2012;2(2):4–21. (In Russ.) DOI: 10.15393/j1.art.2012.921.
2. Shah U., Shah R., Acharya S., Acharya N. Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2013;11(1):16–23. DOI: 10.1016/S1875-5364(13)60002-3.
3. Zlatnik E. Yu., Sagakyants A. B. Nepomnyashchaya E. M., Zakharova N. A., Ulianova Yu. V. Possibilities of using secondary plant metabolites as antitumor agents *Kazan Medical Journal*. 2024;105(5):813–824. DOI: 10.17816/KMJ634368.
4. Siddiqui A. J., Jahan S., Singh R., Saxena J., Ashraf S. A., Khan A., Choudhary R. K., Balakrishnan S., Badraoui R., Bardakci F., Adnan M. Plants in anticancer drug discovery: from molecular mechanism to chemoprevention. *BioMed Research International*. 2022;2022(1):542548. DOI: 10.1155/2022/5425485.
5. Pan L., Chai H.-B., Kinghorn A. D. Discovery of new anticancer agents from higher plants. *Frontiers in Bioscience*. 2012;4(1):142–156. DOI: 10.2741/257.
6. Wu Y., Xu J., Liu Y., Zeng Y., Wu G. A review on anti-tumor mechanisms of coumarins. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:592853. DOI: 10.3389/fonc.2020.592853.
7. Koley M., Han J., Soloshonok V. A., Mojumder S., Javahershenas R., Makarem A. Latest developments in coumarin-based anticancer agents: mechanism of action and structure-activity relationship studies. *RSC Medicinal Chemistry*. 2024;15(1):10–54. DOI: 10.1039/d3md00511a.
8. Al-Warhi T., Sabt A., Elkaeed E. B., Eldehna W. M. Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: An up-to-date review. *Bioorganic Chemistry*. 2020;103:104163. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104163.
9. Bisi A., Cappadone C., Rampa A., Farruggia G., Sargenti A., Belluti F., Di Martino R. M. C., Malucelli E., Meluzzi A., Iotti S., Gobbi S. Coumarin derivatives as potential antitumor agents: Growth inhibition, apoptosis induction and multidrug resistance reverting activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;127:577–585. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.01.020.
10. Laman N. A., Usik A. W. Localization and Composition of Coumarins in Roots of *Heracleum Sosnowskyi* Manden. *Vestsi National Academy of Sciences of Belarus. Series of Biological Sciences*. 2020;65(1):71–75. (In Russ.) DOI: 10.29235/1029-8940-2020-65-1-71-75
11. Statkevich V. S., Lukashou R. I. Chromatographic analysis of Kumarin in the organs of Sosnowsky's hogweed plants (*Heracleum sosnowskyi* Manden.). *Botany (Research): Collection of scientific transactions*. 2023;52:282–293. (In Russ.)
12. Ageev V. P., Shlyapkina V. I., Kulikov O. A., Zaborovsky A. V., Tararina L. A. Qualitative and quantitative analysis of the main psoralen derivatives in the juice of Sosnow-

sky's hogweed. *Pharmacy*. 2022;71(3):10–17. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2022-03-02.

13. Kopylova N. A., Laman N. A., Prokhorov V. N. Bioactive Compounds in Heracleum Sosnowskyi Manden. *Botany (Research): Collection of scientific transactions*. 2014;43:250–259. (In Russ.)
14. Bahadori M. B., Dinparast L., Zengin G. The Genus Heracleum: A Comprehensive Review on Its Phytochemistry, Pharmacology, and Ethnobotanical Values as a Useful Herb. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016;15(6):1018–1039. DOI: 10.1111/1541-4337.12222.
15. Hosseinzadeh Z., Ramazani A., Razzaghi-Asl N. Plants of the Genus Heracleum as a Source of Coumarin and Furanocoumarin. *Journal of Chemical Reviews*. 2019;1(2):78–98.
16. Marshall M. E., Kervin K., Benefield C., Umerani A., Albainy-Jenei S., Zhao Q., Khazaeli M. B. Growth-Inhibitory Effects of Coumarin (1,2-Benzopyrone) and 7-Hydroxycoumarin on Human Malignant Cell Lines In Vitro. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1994;120:S3–S10. DOI: 10.1007/BF01377114.
17. Seliger B., Pettersson H. 7-Hydroxycoumarin Inhibits Oncogene-Induced Transformation of Murine Fibroblasts. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1994;120:S23–S27. DOI: 10.1007/BF01377119.
18. Stefanova T. H., Nikolova N. J., Toshkova R. A., Neychev H. O. Antitumor and Immunomodulatory Effect of Coumarin and 7-Hydroxycoumarin Against Sarcoma 180 in Mice. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 2007;6(2):107–115.
19. Pesnya D. S., Romanovsky A. V., Serov D. A., Poddubnaya N Ya. Genotoxic Effects of Heracleum Sosnowskyi in the Allium Cepa Test. *International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*. 2017;70:55–61.
20. Pesnya D. S., Serov D. A., Vakorin S. A., Prokhorova I. M. Investigation of the toxic, mitosis-modifying, and mutagenic effects of *Heracleum Sosnowskyi*. *Yaroslavl Pedagogical Bulletin*. 2011;3(4):50–56. (In Russ.)

Оригинальная статья / Research article

УДК 579.66

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1825

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка продуцентов терапевтических пептидов на основе *Escherichia coli* BL21 и технологии их культивирования

З. Р. Хасаншина[1, 2]✉, И. А. Корнаков[1], Е. А. Буслаева[1], А. В. Казакова[1], С. А. Ищук[1], В. И. Шмурак[1], В. Б. Сапарова[1], В. Ф. Латыпов[1], Р. В. Драй[1]

[1] Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34, литера А

[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО». 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д. 49, литера А

✉ **Контактное лицо:** Хасаншина Зухра Рамилевна. **E-mail:** zuhra.hasanshina@geropharm.com

ORCID: З. Р. Хасаншина – https://orcid.org/0000-0002-0065-1853;
И. А. Корнаков – https://orcid.org/0000-0003-0207-5244;
Е. А. Буслаева – https://orcid.org/0009-0000-4389-8605;
А. В. Казакова – https://orcid.org/0009-0000-3314-2310;
С. А. Ищук – https://orcid.org/0000-0002-5754-7491;
В. И. Шмурак – https://orcid.org/0000-0003-0282-9843;
В. Б. Сапарова – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129;
В. Ф. Латыпов – https://orcid.org/0009-0009-0487-4227;
Р. В. Драй – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Статья поступила: 16.05.2024 **Статья принята в печать:** 24.01.2025 **Статья опубликована:** 27.01.2025

Резюме

Введение. В последнее десятилетие пептиды с молекулярной массой менее 5 кДа используется в медицине и биотехнологии для лечения различных заболеваний. Химический синтез пептидов имеет ограничения, такие как низкий выход и эффективность синтеза, сложность масштабирования. Альтернативой является использование *Escherichia coli*. Разработка эффективной технологии синтеза пептидов остается актуальной задачей в связи с низкой продуктивностью штаммов-продуцентов.

Цель. Разработка высокоэффективных штаммов *Escherichia coli* BL21, экспрессирующих терапевтические пептиды молекулярной массой менее 5 кДа, и технологии их культивирования.

Материалы и методы. Генетические конструкции получили с использованием рестриктазно-лигазного метода, подлинность подтвердили секвенированием по Сенгеру. Технологию культивирования разработали с использованием подхода Design of experiments. Валидацию условий культивирования проводили в биореакторе Biostat B. Гибридные белки очищали методом металл-хелатной хроматографии, целевые пептиды получали гидролизом с помощью ULP-протеазы. Количественное содержание целевого белка определяли капиллярным электрофорезом, подлинность белка – ВЭЖХ-МС и косвенным неконкурентным ИФА.

Результаты и обсуждение. В ходе исследований разработаны высокоэффективные штаммы-продуценты пептидов и оптимальные условия культивирования: pH – 7,5 ± 0,5, температура культивирования – 37 °C, оптическая плотность индукции – 2,7 ± 0,3, концентрация ИПТГ – 0,05 мМ. Продуктивность штаммов-продуцентов достигла 4,82 ± 0,05 г/л. Получены образцы очищенных пептидов.

Заключение. Разработанная технология позволяет получить пептиды с высоким выходом, не описанным ранее исследователями. Практическая значимость данной работы заключается в возможности применения данной технологии для получения пептидов с различными физико-химическими свойствами.

Ключевые слова: пептиды, *Escherichia coli*, культивирование, Design of experiments, ULP, ВЭЖХ-МС

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

Вклад авторов. З. Р. Хасаншина – разработка методологии, проведение исследований, анализ результатов, написание статьи. И. А. Корнаков – проведение исследований, участие в написании статьи. Е. А. Буслаева – проведение исследования. А. В. Казакова – проведение исследований. С. А. Ищук – разработка методологии, проведение исследований.

© Хасаншина З. Р., Корнаков И. А., Буслаева Е. А., Казакова А. В., Ищук С. А., Шмурак В. И., Сапарова В. Б., Латыпов В. Ф., Драй Р. В., 2025

© Khasanshina Z. R., Kornakov I. A., Buslaeva E. A., Kazakova A. V., Ishchuk S. A., Shmurak V. I., Saparova V. B., Latypov V. F., Drai R. V., 2025

В. И. Шмурак – проведение исследований, анализ данных. В. Б. Сапарова – проведение иммуноферментного анализа, анализ данных. В. Ф. Латыпов – разработка методологии, участие в написании статьи. Р. В. Драй – руководство работой.

Для цитирования: Хасаншина З. Р., Корнаков И. А., Буслаева Е. А., Казакова А. В., Ищук С. А., Шмурак В. И., Сапарова В. Б., Латыпов В. Ф., Драй Р. В. Разработка продуцентов терапевтических пептидов на основе *Escherichia coli* BL21 и технологии их культивирования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):54–66. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1825

Development of therapeutic peptide producers based on *Escherichia coli* BL21 and their cultivation technology

Zukhra R. Khasanshina[1, 2]✉, Igor A. Kornakov[1], Evgeniya A. Buslaeva[1], Angelina V. Kazakova[1], Sergey A. Ishchuk[1], Vladimir I. Shmurak[1], Valeriya B. Saparova[1], Vitaly F. Latypov[1], Roman V. Drai[1]

[1] JSC "FARM-KHOLDING". 34A, Svyazi str., Strelna village, Saint-Petersburg, 198515, Russia
[2] ITMO University. 49A, Kronverksky prospekt, Saint-Petersburg, 197101, Russia

✉ **Corresponding author:** Zukhra R. Khasanshina. **E-mail:** zuhra.hasanshina@geropharm.com

ORCID: Zukhra R. Khasanshina – https://orcid.org/0000-0002-0065-1853;
Igor A. Kornakov – https://orcid.org/0000-0003-0207-5244;
Evgeniya A. Buslaeva – https://orcid.org/0009-0000-4389-8605;
Angelina V. Kazakova – https://orcid.org/0009-0000-3314-2310;
Sergey A. Ishchuk – https://orcid.org/0000-0002-5754-7491;
Vladimir I. Shmurak – https://orcid.org/0000-0003-0282-9843;
Valeriya B. Saparova – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129;
Vitaly F. Latypov – https://orcid.org/0009-0009-0487-4227;
Roman V. Drai – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Received: 16.05.2024 **Accepted:** 24.01.2025 **Published:** 27.01.2025

Abstract

Introduction. Peptides with a molecular weight of less than 5 kDa have been used in medicine and biotechnology over the past decade for the treatment of various diseases. However, chemical synthesis peptide has several disadvantages, including low yield, reduced efficiency, and high costs. An alternative approach to peptide production is the use of the *Escherichia coli* expression system. The development of effective peptide synthesis technology remains a critical task because of the low productivity of recombinant strains.

Aim. Developing highly efficient strains of *Escherichia coli* BL21 expressing therapeutic peptides with a molecular weight of less than 5 kDa in *E. coli* and their cultivation technology.

Materials and methods. Genetic constructs were obtained using the restriction-ligase method, and their authenticity was confirmed by Sanger sequencing. Cultivation technology was developed using the Design of Experiments approach. The cultivation condition was validated in the Biostat B bioreactor. Hybrid proteins were purified by metal-chelate chromatography, followed by hydrolysis ULP proteas to obtain the target peptides. The quantitative content of the target protein was determined by capillary electrophoresis, and the authenticity of the protein was confirmed by HPLC-MS and ELISA.

Results and discussion. Highly efficient peptide-producing strains were developed. Cultivation conditions were optimized: pH 7.5 ± 0.5, cultivation temperature 37 °C, induction optical density 28 ± 2, IPTG concentration 0.05 мМ. The productivity of the producer strains was up to 4.82 ± 0.05 g/L. Furthermore, samples of the target peptides were isolated and purified.

Conclusion. The productivity of peptides in this study were significantly higher than in previous research. The presented strategy for strain development, cultivation and purification technology can be used production of therapeutic peptides with diverse physical chemicals characteristics in the future.

Keywords: peptides, *Escherichia coli*, design of experiments, cultivation, ULP, HPLC-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. Zukhra R. Khasanshina – methodology, Investigation, Formal analysis, writing – original draft. Igor A. Kornakov – investigation, writing – review & editing. Evgeniya A. Buslaeva, Angelina V. Kazakova – investigation. Sergey A. Ishchuk – methodology, investigation. Vladimir I. Shmurak – investigation, formal analysis. Valeriya B. Saparova – investigation, formal analysis. Vitaly F. Latypov – conceptualization, writing – review & editing. Roman V. Drai – supervision, conceptualization.

For citation: Khasanshina Z. R., Kornakov I. A., Buslaeva E. A., Kazakova A. V., Ishchuk S. A., Shmurak V. I., Saparova V. B., Latypov V. F., Drai R. V. Development of therapeutic peptide producers based on *Escherichia coli* BL21 and their cultivation technology. *Drug development & registration*. 2025;14(1):54–66. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1825

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие пептиды нашли широкое применение в медицине и биотехнологии. Эра пептидных препаратов началась в 1921 году с открытия инсулина [1–3]. В настоящее время пептиды используются в терапии метаболических, инфекционных, кардиоваскулярных и онкологических заболеваний. На мировом рынке представлено около 80 пептидных препаратов, одобренных регуляторными органами. Кроме того, более 150 пептидов находятся в стадии клинической разработки, 400–600 пептидов – доклинических исследований [1, 3].

Классическая технология получения пептидов – химический синтез – имеет ряд ограничений: низкий выход пептидов из-за проблем с растворимостью, использование дорогостоящих, взрывоопасных реагентов, сложность масштабирования и наработки материала надлежащего качества не только для обеспечения потребностей рынка, необходимого для доклинических и клинических исследований [4, 5]. Стратегия прямого последовательного синтеза заключается в поэтапном добавлении аминокислот до получения желаемой последовательности. Эффективность каждого этапа не достигает 100 %, что приводит к образованию смеси пептидов разной длины и усложнению процесса очистки [6]. Дополнительные сложности возникают при синтезе последовательностей с высоким содержанием гидрофобных аминокислот, склонных к агрегации, и свободных цистеинов из-за окисления или образования нежелательных дисульфидных связей [6, 7]. Альтернативным способом получения пептидов является технология рекомбинантной ДНК, которая лишена вышеперечисленных недостатков. Для получения пептидов, не содержащих посттрансляционные модификации, неабиогенные аминокислоты, может быть использована бактериальная система экспрессии. Быстрая кинетика роста, хорошая охарактеризованная генетика, широкий выбор инструментов для экспрессии генов, возможность высокоплотностного культивирования сделали *Escherichia coli* ключевым представителем бактериальной системы экспрессии для сверхэкспрессии рекомбинантных белков [8]. В литературе описаны десятки штаммов-продуцентов, каждый из которых обладает своими достоинствами и недостатками. Стоит отметить, что большинство из них являются специализированными штаммами, которые используются в определенных случаях. В промышленных масштабах используются несколько штаммов *E. coli*: BL21 и производные линии K12 [9]. Несмотря на то, что штаммы K12 наиболее изучены, *E. coli* BL21 считается более предпочтительным для производства рекомбинантных белков, так как он обеспечивает более высокий выход биомассы и снижает образование ацетата даже при избытке глюкозы в среде [9–11]. Использование BL21 предпочтительно для получения пептидов, склонных к протеолитической деградации. При этом BL21 является дефицитным по протеазам Lon и OmpT, способствующим гидролизу чужеродных белков и расщеплению внеклеточных белков соответственно, и обеспечивает стабильность плазмидной ДНК [8, 9].

Однако экспрессия коротких пептидов молекулярной массой менее 5 кДа ограничена цитотоксичностью и низкими выходами целевого продукта [12]. Поэтому задача разработки стратегии получения пептидов с сохранением всех преимуществ *E. coli* остается актуальной. Одним из решений является экспрессия пептида в виде тандемных повторов или в виде гибридных белков, слитых крупными белками, например SUMO [12–15]. Однако тандемные повторы усложняют рефолдинг белков [15], что делает использование белка SUMO более перспективным направлением [16]. В настоящее время технология SUMO используется для получения рекомбинантных пептидов в академических целях, но ее продуктивность недостаточна для промышленного использования [17–21].

На экспрессию рекомбинантного белка влияет не только экспрессионный штамм-хозяин, но и условия индукции [9, 22, 23]. Выход экспрессируемых белков можно увеличить с помощью оптимизации этих параметров. Традиционно изменение одной переменной за раз используется для оптимизации [24]. Однако этот метод требует проведения большого количества экспериментов и приводит к неправильной интерпретации данных при взаимодействии различных факторов [25]. Напротив, Design of experiments (DoE) позволяет варьировать несколько факторов одновременно и исследовать их взаимодействие, что делает его более предпочтительным методом для получения проектных полей процесса [25–28].

Таким образом, в данной работе предложена стратегия разработки высокоэффективных штаммов-продуцентов терапевтических пептидов молекулярной массой менее 5 кДа в *E. coli* BL21, а также культивирования для применения в промышленной биотехнологии. Предложенная стратегия получения штаммов-продуцентов и технология культивирования могут быть использованы для биосинтеза пептидов с различными физико-химическими свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и плазмиды

Штаммы *Escherichia coli* DH5α (NEB, США) и BL21 (NEB, США) были использованы в качестве штаммов для клонирования и экспрессии соответственно. Для нуклеотидных последовательностей SUMO и пептидов была проведена оптимизация кодонов для их экспрессии *Escherichia coli* с использованием алгоритма ATUM (США), синтез последовательностей был осуществлен ATUM (США). Фрагмент SUMO был фланкирован сайтами рестрикции эндонуклеаз EcoRI и BseRI, фрагменты пептидов – BseRI и HindIII. В качестве вектора была использована плазмида

ЗАО «Фарм-Холдинг», содержащая ген устойчивости к канамицину, Tac-промотор, rrnB-терминатор, точку инициации репликации pBR322 и ген ROP для контроля копийности (рисунок 1) [29]. Рекомбинантные плазмиды были получены рестриктазно-лигазным методом клонирования [30]. Подлинность была подтверждена секвенированием по Сэнгеру компанией ЗАО «Евроген» (Россия).

Трансформация и отбор клонов с высокой экспрессией

Плазмиды после подтверждения подлинности конструкций ввели в *E. coli* BL21 методом электропорации. 0,5 мкл плазмиды (400 нг/мкл) смешивали с 100 мкл компетентных клеток *E. coli* BL21 к кювете для электропорации 1 мм и подвергали действию электрического тока 1700 V с помощью электропоратора Eppendorf Eporator (Германия) [30]. Далее к клеткам добавили 1 мл среды SOC [31] и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и 180 об/мин в термошейкере Ecotron (Infors, Швейцария). Суспензию клеток центрифугировали при 3000 об/мин в течение 2 мин с помощью центрифуги 5810R (Eppendorf, Германия), супернатант удаляли, клетки ресуспендирова-ли в 100 мкл среды и рассевали на агаризованную среду LB [31], содержащую канамицин (50 мг/л). Чашки инкубировали в течение ночи при температуре 37 °C. Были получены штаммы-продуценты BL21\pF1220 и BL21\pF1223, экспрессирующие SUMO-пептид 1 и SUMO-пептид 2 соответственно. Данные пептиды являются антигенными компонентами вакцины.

По 10 колоний с каждой чашки пересевали в колбы (300 мл), содержащие 30 мл среды LB [31] и 50 мг/л канамицина. Клетки инкубировали при 37 °C и 180 об/мин в термошейкере Ecotron (Infors, Швейцария) до достижения оптической плотности при длине волны 600 нм 0,6–0,8 о.е., внесли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ. Индукцию проводили в течение 4 ч, затем отбирали 200 мкл суспензии клеток, центрифугировали при 15 000 об/мин в течение 5 мин с помощью центрифуги 5810R (Eppendorf, Германия). Экспрессию белка оценивали методом электрофореза в денатурирующих условиях в 15%-м трицин-полиакриламидном геле [32]. Клоны с наилучшей экспрессией были выбраны для дальнейших исследований.

Подготовка посевного материала

Подготовка посевного материала для культивирования в колбах и в биореакторе идентична. Культуру растили в среде для посевного материала (СМ), содержащей пептоны растительного происхождения 30 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, 50 мг/л канамицина. Инкубировали в термошейкере Ecotron (INFORS HT, Швейцария) при 180 об/мин 37 °C в течение 16 ± 2 ч.

Оптимизация условий индукции в колбах

На основании литературных данных и предыдущего опыта для оптимизации условий индукции были выбраны пять факторов: pH (5–8), температура (25–37 °C), длительность индукции (4–17 ч), концентрация индуктора ИПТГ (0,05–1,0 мМ), оптическая плотность индукции (0,5–3,0 о.е.) [9, 22, 23].

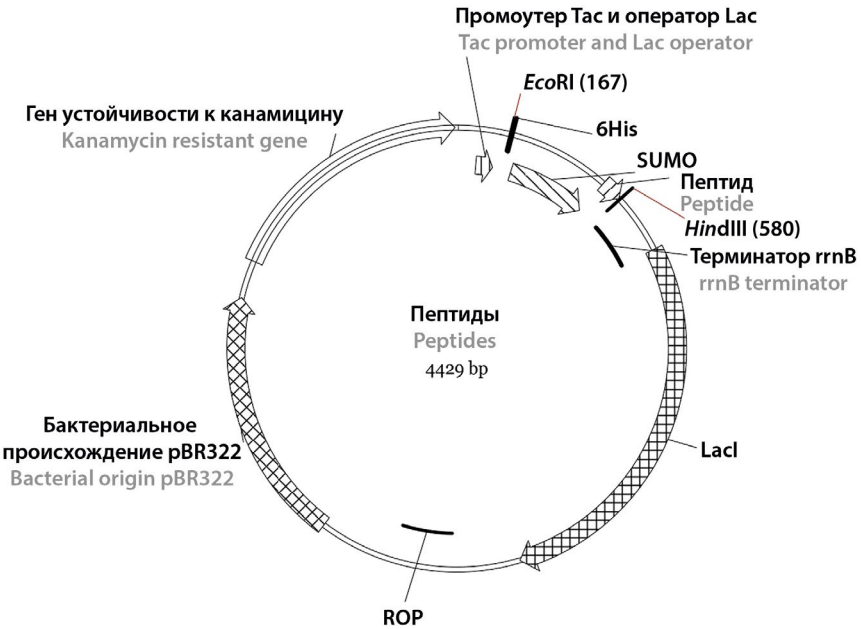


Рисунок 1. Общая карта плазмиды

Figure 1. Schematic plasmid map

В качестве откликов использовали удельную продуктивность и концентрацию влажной биомассы. Влияние факторов оценивали с помощью дизайна Reduced Central Composite Face (CCF). Модели считались приемлемыми при удовлетворительных значениях коэффициента детерминации R^2 и высокой предсказательной способности модели Q^2 [25, 33, 34]. Множественный линейный регрессионный анализ использовали для надстройки модели (формула 1).

$$Y_{CCF} = \alpha_0 + \sum_{i=1}^{3} \alpha_i X_i + \sum_{i<j}^{3} \alpha_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^{3} \alpha_{ii} X_i^2, \quad (1)$$

где Y_{CCF} – отклик CCF-дизайна; X_i и X_j – анализируемые факторы; a_0 – константа; a_i, a_{ij} и a_{ii} – линейные коэффициенты регрессии, коэффициенты взаимодействия и квадратичные коэффициенты регрессии соответственно.

Валидация условий культивирования в биореакторе

Оптимальные условия, определенные в экспериментах в колбах, валидировали в 5-литровом биореакторе Biostat B (Sartorius AG, Германия). Проводили периодическое культивирование на среде СМ с добавлением пеногасителя Antifoam 204 0,03 % об./об. и 50%-го раствора глюкозы 0,06 % об./об. Объем посевного материла составлял 1:10 объема питательной среды. Уровень растворенного кислорода поддерживали на уровне 30 % насыщения воздухом. pH среды регулировали в пределах, установленных проектным полем, с использованием 50%-го раствора глюкозы (режим pH-стат).

В качестве контроля использовали технологию культивирования в стандартных для *E. coli* условиях: pH среды – 6,8 ± 0,2, температура культивирования – 37 °C, оптическая плотность индукции – 13 ± 2 о.е., время индукции – 4 ч, концентрация ИПТГ – 0,5 мМ. Все ферментации проводили в трех проворностях.

Измерение оптической плотности культуры

Оптическую плотность культуры измеряли при длине волны 600 нм (OD_{600}) на спектрофотометре NanoPhotometer P300 (Implen GmbH, Германия) [35].

Количественное определение содержания белка

Для определения концентрации гибридных белков использовали метод капиллярного гель-электрофореза в денатурирующих условиях с помощью системы для капиллярного электрофореза PA 800 Plus (SCIEX LLC, США) [36]. Использовали фотометрическое прямое детектирование в ультрафиолетовой области спектра. В качестве стандарта использовали раствор целевых белков с концентрацией 1 мг/мл.

Выделение и гидролиз целевых пептидов

Культуральную жидкость после ферментации центрифугировали в течение 20 мин при 8000 об/мин на центрифуге Avanti J-HC (Beckman Coulter, Inc., США). Клеточную биомассу гомогенизировали в соотношении 1:15 в буферном растворе (0,15 M NaCl, 0,02 M NaH_2PO_4, pH 7,4) с помощью гомогенизатора высокого давления PandaPLUS 1000 (GEA NIRO SOAVI, Италия) при 900 бар. Для удаления белков штамма-хозяина использовали металл-хелатную хроматографию на Ni Seplife® 6FF (Sunresin, Китай). Элюцию проводили 0,02 M фосфатным буфером, содержащим 0,15 M NaCl и 0,5 M имидазола. Элюат концентрировали на кассете Vivaflow 200 (Sartorius AG, Германия) с молекулярной массой отсечения 5 кДа. К полученному концентрату добавляли Ulp-протеазу. Гидролиз проводили при температуре 20–25 °C в течение 1 ч. Раствор после гидролиза анализировали с помощью ВЭЖХ-МС для подтверждения подлинности продукта. Эффективность стадий очистки оценивали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 15%-м трицин-полиакриламидном геле [32].

Определение подлинности методом ВЭЖХ-МС

Для анализа образцов после металл-хелатной хроматографии и гидролиза использовали ВЭЖХ-систему Aquity с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором SQ Detector 2 (Waters Corporation, США). Хроматографию проводили на колонке SunFire C18, 150 × 4,6 мм, с зернением 3,5 мкм (Waters Corporation, США). Объем вводимой пробы составил 5 мкл. Фаза А представляла собой смесь «вода – 0,1%-я муравьиная кислота», фаза Б – смесь «ацетонитрил – 0,1%-я муравьиная кислота». Разделение осуществляли при потоке элюента 900 мкл/мин в системе «фаза А – фаза Б» в градиентном режиме: 0–1 мин – 5 %, 1,0–15,0 мин – 5–50 %, 15,0–15,2 мин – 5–100 %, 15,2–18,0 мин – 100 %, 18,0–18,2 мин – 100–5 %, 18,2–22,0 мин – 5 %. Температура колонки составила 40 °C. Тип ионизации масс-детектора – распыление в электрическом поле, диапазон сканирования – 200–2000 m/z в режиме положительно заряженных ионов. Дополнительно на длинах волн 220 и 280 нм записывали ВЭЖХ-УФ-хроматограммы, полученные с помощью диодно-матричного детектора.

Определение подлинности методом ИФА

В качестве ортогонального метода подтверждения подлинности продуктов использовали иммуноферментный анализ «ЭпиВак-ЭВК-подлинность» (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия). Образцы разводили в 0,05 M карбонат-бикарбонатном буферном растворе до концентрации 1 мг/мл. В лунки стрипа вносили 20 мкл образца, икубировали в течение 30 мин при 37 °C и 700 об/мин в термошейкере PST-60HL (Biosan,

Латвия). Затем раствор сливали, тщательно встряхивали. Добавляли 400 мкл фосфатного буферного раствора, удаляли его по той же схеме. Процедуру повторяли три раза. После этого вносили 100 мкл первичных антител, инкубировали в течение 30 мин при 37 °C и 700 об/мин в термошейкере PST-60HL (Biosan, Латвия). Лунки три раза промывали фосфатным буферным раствором, добавляли 100 мкл антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, инкубировали в течение 30 мин при 37 °C и 700 об/мин в термошейкере PST-60HL (BioSan, Латвия). Далее лунки три раза промывали фосфатным буферным раствором, добавляли 100 мкл 3,3′,5,5′-тетраметилбензидина гидрохлорида, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, добавляли 50 мкл стоп-буфера, аккуратно перемешивали до появления желтого окрашивания. Оптическую плотность определяли на планшетном спектрофотометре CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия) при длине волны 450 нм. Если отношение оптической плотности образца к отрицательному контролю больше или равно 1, продукт считался подлинным.

Программное обеспечение и статистическая обработка данных

Для разработки дизайна генетических конструкций использовали программу Vector NTI 11.5 (Invitrogen, США). Дизайн экспериментов, проверка моделей и определение значимости параметров в рамках DoE проводили с применением программы MODDE (Sartorius AG, Германия). Для построения моделей использовали метод поверхностей отклика, для анализа полученных данных использовали анализ вариаций (ANOVA) и описательную статистику [33]. Для статистической обработки результатов ферментации использовали программу GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Осуществили расчет среднего значения и стандартного отклонения, для сравнения результатов ферментации в стандартных и оптимизированных условиях использовали Т-тест. ВЭЖХ-МС-хроматограммы анализировали с помощью программы UNIDEC 4.4.1 [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Доступно множество стратегий экспрессии для производства пептидов. Стоит отметить, что разработка рекомбинантных производственных процессов является сложной задачей. Микробная ферментация с использованием генно-инженерных бактерий используется для производства пептидов размером менее 5 кДа, однако уровень экспрессии не позволяет достичь высоких промышленных титров из-за протеолитической деградации, цитотоксичности и агрегации, что ограничивает применение данного подхода. В данном исследовании был предложен подход с использованием разработки штаммов и технологии культивирования пептидов с различными физико-химическими свойствами, которые могут быть применимы для разработки других пептидов.

В результате данных исследований были получены штаммы-продуценты BL21\pF1220, BL21\pF1223. Первичный скрининг продуктивности в колбах показал, что они обеспечивают выход гибридного белка в растворимой фракции в концентрации не менее 2 % от массы влажной биомассы в течение 4 и 20 ч после индукции. При этом до индукции биосинтеза целевого продукта не наблюдалось, что свидетельствует об эффективности системы запуска экспрессии. С течением времени не наблюдается деградации гибридного белка. Было обнаружено, что после индукции штамм-продуцент BL21\pF1220 прекращает рост, что может быть связано с токсичностью продукта для клетки.

Дополнительно были проведены эксперименты по оптимизации условий индукции, которые являются критическим этапом при максимизации выхода [38, 39]. После проведения экспериментов и анализа данных были получены модели для определения оптимальных условий индукции штаммов-продуцентов пептидов. Для удельной продуктивности значения R^2 и Q^2 составили 0,93 и 0,81; 0,98 и 0,94 для штаммов-продуцентов BL21\pF1220, BL21\pF1223 соответственно. Модели являются приемлемыми. Для отклика «концентрация влажной биомассы» значения R^2 и Q^2 составили 0,78 и 0,39; 0,90 и 0,73 для штаммов-продуцентов пептидов 1, 2 соответственно. Данные для BL21\pF1223 показывают, что полученная модель является приемлемой, и ее рекомендуется использовать для дальнейшей работы. Значение Q^2 для BL21\pF1220 ниже порогового значения при приемлемом уровне R^2. Данная модель не рекомендована для дальнейшего использования.

На основе результатов исследования были предложены квадратичные модели, описывающие влияние изменения факторов на рост клеток и продуктивность (формулы 2–5).

$$P_1 = 1{,}16 - 0{,}05 \cdot X_1 + 0{,}05 \cdot X_2 + 0{,}07 \cdot X_3 - 0{,}06 \cdot X_4 + \\ + 0{,}02 \cdot X_5 - 0{,}15 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0{,}04 \cdot X_1 \cdot X_4 + 0{,}03 \cdot X_2 \cdot X_4 + \\ + 0{,}03 \cdot X_3 \cdot X_4 - 0{,}03 \cdot X_3 \cdot X_5, \quad (2)$$

$$P_2 = 1{,}9{,}50 + 4{,}38 \cdot X_1 + 1{,}37 \cdot X_2 + 9{,}87 \cdot X_3 - 3{,}48 \cdot X_4 - \\ - 0{,}92 \cdot X_5 - 4{,}31 \cdot X_1^2 + 1{,}56 \cdot X_2 \cdot X_3 + 2{,}47 \cdot X_1 \cdot X_3 + \\ + 1{,}39 \cdot X_1 \cdot X_4 + 3{,}35 \cdot X_2 \cdot X_5, \quad (3)$$

$$Y_1 = 65{,}94 + 13{,}29 \cdot X_1 + 15{,}11 \cdot X_2 + 7{,}50 \cdot X_3 + \\ + 1{,}39 \cdot X_4 + 0{,}02 \cdot X_5 + 9{,}34 \cdot X_1 \cdot X_3 - 8{,}19 \cdot X_4 \cdot X_5, \quad (4)$$

$$Y_2 = 101{,}727 + 12{,}61 \cdot X_1 + 14{,}72 \cdot X_2 + 5{,}44 \cdot X_3 - \\ - 21{,}55 \cdot X_4 - 4{,}44 \cdot X_5 - 34{,}17 \cdot X_4^2 + 15{,}62 \cdot X_3 \cdot X_4 - \\ - 7{,}125 \cdot X_2 \cdot X_4 + 9{,}625 \cdot X_2 \cdot X_5, \quad (5)$$

где P_1, P_2 – удельная продуктивность штаммов-продуцентов 1, 2 пептидов; Y_1, Y_2 – концентрации влажной биомассы штаммов-продуцентов 1, 2 пептидов; X_1 –

коэффициент для фактора «время индукции»; X_2 – коэффициент для фактора «оптическая плотность индукции»; X_3 – коэффициент для фактора «температура культивирования»; X_4 – коэффициент для фактора «pH питательной среды»; X_5 – коэффициент для фактора «концентрация ИПТГ».

Влияние исследуемых параметров на продуктивность и рост клеток

Показано, что на продуктивность штаммов-продуцентов оказывают влияние все исследованные факторы, кроме концентрации индуктора. В ранних исследованиях было установлено, что максимальная концентрация ИПТГ увеличивает продуктивность [40]. Однако ряд более поздних исследований показал, что высокая концентрация индуктора может негативно повлиять на продуктивность [41]. В нашем исследовании показано, что взаимодействие факторов «температура», «pH среды» и «концентрация индуктора» отрицательно влияет на продуктивность. Это может быть связано с тем, что при снижении температуры оптимальная точка индукции смещается из-за увеличения метаболической нагрузки, так как скорость роста клеток уменьшается. Данное явление также подтверждает взаимодействие отклика «время индукции» и «оптическая плотность» с «температурой». Показано, что чем ниже температура, тем меньший диапазон концентраций ИПТГ может быть использован. Мы обнаружили, что при 37 °C все исследуемые диапазоны концентраций ИПТГ (0,05–0,1 мМ) приводят к максимальному выходу продукта. При этом было показано, что культивирование при высоких температурах не приводит к агрегации гибридного белка, что противоречит предыдущим исследованиям [42, 43]. Это может быть связано с тем, что SUMO увеличивает растворимость рекомбинантного белка и вклад пептида в агрегацию нивелируется.

Фактор «pH среды» взаимодействовал с такими факторами, как «температура», «концентрация индуктора», «время индукции». Было показано, что чем ниже pH среды, тем ниже удельная скорость роста. При культивировании *E. coli* наиболее часто используемый диапазон pH среды – 6,5–7,5. Наши исследования показали, что наиболее оптимальным для роста и биосинтеза является pH 7,5 ± 0,5. Мы предполагаем, что это связано с ослаблением ингибирования роста и биосинтеза, вызванного ацетатом, путем щелочного сдвига. Известно, что ацетат отрицательно влияет на рост и биосинтез рекомбинантных белков *E. coli* [44]. Незначительный щелочной сдвиг может уменьшить ацетатный стресс, клетки способны снизить концентрацию внутриклеточного ацетата и, таким образом, снизить токсичность для клетки [45, 46].

Концентрация биомассы должна достигать определенного значения, чтобы выдерживать метаболическую нагрузку, вызванную высокими концентрациями индуктора. Однако индукция в поздних фазах экспоненциального роста может оказывать негативное влияние на накопление целевого продукта, поскольку большая часть ресурсов уже ушла на рост. Однако следует отметить, что низкая концентрация ИПТГ может привести к низкой продуктивности из-за неравномерного распределения ИПТГ в популяции клеток [41, 47]. Было показано, что оптимальной является индукция в начале экспоненциальной фазы роста (2,7 ± 0,3 о.е.).

В этом исследовании параметры «концентрация индуктора», «оптическая плотность индукции», «время индукции» варьировались, чтобы определить уровень метаболической нагрузки, которая может быть возложена на клетки. Для факторов «концентрация индуктора» и «оптическая плотность» были показаны влияния, описанные выше. Было показано, что время индукции влияет на удельную продуктивность и рост клеток. Чем длительнее время культивирования, тем выше выход рекомбинантного белка и биомасса. Однако сравнение моделей, полученных на момент 4 и 17 ч после индукции, показало незначительное отличие. Возможно, это связано с тем, что лимитирующим фактором является доступность растворенного кислорода и источника углерода. Было принято решение снять кинетику накопления продукта во время валидации модели в биореакторах.

Стоит отметить, что все наблюдаемые эффекты имеют низкие коэффициенты для штамма-продуцента 1 пептида (менее 0,2). Вероятно, данное явление связано с тем, что исследуемый продукт является токсичным для *E. coli* и после запуска индукции рост клеток останавливается.

На основании анализа проектных полей для штаммов-продуцентов определены следующие условия индукции: pH – 7,5 ± 0,5, температура культивирования – 37 °C, оптическая плотность индукции – 2,7 ± 0,3 о.е., концентрация ИПТГ – 0,05–0,1 мМ. Концентрация индуктора не влияет на удельную продуктивность во всех исследуемых диапазонах концентраций и оказывает отрицательное влияние на рост клеток, поэтому выбрана низкая концентрация индуктора. Уменьшение концентрации ИПТГ также привлекательно с промышленной точки зрения, поскольку это дорогостоящее соединение [48, 49], а его высокие концентрации могут привести к резкому снижению скорости роста или к экспрессии некоторых протеаз, что снижает выход рекомбинантных белков [49].

Валидация условий культивирования в биореакторе

Концепция Quality by Design (QbD) в разработке лекарственных препаратов была одобрена и описана FDA в 2004 г. В руководствах Международного совета по гармонизации (ICH) Q8 «Фармацевтическая разработка», Q9 «Управление рисками для качества», Q10 «Фармацевтическая система качества» подробно описаны способы достижения качества лекарственного препарата и связь между QbD и DoE.

В настоящее время DoE является лучшей практикой для определения критических параметров процессов и их интенсификации. Одним из ключевых этапов DoE является валидация полученных моделей и оптимальных точек процесса. Валидация моделей считается успешной, когда предсказанные значения отклика соответствуют экспериментальным данным при предложенных оптимальных значениях факторов [33, 50, 51].

Культивирование *E. coli* в колбах используется при первоначальном скрининге условий культивирования и оптимизации среды. Преимущества данного подхода заключаются в возможности параллельного культивирования, высокой производительности и простоте обращения [52]. Однако рост в колбах связан с ограничениями, такими как истощение питательных веществ, низкая аэрация и отсутствие контроля pH, что ограничивает выход белка и биомассы [53]. Таким образом, важной задачей при валидации модели является определение начала экспоненциальной фазы роста в биореакторе и возможность масштабирования условий по отклику «удельная продуктивность». С учетом кривой роста *E. coli* в биореакторе были предложены три оптические плотности индукции, которые могут соответствовать экспоненциальной фазе роста. Показано, что оптимальной является точка индукции 30 о.е. (рисунок 2), соответствующая переходной фазе роста культуры, аналогичной точке индукции в колбах.

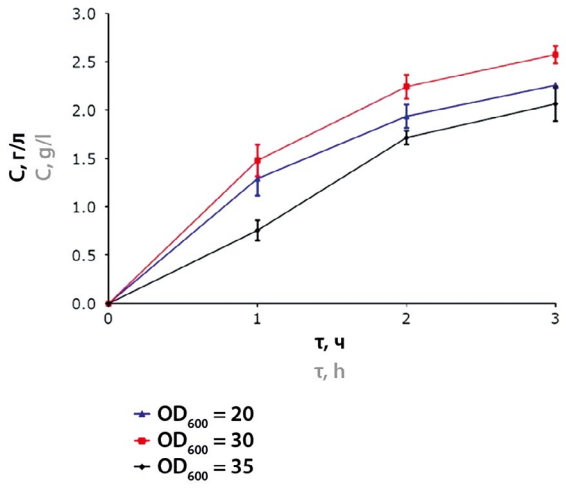


Рисунок 2. Влияние оптической плотности индукции на удельную продуктивность штамма-продуцента BL21\pF1220. Данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение (SD)», *n* = 3

Figure 2. The influence of induction optical density on the specific productivity of the BL21\pF1220 producer strain. The data are presented as the mean ±SD, *n* = 3

Экспериментально полученная продуктивность штаммов-продуцентов входит в диапазон предсказанной моделями продуктивности (таблица 1). Следовательно, валидация прошла успешно. Таким образом, отклик «удельная продуктивность» воспроизводится при проведении культивирования как в колбах, так и в биореакторах при прочих равных условиях. Это позволяет использовать ее в качестве критерия успешности валидации и масштабирования от колб до биореактора. Данный факт открывает возможности не только для оптимизации условий культивирования и состава сред, но и для оптимизации условий индукции в колбах.

Таблица 1. Предсказанная и экспериментальная удельная продуктивность

Table 1. Experimental and prediction specific productivity

Продукт Product	**Предсказанная продуктивность, мг/г** Predicted productivity, mg/g	**Экспериментальная продуктивность, мг/г** Experimental productivity, mg/g
Пептид 1 Peptide 1	25–30	28,0 ± 3,0
Пептид 2 Peptide 2	25–30	25,0 ± 3,0

В процессе валидации оптимальных условий культивирования штаммов-продуцентов оценивали кинетику роста и накопления целевого продукта в процессе индукции в стандартных и оптимизированных условиях (рисунки 3 и 4). Исследованные штаммы-продуценты достигали точки индукции на третий час культивирования (рисунок 3). После внесения индуктора штамм-продуцент BL21\pF1220 демонстрирует замедление скорости роста и выход в стационарную фазу роста на 6-й час культивирования. Максимальная продуктивность 2,57 ± 0,09 г/л у штамма-продуцента BL21\pF1220 наблюдается на 3-й час индукции, что соответствует 6-му часу культивирования (рисунок 4, А). После индукции у штамма-продуцента BL21\pF1223 продолжается экспоненциальная фаза роста (рисунок 3, Б). Культура выходит в стационарную фазу роста на 7-й час культивирования. Объемная продуктивность BL21\pF1223 достигает максимума 4,27 ± 0,36 г/л на 4-й час индукции, что соответствует 7-му часу культивирования (рисунок 4, Б).

Выделение и очистка пептидов

После культивирования биомассу центрифугировали и дезинтегрировали. Исследовали надосадочную жидкость и осадок, полученные после дезинтеграции (рисунок 5). Показано, что 100 % экспрессированного белка локализовано в растворимой фракции. Далее надосадочную жидкость подвергали метал-хелатной хроматографии. Гибридный белок с N-конца содержит 6-His, что позволяет эффективно очистить его от белков штамма-хозяина. Фракции элюата обогащены гибридным белком пептида, что подтверждает возможность использования металлхелатной хроматографии на сорбенте Ni Seplife® 6FF для выделения целевого продукта из клеточного ли-

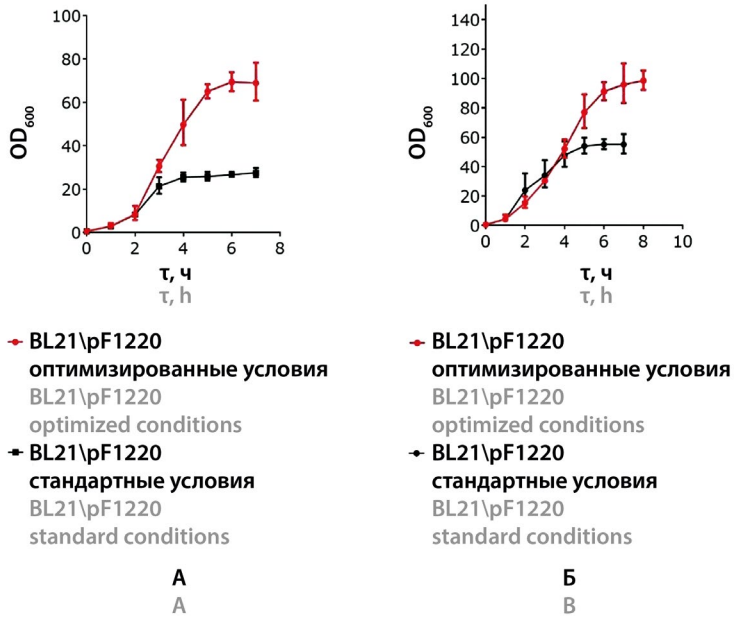


Рисунок 3. Кинетика роста штаммов-продуцентов BL21\pF1220 (А) и BL21\pF1223 (Б) в стандартных и оптимизированных условиях. Данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение (SD)», *n* = 3

Figure 3. The growth kinetics of BL21\pF1220 (A) and BL21\pF1223 (B) producer strains under standard and optimized conditions. The data are presented as the mean ± SD, *n* = 3

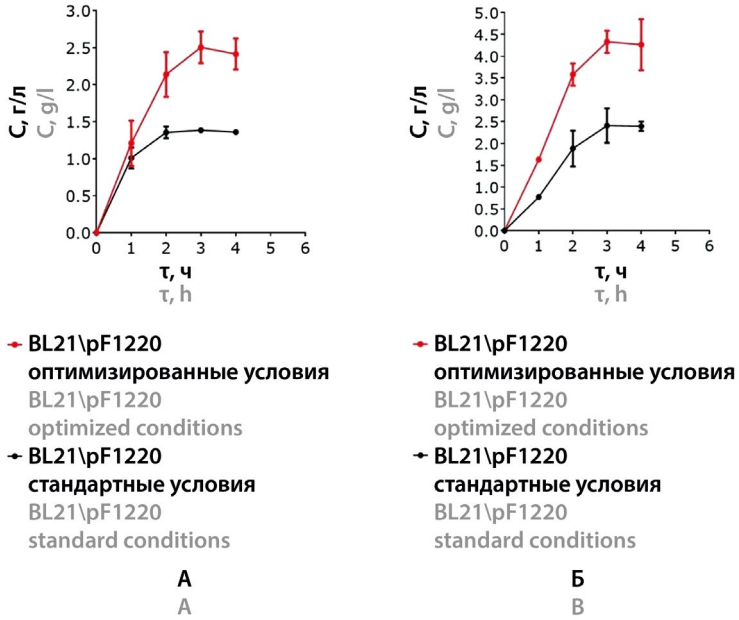


Рисунок 4. Объемная продуктивность штаммов-продуцентов BL21\pF1220 (А) и BL21\pF1223 (Б) в стандартных и оптимизированных условиях. Данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение (SD)», *n* = 3

Figure 4. Volumetric productivity of producer strains BL21\pF1220 (A) and BL21\pF1223 (B) under standard and optimized conditions. The data are presented as the mean ±SD, *n = 3*

зата. Во фракции проскока отсутствует целевой продукт, следовательно, предложенные условия обеспечивают эффективное связывание белка с сорбентом (рисунок 5).

Далее проводили ферментативный гидролиз гибридных белков ULP-протеазой. Через 1 ч после добавления ULP-протеазы наблюдается исчезновение бендов, соответствующих гибридному белку, и появле-

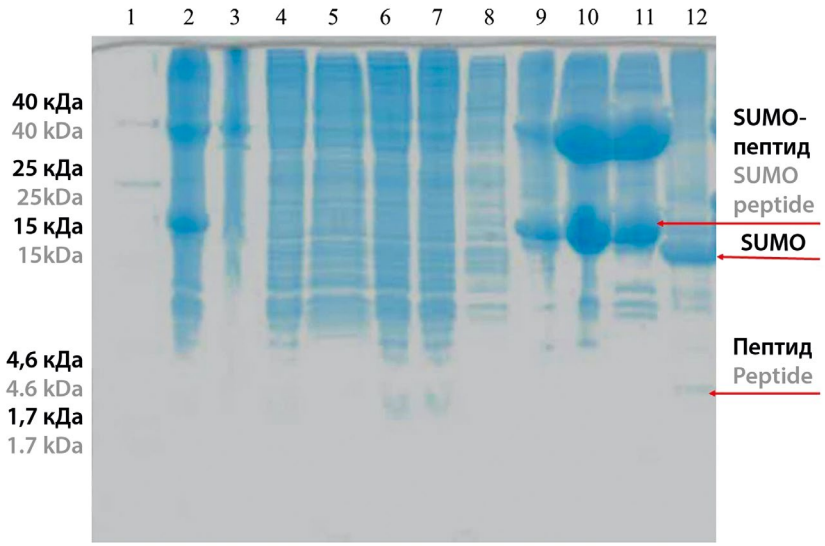


Рисунок 5. Электрофоретическое разделение в 15%-м трицин-полиакриламидном геле белковых фракций:

1 – маркер молекулярных масс; 2 – надосадочная жидкость после дезинтеграции; 3 – осадок после дезинтеграции; 4–8 – фракции проскока после металл-хелатной хроматографии; 9–11 – фракции элюата металл-хелатной хроматографии; 12 – элюат после обработки ULP-протеазой. Красной стрелкой выделен целевой пептид, появляющийся после гидролиза

Figure 5. Electrophoretic separation of protein fractions in 15 % tricine-polyacrylamide gel:

1 – molecular weight marker; 2 – supernatant liquid after biomass disintegration; 3 – precipitate after biomass disintegration; 4–8 – slip fractions after metal chelate chromatography; 9–11 – metal chelate chromatography eluate fractions; 12 – eluate after treatment with ULP protease. The red arrow highlights the target peptide that appears after hydrolysis

ние бендов, соответствующих по молекулярной массе пептиду и SUMO (см. рисунок 5).

По сравнению с очисткой тандемных повторов, предложенной в других исследованиях для получения пептидов [54, 55], данный подход обеспечивает простое, быстрое и масштабируемое разделение пептидов.

Таким образом, сочетание SUMO с пептидом не только увеличивает растворимость белка, но и обеспечивает специфическое расщепление белка слияния.

Подтверждение подлинности целевых пептидов

Показано соответствие экспериментальной молекулярной массы, полученной после гидролиза, теоретической (таблица 2).

Дополнительно был проанализирован диапазон молекулярных масс, соответствующих молекулярным массам гибридного белка, пептида и SUMO, в образцах после гидролиза. Молекулярные массы, соответствующие массам гибридных белков, не были обнаружены после гидролиза и очистки на металл-хелатных хроматограммах (рисунок 6).

Подлинность пептидов была подтверждена косвенным неконкурентным методом ИФА, использованным в качестве ортогонального метода.

Таблица 2. Результаты подтверждения подлинности пептидов

Table 2. Results of peptide identification

Продукт Product	**Теоретическая ММ, Да** Theoretical MM, Da	**Экспериментальная ММ, Да** Experimental MM, Da
Пептид 1 Peptide 1	2959	2960 ± 1
Пептид 2 Peptide 2	2687	2687 ± 1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе предложена альтернативная и эффективная стратегия получения терапевтических пептидов с молекулярной массой менее 5 кДа. В результате были получены высокоэффективные штаммы-продуценты гибридных пептидов BL21\pF1220, Bl21\pF1223. Проведена оптимизация условий индукции, получены и валидированы модели, описывающие условия индукции. Предложены оптимальные условия индукции: pH – 7,5 ± 0,5, температура культивирования – 37 °C, оптическая плотность индукции – 2,7 ± 0,3, концентрация ИПТГ – 0,05 мМ. Про-

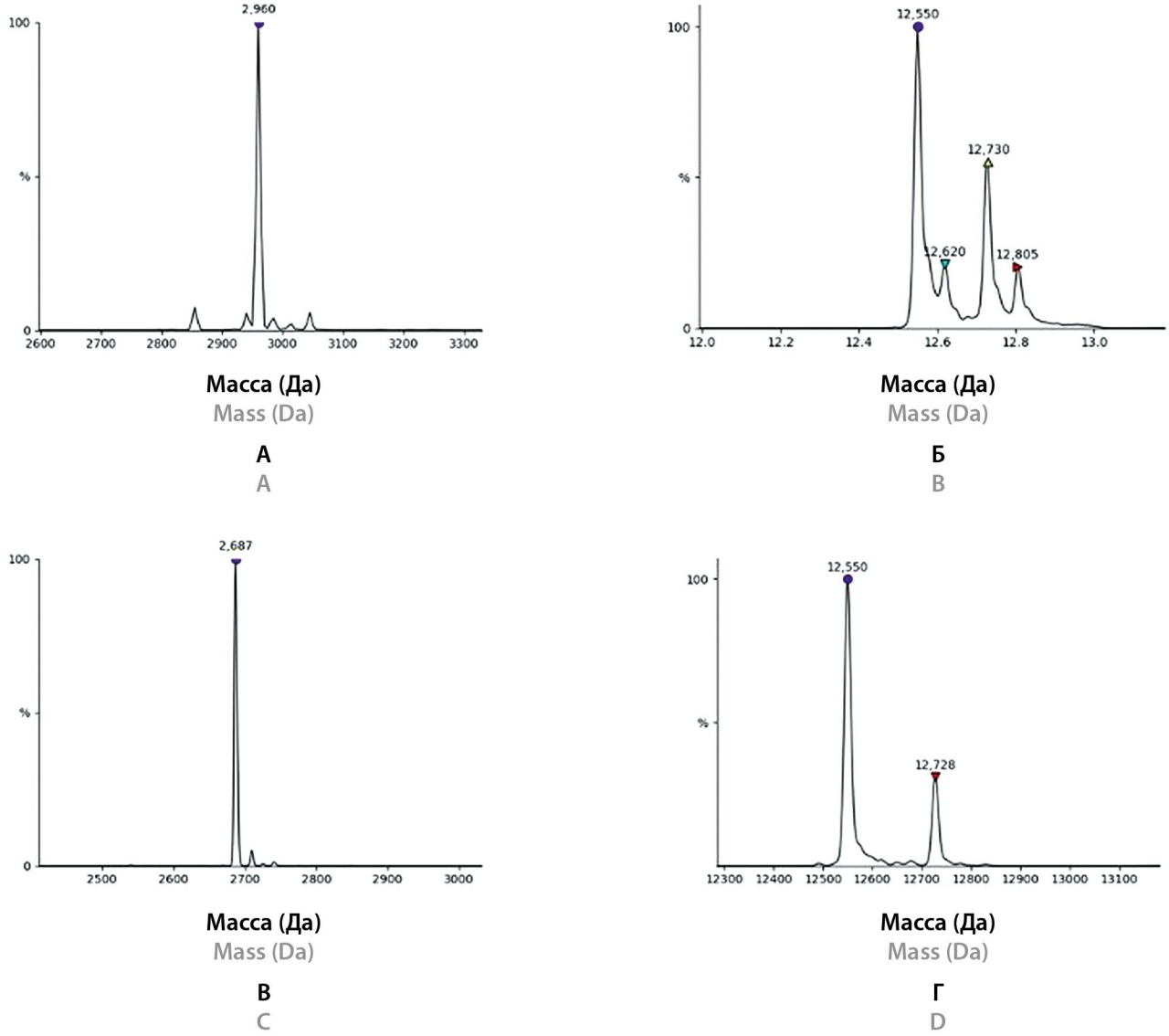


Рисунок 6. Спектры образцов после гидролиза ULP-протеазой.

А, Б – для пептида, полученного из штамма-продуцента BL21\pF1220; В, Г – для пептида, полученного из штамма-продуцента BL21\pF1223

Figure 6. Spectra of samples after ULP hydrolysis.

A, B – peptide expressed by BL21\pF1220; D, C – peptide expressed by BL21\pF1223

дуктивность штаммов составила 2,57 ± 0,09 г/л, 4,27 ± 0,36 г/л для BL21\pF1220, Bl21\pF1223 соответственно. Эффективность технологии, разработанной в данном исследовании, выше, чем сообщалось в других исследованиях [17–21]. Проведена предварительная очистка пептидов и подтверждена их подлинность после гидролиза с помощью ВЭЖХ-МС и ИФА.

Практическая значимость исследования заключается в том, что данный подход может быть использован для получения пептидов с различными физико-химическими свойствами в промышленных масштабах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Fosgerau K., Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*. 2015;20(1):122–128. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.10.003.
2. Gerstein H. C., Rutty. C. J. Insulin Therapy: The Discovery That Shaped a Century. *Canadian Journal of Diabetes*. 2021;45(8):798–803. DOI: 10.1016/j.jcjd.2021.03.002.
3. Lau J.L., Dunn M.K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(10):2700–2707. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.

4. Chandrudu S., Simerska P., Toth I. Chemical methods for peptide and protein production. *Molecules*. 2013;18(4):4373–4388. DOI: 10.3390/molecules18044373.
5. Mason J. M. Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention. *Future Medicinal Chemistry*. 2010;2(12):1813–1822. DOI: 10.4155/fmc.10.259.
6. Guzmán F., Barberis S., Illanes A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2007;10(2):279–314. DOI: 10.2225/vol10-issue2-fulltext-13.
7. Mueller L. K., Baumruck A. C., Zhdanova H., Tietze A. A. Challenges and perspectives in chemical synthesis of highly hydrophobic peptides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:162. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00162.
8. Ratelade J., Miot M.-C., Johnson E., Betton J.-M., Mazodier P., Benaroudj N. Production of recombinant proteins in the *lon*-deficient BL21(DE3) strain of *Escherichia coli* in the absence of the DnaK chaperone. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(11). DOI: 10.1128/AEM.00255-09.
9. Rosano G. L., Ceccarelli E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
10. Fathi-Roudsari M., Akhavian-Tehrani A., Maghsoudi N. Comparison of Three Escherichia coli Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2016;8(1):16–22.
11. Studier F. W., Daegelen P., Lenski R. E., Maslov S., Kim J. F. Understanding the differences between genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3) and comparison of the E. coli B and K-12 genomes. *Journal of Molecular Biology*. 2009;394(4):653–680. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.09.021.
12. Rodríguez V., Asenjo J. A., Andrews B. A. Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides. *Microbial Cell Factories*. 2014;13:65. DOI: 10.1186/1475-2859-13-65.
13. Lv G. S., Huo G. C., Fu X. Y. Expression of milk-derived antihypertensive peptide in Escherichia coli. *Journal of Dairy Science*. 2003;86(6):1927–1931. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73779-5.
14. Li Y., Li X., Wang G. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in Escherichia coli for NMR studies. *Protein Expression and Purification*. 2006;47(2):498–505. DOI: 10.1016/j.pep.2005.10.022.
15. Rao X., Hu J., Li S., Jin X., Zhang C., Cong Y., Hu X., Tan Y., Huang J., Chen Z., Zhu J., Hu F. Design and expression of peptide antibiotic hPAB-β as tandem multimers in Escherichia coli. *Peptides*. 2005;26(5):721–729. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.12.016.
16. Hay R. T. SUMO: a history of modification. *Molecular Cell*. 2005;18(1):1–12. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.03.012.
17. Mirzadeh K., Shilling P. J., Elfageih R., Cumming A. J., Cui H. L., Rennig M., Nørholm M. H. H., Daley D. O. Increased production of periplasmic proteins in Escherichia coli by directed evolution of the translation initiation region. *Microbial Cell Factories*. 2020;19(1):85. DOI: 10.1186/s12934-020-01339-8.
18. Nguyen B.-N., Tieves F., Rohr T., Wobst H., Schöpf F. S., Montoya Solano J. D., Schneider J., Stock J., Uhde A., Kalthoff T., Jaeger K. E., Schmitt L., Schwarz C. Numaswitch: an efficient high-titer expression platform to produce peptides and small proteins. *AMB Express*. 2021;11(1):48. DOI: 10.1186/s13568-021-01204-w.
19. Wu C.-L., Chih Y.-H., Hsieh H.-Y., Peng K.-L., Lee Y.-Z., Yip B.-S., Sue S.-C., Cheng J.-W. High Level Expression and Purification of Cecropin-like Antimicrobial Peptides in Escherichia coli. *Biomedicines*. 2022;10(6):1351. DOI: 10.3390/biomedicines10061351.
20. Zhou L., Lian K., Wang M., Jing X., Zhang Y., Cao J. The antimicrobial effect of a novel peptide LL-1 on Escherichia coli by increasing membrane permeability. *BMC Microbiology*. 2022;22(1):220. DOI: 10.1186/s12866-022-02621-y.
21. Ojima-Kato T., Nishikawa Y., Furukawa Y., Kojima T., Nakano H. Nascent MSKIK peptide cancels ribosomal stalling by arrest peptides in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*. 2023;299(5):104676. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.104676.
22. Shafiee F., Rabbani M., Jahanian-Najafabadi A. Optimization of the Expression of DT386-BR2 Fusion Protein in *Escherichia coli* using Response Surface Methodology. *Advanced Biomedical Research*. 2017;6(1):22. DOI: 10.4103/2277-9175.201334.
23. Shahzadi I., Al-Ghamdi M. A., Nadeem M. S., Sajjad M., Ali A., Khan J. A., Kazmi I. Scale-up fermentation of Escherichia coli for the production of recombinant endoglucanase from Clostridium thermocellum. *Scientific Reports*. 2021;11(1):7145. DOI: 10.1038/s41598-021-86000-z.
24. Singh S. K., Singh S. K., Tripathi V. R., Khare S. K., Garg S. K. Comparative one-factor-at-a-time, response surface (statistical) and bench-scale bioreactor level optimization of thermoalkaline protease production from a psychrotrophic Pseudomonas putida SKG-1 isolate. *Microbial Cell Factories*. 2011;10:114. DOI: 10.1186/1475-2859-10-114.
25. Uhoraningoga A., Kinsella G. K., Henehan G. T., Ryan B. J. The Goldilocks Approach: A Review of Employing Design of Experiments in Prokaryotic Recombinant Protein Production. *Bioengineering*. 2018;5(4):89. DOI: 10.3390/bioengineering5040089.
26. Larentis A. L., de Cássia Cunha Sampaio H., Martins O. B., Rodrigues M. I., Moitinho Alves T. L. Influence of induction conditions on the expression of carbazole dioxygenase components (CarAa, CarAc, and CarAd) from Pseudomonas stutzeri in recombinant Escherichia coli using experimental design. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011;38(8):1045–1054. DOI: 10.1007/s10295-010-0879-2.
27. Lessa-Aquino C., Borges Rodrigues C., Pablo J., Sasaki R., Jasinskas A., Liang L., Wunder E. A., Ribeiro G. S., Vigil A., Galler R., Molina D., Liang X., Reis M. G., Ko A. I., Medeiros M. A., Felgner P. L. Identification of seroreactive proteins of Leptospira interrogans serovar copenhageni using a high-density protein microarray approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(10):e2499. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002499.
28. Lin Y.-P., McDonough S. P., Sharma Y., Chang Y.-F. Leptospira immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen αC domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. *Molecular Microbiology*. 2011;79(4):1063–1076. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07510.x.
29. Latypov V. F., Kornakov I. A., Robustova S. E., Khomutova O. S., Rodionov P. P. Recombinant plasmid DNA pF646, encoding a hybrid polypeptide containing proinsulin

asprate, and a strain of Escherichia coli bacteria – a producer of the hybrid polypeptide containing proinsulin aspart. Patent RUS № RU2729353. 2019. Available at: https://patents.google.com/patent/RU2729353C1/ru. Accessed: 16.05.2024. (In Russ.)
30. Casali N., Preston A. *E. coli* plasmid vectors: methods and applications. Totowa: Humana Press; 2008. 316 p.
31. Ronald M. A. Handbook of Microbiological Media. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 1997.
32. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*. 2006;1(1):16–22. DOI: 10.1038/nprot.2006.4.
33. Umetrics M. User guide to MODDE. 2014.
34. Mandenius C.-F., Brundin A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress*. 2008;24(6):1191–1203. DOI: 10.1002/btpr.67.
35. Beal J., Farny N. G., Haddock-Angelli T., Selvarajah V., Baldwin G. S., Buckley-Taylor R., Gershater M., Kiga D., Marken J., Sanchania V., Sison A., Workman C. T. Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications Biology*. 2020;3(1):512. DOI: 10.1038/s42003-020-01127-5.
36. Dolnik V. Capillary electrophoresis of proteins 2005–2007. *Electrophoresis*. 2008;29(1):143–156. DOI: 10.1002/elps.200700584.
37. Marty M. T., Baldwin A. J., Marklund E. G., Hochberg G. K. A., Benesch J. L., Robinson C. V. Bayesian deconvolution of mass and ion mobility spectra: from binary interactions to polydisperse ensembles. *Analytical Chemistry*. 2015;87(8):4370–4376. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00140.
38. Aucoin M. G., McMurray-Beaulieu V., Poulin F., Boivin E. B., Chen J., Ardelean F. M., Cloutier M., Choi Y. J., Miguez C. B., Jolicoeur M. Identifying conditions for inducible protein production in E. coli: combining a fed-batch and multiple induction approach. *Microbial Cell Factories*. 2006;5:27. DOI: 10.1186/1475-2859-5-27.
39. Kumar J., Bhat S. U., Rathore A. S. Slow post-induction specific growth rate enhances recombinant protein expression in Escherichia coli: Pramlintide multimer and ranibizumab production as case studies. *Process Biochemistry*. 2022;114:21–27. DOI: 10.1016/j.procbio.2022.01.009.
40. Donovan R. S., Robinson C. W., Glick B. R. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of thelac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*. 1996;16(3):145–154. DOI: 10.1007/BF01569997.
41. Mühlmann M., Forsten E., Noack S., Büchs J. Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. *Microbial Cell Factories*. 2017;16(1):220. DOI: 10.1186/s12934-017-0832-4.
42. Song J. M., An Y. J., Kang M. H., Lee Y.-H., Cha S.-S. Cultivation at 6–10 °C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*. 2012;82(2):297–301. DOI: 10.1016/j.pep.2012.01.020.
43. Soleymani B., Mostafaie A. Analysis of Methods to Improve the Solubility of Recombinant Bovine Sex Determining Region Y Protein. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*. 2019;8(3):227–235.
44. De Mey M., De Maeseneire S., Soetaert W., Vandamme E. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2007;34(11):689–700. DOI: 10.1007/s10295-007-0244-2.
45. Warnecke T., Gill R. T. Organic acid toxicity, tolerance, and production in Escherichia coli biorefining applications. *Microbial Cell Factories*. 2005;4:25. DOI: 10.1186/1475-2859-4-25.
46. Wang H., Wang F., Wang W., Yao X., Wei D., Cheng H., Deng Z. Improving the expression of recombinant proteins in E. coli BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e112777. DOI: 10.1371/journal.pone.0112777.
47. Einsfeldt K., Severo Junior J. B., Corrêa Argondizzo A. P., Medeiros M. A., Moitinho Alves T. L., Almeida R. V., Larentis A. L. Cloning and expression of protease ClpP from Streptococcus pneumoniae in Escherichia coli: study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*. 2011;29(41):7136–7143. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.073.
48. Larentis A. L., Monteiro Quintal Nicolau J. F., dos Santos Esteves G., Vareschini D. T., de Almeida F. V. R., Galvão dos Reis M., Galler R., Medeiros M. A. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Research Notes*. 2014;7:671. DOI: 10.1186/1756-0500-7-671.
49. Urban A., Ansmant I., Motorin Y. Optimisation of expression and purification of the recombinant Yol066 (Rib2) protein from Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Chromatography B*. 2003;786(1–2):187–195. DOI: 10.1016/s1570-0232(02)00742-0.
50. Martins Fukuda I., Fidelis Pinto C. F., dos Santos Moreira C., Morais Saviano A., Rebello Lourenço F. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54: e01006. DOI: 10.1590/s2175-97902018000001006.
51. Kiss B., Gottschalk U., Pohlscheidt M., editors. New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins. New York: Springer; 2018.
52. Ladner T., Flitsch D., Lukacs M., Sieben M., Büchs J. Combined dissolved oxygen tension and online viscosity measurements in shake flask cultivations via infrared fluorescent oxygen-sensitive nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019;116(12):3215–3227. DOI: 10.1002/bit.27145.
53. Rosano G. L., Ceccarelli E. A. Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:341. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00341.
54. Jiang D.-L., Yao C.-L., Hu N.-J., Liu Y.-C. Construction of a Tandem Repeat Peptide Sequence with Pepsin Cutting Sites to Produce Recombinant α-Melanocyte-Stimulating Hormone. *Molecules*. 2021;26(20):6207. DOI: 10.3390/molecules26206207.
55. Zhao Z.-H., Zhang C.-X., Li J., Zhang A.-Z., Zhao F.-F., Yu G.-P., Jiang N. Effect of tandem repeats of antimicrobial peptide CC34 on production of target proteins and activity of Pichia pastoris. *Protein Expression and Purification*. 2023;212:106342. DOI: 10.1016/j.pep.2023.106342.

Обзорная статья / Review article

УДК 615.458

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1878

Check for updates

CC BY 4.0

Эффективность и потенциальные возможности применения витаминов и микроэлементов в форме оральных спреев (обзор)

А. Г. Поливанова✉

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева» (РХТУ им. Д. И. Менделеева). 125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9

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

ORCID: А. Г. Поливанова – https://orcid.org/0000-0003-4502-0745.

Статья поступила: 19.07.2024 **Статья принята в печать:** 27.01.2025 **Статья опубликована:** 28.01.2025

Резюме

Введение. Современная фармацевтическая разработка позволяет внедрять в практику все больше новых систем и форм доставки активных компонентов лекарственных средств, усиливающих эффективность их действия по сравнению с традиционными подходами. Современный ритм жизни, обуславливающий зачастую неправильное питание и дисбаланс поступления микронутриентов, приводит к необходимости потребления дополнительных их доз в виде различных аптечных препаратов. Достаточно привлекательными для внедрения в фармацевтическую практику в последние годы становятся спреевые формы витаминов и микроэлементов. Такие готовые формы отличаются доступностью производства, простотой использования, легкостью дозирования и достаточно высокой биодоступностью как у здоровых пациентов, так и лиц, имеющих заболевания желудочно-кишечного тракта и прочие проблемы, связанные с потреблением и усваиванием пищи.

Текст. Доставка лекарств через слизистую оболочку полости рта привлекает все больше внимания из-за ее потенциальных преимуществ по сравнению с другими способами введения. До недавнего времени этот путь рассматривался преимущественно для местного применения, однако в последние годы неуклонно растет количество разработок, связанных с использованием полости рта в качестве портала для доставки активных компонентов лекарственных средств, витаминов и микроэлементов в системный кровоток. Различными научными и клиническими коллективами разработаны и исследованы разнообразные формы оральных препаратов для сублингвального и трансбуккального введения. Особый интерес среди них представляют спреевые формы, как наиболее экономически оправданные и удобные в применении. Наибольший спектр таких разработок касается витамина D и B_{12}, что обусловлено, с одной стороны, наиболее острой проблемой их недостаточности и дефицита среди населения планеты, с другой – низкой биодоступностью, на показатели которой негативно может влиять пищевой рацион, состояние здоровья ЖКТ и прочие факторы. Другие микронутриенты, такие как тиамин, ниацин, пиридоксин, аскорбиновая кислота, кофермент Q и железо, также исследуются и выводятся на рынок в виде оральных спреев для сублингвального применения.

Заключение. Имеющиеся на сегодняшний день результаты разработки и сравнительного анализа оральных форм микронутриентов, в частности данные рандомизированных контролируемых исследований, свидетельствуют об эффективности сублингвального пути введения, которая либо сопоставима, либо превосходит эффективность традиционных путей доставки.

Ключевые слова: готовые формы витаминов и микроэлементов, оральные спреи, сублингвальные и трансбуккальные препараты

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

Вклад авторов. А. Г. Поливанова – обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи, научное редактирование.

Финансирование. Статья написана при финансовой поддержке ООО «Фрезениус Каби».

Для цитирования: Поливанова А. Г. Эффективность и потенциальные возможности применения витаминов и микроэлементов в форме оральных спреев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):67–80. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1878

© Поливанова А. Г., 2025
© Polivanova A. G., 2025

Efficacy and potentiality of vitamins and micronutrients oral sprays supplementation (review)

Anna G. Polivanova✉

D. I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology. 9, Miusskaya Ploshchad, Moscow, 125047, Russia

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

ORCID: Anna G. Polivanova – https://orcid.org/0000-0003-4502-0745.

Received: 19.07.2024 **Accepted:** 27.01.2025 **Published:** 28.01.2025

Abstract

Introduction. Modern pharmaceutical development enables to introduce into practice more than ever new active ingredients delivery systems and forms enhancing actives activity compared to traditional approach (methods). A nowadays pace of life often providing improper feeding and micronutrients intake imbalance leads to necessary administration of micronutrient additional doses in the form of different pharmacies. Over the last years vitamins and minor nutrient elements spray forms are becoming more attractive for introduction into pharmaceutical practice. These dosage forms are characterized by the production availability, usability, easy dosage and sufficiently high bioavailability for both normal patients and ones having gastrointestinal tract diseases and other problems connecting with the food consumption and digestion.

Text. Drug delivery by oral mucosa attracts more attention due to its potential advantages compared to other methods. Until recently this administration way was considered mainly for topical application. However, in recent years number of developments connecting with oral cavity application as a portal for delivery of drugs active ingredients, vitamins and micronutrients into systemic blood has kept steadily growing. Diverse forms of oral drugs for sublingual and buccal administration have been developed by many scientific and clinical teams. Spray forms among them are of particular interest as the most economically viable and easy to use. Most of these developments deal with vitamins D and B_{12}, which arises from the acutest problems of their deficiency among global population, on the one hand, and low bioavailability due to negative effects by dietary intake, gastrointestinal tract health condition and other factors, on the other hand. Other micronutrients such as thiamin, niacin, pyridoxin, ascorbic acid, coenzyme Q and iron are examined and launched into the market in an oral spray form for sublingual application.

Conclusion. The current results of development and comparison study of micronutrients oral forms, in particular, randomized controlled trial data indicate a sublingual administration efficiency which either is similar to or exceeds traditional administration ways.

Keywords: preparative forms of vitamins and micronutrients, oral sprays, sublingual and transbuccal drug forms

Conflict of interest. The author declares that she has no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anna G. Polivanova – literature review, writing the text of the article, scientific editing.

Financing. The article was written with the financial support of LLC "Fresenius Kabi".

For citation: Polivanova A. G. Efficacy and potentiality of vitamins and micronutrients oral sprays supplementation. *Drug development & registration*. 2025;14(1):67–80. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1878

ВВЕДЕНИЕ

Профилактика и лечение заболеваний с помощью лекарств и биологически активных добавок (БАД) вступают в новую эру, в которой используется все больше инновационных систем доставки, доступных для терапевтического использования. Фармацевтические исследования в настоящее время достаточно пристально сосредоточены на разработке разнообразных систем доставки лекарственных средств и витаминно-минеральных комплексов для максимального интегрирования активных компонентов в нужный орган или участок либо повышения динамики их накопления в системном кровотоке в неизменном виде и, как следствие, повышения общей биодоступности.

Растущая статистика частоты заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в современном обществе явно указывает на проблему несбалансированного питания как одного из ключевых провоцирующих этиологических факторов. Приверженность современного общества западному стилю

питания, связанному с потреблением большого количества легкоусвояемых углеводов, низкого уровня клетчатки и белка, присутствием в рационе значительной доли искусственных пищевых компонентов (консервантов, стабилизаторов и прочих добавок), а также продуктов, подвергшихся глубокой переработке, употреблением большого количества кофеинсодержащих и газированных напитков, приводит к дисбалансу поступления основных нутриентов из пищи. Кроме того, весьма существенным фактором в этом процессе оказывается нарушение поступления и всасывания необходимых суточных доз микронутриентов – витаминов и микроэлементов, в том числе и тех, которые человек потребляет в виде БАД. Недостаток микронутриентов приводит к развитию различных заболеваний и/или обострению их хронических форм, в том числе заболеваний ЖКТ, что замыкает порочный круг. Помимо рациона питания, повышенный уровень стресса, физиологические изменения, связанные со старением, влияние внешних экологических факторов также приводят к тому, что эффективность пищеварения в целом и всасывания микронутриентов в частности резко ухудшаются. В этой связи решение физиологических проблем, связанных с нарушением всасывания, может заключаться в возможности обходить пищеварительную систему, доставляя активные питательные вещества непосредственно в кровоток. Большой интерес в этом отношении вызывает использование слизистой оболочки полости рта для системной доставки различных лекарственных препаратов и пищевых добавок, включая отдельные витамины, микроэлементы и витаминно-минеральные комплексы.

В настоящее время для введения активных компонентов через ротовую полость разработан и применяется на практике широкий спектр готовых форм лекарств и БАД, включая таблетки, спреи, жидкости для полоскания рта, гели, пасты и пластыри [1–4]. Среди оральных лекарственных форм для системной доставки на рынок поступили жевательные резинки с кофеином и никотином [5], аэрозольные формы инсулина [6, 7] и прочие средства. Трансбуккальные полимерные пленки нашли широкое применение в качестве освежителей дыхания, местных анестетиков, витаминных добавок, вакцин, в качестве средств от аллергии, препаратов для лечения рвотных состояний и хронических приступов, сопровождающих ряд заболеваний [8]. Было показано, что различные варианты таких пленок – с контролируемым высвобождением и быстрорастворимые – могут быть пригодны для маленьких детей и пациентов с дисфагией [9].

Различные коллоидные системы, такие как мицеллы, липосомы, наноэмульсии и полимерные наночастицы, демонстрируют в настоящее время большой потенциал применения в области систем доставки лекарств и витаминов. Их использование в составе различных готовых препаративных форм, а также для обогащения витаминами пищевых продуктов, позволяет улучшать терапевтический индекс, повышать эффективность и/или снижать их побочные эффекты [10, 11]. В частности, были разработаны трансбуккальный мицеллярный и липосомальный инсулиновые спреи, демонстрирующие на моделях *in vivo* более высокую биодоступность, чем подкожный раствор инсулина, и позволяющие неинвазивно, безболезненно и удобно для пользователя вводить достаточно точную его дозу (сравнимую с инъекцией) [6, 7, 12].

Однако несмотря на широкий спектр разрабатываемых систем и готовых форм для оральной доставки активных компонентов и их потенциально высокую фармакологическую эффективность, одними из наиболее экономически оправданных и привлекательных для разработки и внедрения в фармацевтическую практику остаются спреевые формы в виде простых водорастворимых композиций, которые в последние годы широко используются для введения нутрицевтиков – витаминов, микроэлементов и витаминно-минеральных комплексов. Такие готовые формы БАД отличаются доступностью производства, простотой использования, легкостью дозирования, быстротой действия и достаточно высокой полнотой всасывания как у здоровых пациентов, так и у индивидов, имеющих заболевания ЖКТ и прочие проблемы, связанные с потреблением и усваиванием пищи [13].

Объем мирового рынка витаминных оральных спреев, по данным обзора, представленного на портале «Wise Guy Reports»[1], к концу 2024 года составит более 3,3 млрд долларов США, а к 2032 году, по прогнозам, может превысить 7 млрд долларов США, демонстрируя среднегодовой рост около 11 % в течение прогнозируемого периода (2025–2032 годы). Ключевыми факторами, обуславливающими такой потенциал, можно считать растущую распространенность дефицита ряда витаминов, наблюдаемую практически во всех возрастных группах, а также повышение осведомленности общества о важности приема витаминных добавок.

Среди стран – производителей спреевых готовых лекарственных форм Россия занимает лидирующие позиции, однако на долю оральных препаратов данной группы (в частности, сублингвальных) приходилась по недавним оценкам очень небольшая доля – около 3 % [14]. Тем не менее на Российский рынок в последние годы выведен целый спектр витаминных оральных спреевых препаратов как собственного,

[1] Global vitamin oral spray market research report: by form (liquid, gel, powed), by application (dietary supplements, pharmaceuticals, cosmetics), by target group (adults, children, seniors), by function (immunity boosters, antioxidants, energy supplements) and by regional (North America, Europe, South America, Asia Pacific, Middle East and Africa) – Forecast to 2032. Available at: https://www.wiseguyreports.com/reports/vitamin-oral-spray-market. Accessed: 03.09.2024.

так и зарубежного производства, перечень которых продолжает стремительно пополняться. В частности, компания «Фрезениус Каби» имеет широкую линию спреевых средств «КабиСпрей» для витаминов группы B, витамина D, K_2, C, кофермента Q, а также железа и цинка.

Тем не менее, несмотря на высокие объемы мировых продаж и растущую популярность спреевых форм аптечных препаратов в Европе и США, в нашей стране данная готовая форма БАД все еще не имеет достаточно высокой популярности в обществе. Помимо слабой маркетинговой политики, это может быть обусловлено, в частности, отсутствием каких-либо сравнительных клинических исследований их эффективности, проводимых в российских медицинских исследовательских центрах, а также отсутствием отечественных публикаций в данной области.

Таким образом, **цель данного обзора** – обсудить потенциал применения и эффективность доставки микронутриентов в виде различных препаратов, предназначенных для введения через слизистую оболочку ротоглотки (преимущественно в виде спреев), осветить вопросы, касающиеся механизмов всасывания различных по строению и физико-химическим свойствам активных компонентов в ротовой полости и повышения биодоступности некоторых витаминов, в частности, у особых групп пациентов.

Материалы и методы. Литературный поиск публикаций и данных клинических исследований проводили за период с 2000 года по настоящее время по электронным базам данных SciFinder, E-library, Google Scholar. Поиск данных клинических исследований дополнительно проводили в международном реестре клинических исследований Национального института здоровья США[1] и официальном реестре Минздрава России[2]. Поиск патентных исследований проводили в системе Espasenet. Ключевые запросы (на русском и английском языке), используемые для поиска интересующих публикаций, были следующими: «оральные спреи», «сублингвальные спреи», «трансбуккальные спреи», «сублингвальные препараты», «трансбуккальные препараты», «буккальная доставка лекарств», «буккальная доставка витаминов», «сублингвальный спрей», «доставка витаминов через слизистую оболочку полости рта», «препараты витаминов в форме орального спрея», «препараты витаминов в форме буккального спрея», «препараты витаминов в форме сублингвального спрея», «мукоадгезивные таблетки», «буккальные мукоадгезивные пленки», «буккальные патчи», «препараты убихинона/коэнзима Q в форме орального спрея», «препараты аскорбиновой кислоты в форме орального спрея», «препараты железа для доставки через слизистую оболочку полости рта».

[1] ClinicalTrials.gov. Available at: www.clinicaltrials.gov. Accessed: 19.07.2024.

[2] Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: www.grls.rosminzdrav.ru. Ссылка активна на 19.07.2024.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

За последние два десятилетия различными научными коллективами разработан и исследован целый спектр лекарственных форм витаминов и витаминно-минеральных комплексов, предназначенных для введения через слизистую оболочку полости рта. Основными преимуществами таких препаратов, обуславливающими повышенный интерес и экономическую целесообразность разработок в данной области, являются обеспечение прямого поступления активного компонента в системный кровоток, минуя желудочно-кишечный тракт и, соответственно, разрушающее действие его ферментов, а также нивелирование эффекта метаболической трансформации при первом прохождении через печень, значительно снижающего концентрацию действующего вещества в случае перорального пути введения [13]. Ниже будут рассмотрены ключевые физиологические факторы, обуславливающие эти эффекты.

Особенности ротовой полости как портала для доставки лекарственных средств в системный кровоток

Слизистая оболочка полости рта анатомически делится на эпителий, базальную мембрану и соединительную ткань (рисунок 1). Эпителий состоит примерно из 40–50 слоев многослойных клеток плоского эпителия толщиной 500–800 мкм и служит защитным покрытием для тканей и барьером для проникновения инородных тел. Базальная мембрана представляет собой непрерывный слой внеклеточных компонентов и образует границу между базальным слоем эпителия и соединительными тканями. Считается, что соединительная ткань, наряду с базальной мембраной, не влияет на диффузию большинства соединений, представляющих фармакологический интерес, хотя эти две области могут ограничивать перемещение некоторых макромолекул и комплексов. Для полости рта характерно наличие слюны и слизи, выделяемых большими и малыми слюнными железами [15].

Полость рта является сложной средой для доставки лекарственного средства, поскольку существует множество взаимозависимых и независимых факторов, которые могут снижать концентрацию всасываемого вещества в месте его интеграции и определяют скорость и количество терапевтического средства, поступающего в системный кровоток. К ним относятся мембранные факторы, включающие степень ороговения, площадь поверхности, доступной для всасывания, межклеточные липиды эпителия, особенности строения базальной мембраны, ее толщина, уровень кровоснабжения, скорость обновления клеток и активность ферментов. Помимо мембранных факторов, большое влияние на динамику всасывания активных компонентов оказывают так-

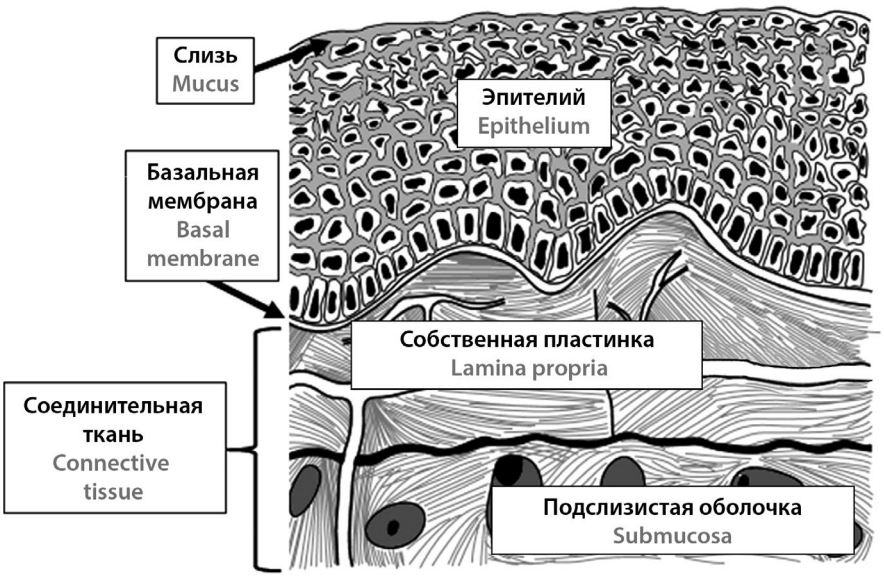


Рисунок 1. Строение слизистой оболочки полости рта

Figure 1. Structure of the oral mucosa

же «внешние» барьеры, в число которых входят слюна и слизь. Последняя, хотя и помогает удерживать мукоадгезивные лекарственные формы, тем не менее может являться потенциальным барьером для проникновения лекарств. Дополнительным внешним фактором является также подвижность тканей ротовой полости [15].

Первые свидетельства возможности всасывания лекарств через слизистую оболочку рта были обнаружены более 100 лет назад [16]. Впоследствии, в 1879 году, сообщалось, что сублингвальное введение нитроглицерина успешно облегчает симптомы классической стенокардии [17]. С тех пор доставка лекарств через слизистую оболочку полости рта привлекает все больше внимания из-за ее потенциальных преимуществ по сравнению с другими способами. До недавнего времени этот путь введения рассматривался преимущественно для местного применения, однако в последние годы неуклонно растет интерес к использованию полости рта в качестве портала для доставки лекарственных средств в системный кровоток. Несмотря на относительно низкую проницаемость эпителия, этот способ введения позволяет получить ряд преимуществ. Высокая степень васкуляризации слизистой оболочки ротоглотки обуславливает быстрое всасывание и поступление лекарственных препаратов непосредственно в системный кровоток, минуя стадии биодеградации в желудочно-кишечном тракте и первичный метаболизм в печени. Для некоторых лекарственных средств это приводит к более быстрому началу действия по сравнению с пероральным приемом, а также является более комфортным и удобным способом доставки, чем внутривенное введение. Более того, в случае лекарственных препаратов, подверженных кислотному гидролизу в желудке, интенсивному метаболизму в печени, а также имеющих низкий уровень усвоения в ЖКТ, сублингвальный и трансбуккальный способ доставки может обеспечить наибольшую биодоступность среди неинвазивных методов.

Несмотря на то что около 60 % всех доступных на современном фармацевтическом рынке препаратов представляют собой твердые лекарственные формы для перорального приема, недавние статистические исследования указывают на большую приверженность пациентов (особенно среди детей и пожилых людей) к жидким пероральным препаратам (сиропы, суспензии, эмульсии и т. д.). В этой связи спреевые формы лекарственных веществ и витаминно-минеральных комплексов могут являться весьма удобной альтернативой соответствующим таблетированным препаратам [17].

Целевыми участками для локальной доставки активного компонента в полость рта являются: щечная, подъязычная, пародонтальная область, язык и десны. К другим целевым объектам воздействия, прилегающим к полости рта, относятся глотка, гортань, аденоиды и миндалины. Доставку лекарственных препаратов в полости рта подразделяют на три вида: сублингвальная, трансбуккальная и местная.

Препараты местного действия для ротовой полости в настоящее время наиболее широко представлены на фармацевтическом рынке. Этот путь введения предполагает непосредственное воздействие препарата на область пародонта и десен для лечения язв, воспалений и очагов бактериальных и грибковых инфекций.

Сублингвальный способ представляет собой системную доставку лекарственных средств через слизистые оболочки, выстилающие дно полости рта и прилегающую к ним систему кровообращения. Данный путь введения препарата предполагает его интеграцию в подъязычную область с последующим всасыванием непосредственно в кровоток через вентральную поверхность языка и дно полости рта. При этом активные компоненты попадают в сетчатую вену, расположенную под слизистой оболочкой полости рта, и транспортируются по лицевым венам, внутренней яремной вене, брахиоцефальной вене и далее поступают в системный кровоток [15]. Вследствие этого всасывание препарата и начало его действия при сублингвальном введении, как правило, происходит в несколько раз быстрее/выше, чем в случае перорального приема в форме таблеток [15, 18].

При трансбуккальной доставке лекарственное средство вводится через слизистые оболочки, выстилающие щеки, и область между деснами и верхней и нижней губами. Слизистая оболочка щеки менее проницаема, чем сублингвальная область, и, как правило, в меньшей степени способна обеспечить быстрое всасывание и хорошую биодоступность. Тем не менее в случае мукоадгезивных препаратов трансбуккальный способ доставки оказывается более эффективным. В подъязычной области отсутствует гладкая и неподвижная слизистая оболочка и она постоянно омывается значительным количеством слюны, что затрудняет интеграцию терапевтической композиции/устройства на ее поверхности [15]. В дополнение к различиям в проницаемости слизистых оболочек рта на степень доставки лекарственного средства также влияют физико-химические свойства доставляемого активного компонента, что, в свою очередь, также может влиять на предпочтительную область введения.

Механизмы всасывания активных компонентов через слизистую оболочку полости рта

Основным механизмом всасывания и транспорта активных компонентов лекарств и БАД слизистой оболочкой полости рта в кровоток является пассивная диффузия. Для такого пассивного переноса существует два пути: параклеточный (межклеточный) и трансцеллюлярный (внутриклеточный) (рисунок 2).

Трансцеллюлярный путь может включать проникновение через апикальную клеточную мембрану, внутриклеточное пространство и базолатеральную мембрану путем пассивного (простая диффузия) либо активного (облегченная диффузия, эндоцитоз) транспорта. Межклеточная проницаемость лекарственного средства является сложной функцией различных физико-химических свойств, включая размер молекул, их липофильность, полярность, потенциал образования водородных связей, заряд и конформацию.

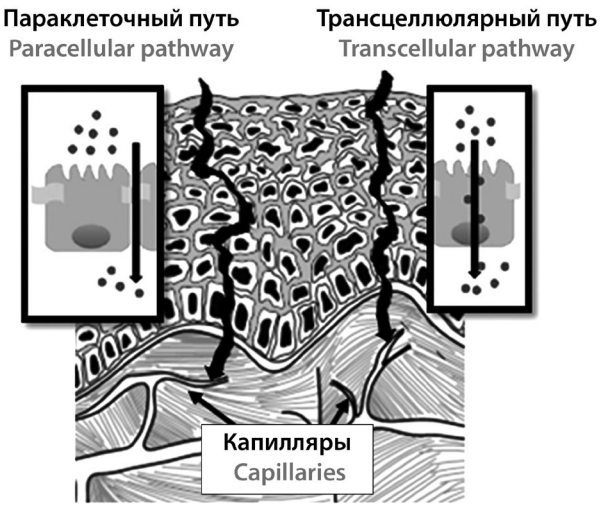


Рисунок 2. Транспорт активных ингредиентов в слизистой оболочке полости рта

Figure 2. Transport of active ingredients in the oral mucosa

Поскольку межклеточные пространства преимущественно гидрофильны по своему характеру, они представляют собой основной барьер для пассивного проникновения липофильных соединений, в то время как клеточная мембрана действует как основное препятствие для проникновения гидрофильных веществ. Вследствие этого ключевым фактором, определяющим механизм транспорта вещества в кровоток, является его липофильность. Поскольку эпителий полости рта многослойный и неоднородный, транспорт каждого конкретного препарата осуществляется, вероятнее всего, комбинацией параклеточного и трансцеллюлярного путей, при этом один из них обычно более предпочтителен, что обусловлено комбинацией физико-химических свойств диффундирующего вещества и окружающей его среды [19].

Транспортировка через водные поры в клеточных мембранах эпителия также возможна для веществ с низким молярным объемом (80 см^3/моль). Молекулы меньшего размера (до 75–100 Да) обычно достаточно быстро проникают через слизистую оболочку, при этом их способность к проникновению снижается по мере увеличения размера. Для гидрофильных макромолекул, таких как пептиды, возможно использование усилителей всасывания, которые успешно изменяют проницаемость буккального эпителия и делают этот путь более подходящим для доставки крупных полярных молекул [15].

Показатели всасывания и биодоступности также зависят от pH в месте интеграции препарата. С повышением pH коэффициент распределения кис-

лотных веществ уменьшается, в то время как основных, наоборот, увеличивается. Ионизация структуры лекарственного средства напрямую связана как с его pKa, так и с pH на поверхности слизистой оболочки. Только неионизированная форма многих слабых кислот и оснований обладает значительной растворимостью в липидах и, следовательно, способностью использовать трансцеллюлярный путь транспорта. Было показано, что максимальная абсорбция этих соединений происходит при том pH, при котором они не диссоциированы, причем абсорбционная способность снижается по мере увеличения степени ионизации.

Муциновая пленка, имеющаяся на поверхности полости рта, может обеспечить возможность удержания мукоадгезивной системы доставки терапевтического агента в контакте со слизистой оболочкой в течение длительного времени. Такая система обеспечивает тесный контакт с абсорбирующей мембраной, тем самым оптимизируя градиент концентрации лекарственного средства на поверхности биологической мембраны и уменьшая дифференцированный путь его доставки. Таким образом, оптимальный состав готовой формы терапевтического агента позволяет реализовать потенциал слизистой оболочки полости рта как места для максимально эффективной контролируемой и/или длительной доставки [18].

Достоинства и ограничения сублингвальной и трансбуккальной систем доставки терапевтических препаратов

Основываясь на представленных выше данных, можно заключить, что препараты, предназначенные для введения лекарств и БАД через слизистую оболочку ротовой полости имеют ряд преимуществ [15]:

- легкость и удобство введения и использования (в частности, они не требуют запивания водой);
- возможность быстрого прекращения терапии в экстренных случаях;
- возможность использования пациентами, страдающими тошнотой, дисфагией, заболеваниями и/или состояниями ЖКТ, ухудшающими всасывание нутриентов, в том числе перенесших бариатрические операции;
- возможность вводить препарат пациентам, находящимся в бессознательном состоянии, и пациентам с травмами;
- возможность использования меньших доз препарата за счет более высокой биодоступности активных компонентов, что, в свою очередь, снижает риск побочных реакций и дает положительный экономический эффект;
- возможность эффективно вводить препараты, нестабильные в кислой среде желудка и обладающие ускоренным метаболизмом ферментами печени;
- возможность повышения скорости всасывания и ускорения начала действия по сравнению с пероральными препаратами;
- универсальность в разработке составов, позволяющая эффективно вводить активные вещества с разной липофильностью (растворимостью в воде) и молекулярной массой, создавать системы пролонгированного действия, обеспечивать разнонаправленное или однонаправленное высвобождение для местного или системного воздействия, повышать точность дозирования.

Однако для оральных систем доставки, в частности использующих трансбуккальный путь введения, можно сформулировать также ряд ограничений [15]:

- посредством них нельзя вводить препараты, нестабильные при щечном pH;
- в их составах нельзя использовать препараты и компоненты, имеющие горький или неприятный привкус, вызывающие раздражение и аллергические реакции слизистой оболочки, изменение цвета зубов, состояния эмали, а также существенно влияющие на состояние микробиоты полости рта;
- такой способ доставки возможен для введения относительно небольших разовых доз препаратов;
- при введении препаратов, обладающих медленной динамикой адсорбции, а также для пролонгированных форм необходимо ограничение приема пищи и питья в периоды интеграции лекарственной формы.

Сублингвальные и трансбуккальные системы доставки витаминов и микроэлементов в форме оральных спреев

В настоящее время наибольший спектр разработок в области системы доставки микронутриентов через слизистую оболочку полости рта посвящен **витамину D**, который является важным жирорастворимым гормоновитамином, регулирующим множество метаболических и физиологических процессов [20]. При потреблении в пределах рекомендуемой диетической нормы витамин D оказывает множество полезных для здоровья действий, в то время как его дефицит связывают с патогенезом целого ряда заболеваний, включая сердечно-сосудистые, некоторые виды рака и аутоиммунные заболевания [20, 21]. Помимо пищевых источников, значительная часть витамина D вырабатывается неферментативным путем при воздействии ультрафиолета на кожу, однако несмотря на наличие этого дополнительного пути, его дефицит остается важной глобальной проблемой, обуславливающей необходимость приема добавок в различной дозировке и продолжительности в зависимости от ряда факторов (возраст, вес, фенотип кожи, общее состояние здоровья, регион проживания, наличие острых и хронических заболеваний). Было показано, что всасывание витамина D в ЖКТ происходит за счет сочетания механизмов пассивной диффузии и активного транспорта, включающих

мембранные переносчики и транспортеры холестерина [21]. Это обуславливает тот факт, что пероральная биодоступность витамина D существенно зависит от сопутствующих нутриентов, в частности длинноцепочечных триглицеридов. Кроме того, у людей с нарушенной (вследствие различных патологических причин) функцией всасывания усвоение витамина D в ЖКТ может происходить на 30–70 % хуже [21]. Таким образом, на сегодняшний день, помимо типичной формы мягких капсул, было предложено несколько новых способов доставки, включая гели, жидкие капли с мицеллярной формой для перорального приема, жевательные резинки и с недавнего времени оральные спреи для сублингвального и трансбуккального применения [20–26].

Первое сравнительное рандомизированное плацебоконтролируемое клиническое исследование эффективности буккального спрея и гелевых капсул с витамином D_3 в эквивалентных дозах 1000 МЕ проведено в 2015 году в индийской популяции на взрослых здоровых добровольцах ($n = 20$) и пациентах с синдромом мальабсорбции ($n = 20$) [25]. Длительность исследования в каждой группе составляла 30 дней. С учетом специфики места проведения исследования – г. Гуджарат (Индия) – можно считать, что регион проживания добровольцев обеспечивает им активный синтез витамина D кожей в течение всего года. Было установлено, что ежедневный прием буккального спрея в 1,9 раза увеличивал среднюю концентрацию кальциферола (25-гидроксивитамина D, 25(OH)D) в сыворотке крови по сравнению с мягкой желатиновой капсулой у здоровых взрослых добровольцев (среднее процентное увеличение по сравнению с исходным уровнем – 43 % против 22 %, $P < 0{,}0001$) и в 2,6 раза – у пациентов с кишечной мальабсорбцией (118 % против 36 %, $P < 0{,}005$). При этом в контрольных группах не наблюдалось существенных изменений уровня кальциферола.

В рандомизированном двустороннем перекрестном исследовании 2016 года Тодд и соавт. [27] проводили оценку эффективности буккального спрея и капсул для приема внутрь с витамином D_3 у взрослых здоровых добровольцев ($n = 22$) в более высокой эквивалентной дозе – 3000 МЕ. Курс приема препаратов проводили в зимнее время на северных широтах (Северная Ирландия, Великобритания) в течение 10 недель, при этом оценка исходных уровней витамина D выявила нормальные показатели (общий 25(OH)D >50 нмоль/л) у 59 %, недостаточность (25(OH)D от 31 до 49 нмоль/л) – у 23 % и клинический дефицит (25(OH)D <30 нмоль/л) – у 18 % добровольцев. В качестве основного результата данного исследования можно отметить отсутствие существенной разницы между группами лечения: процентное увеличение 25(OH)D при применении буккального спрея по сравнению с пероральными капсулами составило 44 и 51 % соответственно ($P = 0{,}313$).

Сравнение результатов двух представленных исследований относительно здоровых добровольцев показывает, что эффективность исследованных спреевых препаратов была примерно одинаковой (43 и 44 % соответственно), в то время как в группах, принимавших капсулы, наблюдались заметные различия (22 и 51 %). Точный механизм этого неясен, однако в исследовании Todd с соавт. [27] выдвинуто предположение, что этническая принадлежность может частично объяснять подобные различия, поскольку азиатская группа характеризуется сниженной проницаемостью кишечника.

В последующем рандомизированном плацебоконтролируемом исследовании 2017 года Тодд и соавт. [28] исследовали влияние аналогичного препарата (3000 МЕ витамина D_3 в день в виде буккального спрея) на уровень 25(OH)D и физические показатели подготовленности спортсменов ($n = 42$). В качестве главного показателя физической подготовленности рассматривался уровень VO_2 max – ключевой маркер аэробной подготовленности и выносливости атлетов. При оценке исходного уровня 25(OH)D у 50 и 22 % добровольцев наблюдалась его недостаточность и дефицит соответственно. При этом общая концентрация 25-гидроксивитамина D существенно не коррелировала с каким-либо оцениваемым показателем физической работоспособности. В ходе исследования было показано, что курсовой 12-недельный прием буккального спрея с витамином D_3 успешно устранил его дефицит по сравнению с группой плацебо (среднее значение по сравнению с исходным уровнем составило $36{,}31 \pm 32{,}34$ против $6{,}11 \pm 23{,}93$ нмоль/л соответственно; $P = 0{,}006$), однако не оказал существенного влияния на VO_2 max, функцию скелетных мышц или легких.

В рандомизированном плацебоконтролируемом исследовании Williams с соавт. [29] с участием здоровых добровольцев ($n = 75$), помимо сравнительной оценки общей эффективности сублингвального спрея и капсул с витамином D_3 (доза 3000 МЕ/день), проведена оценка скорости изменения общего уровня 25(OH)D в сыворотке крови в течение шестинедельного курса приема. В исходном состоянии у 14,9 и 44,6 % добровольцев был выявлен дефицит и недостаточность 25(OH)D соответственно. Общая итоговая оценка показала, что оба препарата имеют практически одинаковую эффективность (рисунок 3), при этом скорость изменения уровня 25(OH)D варьировала от 0,69 до 3,93 нмоль/л в день в группе, принимающей капсулы, и от 0,64 до 3,34 нмоль/л в день – в группе, использующей спрей. При этом среднее изменение уровня 25(OH)D было сопоставимо для обеих групп и составляло примерно 2 нмоль/л в день. Показатели соответствовали простому нормальному распределению в исследуемой популяции (ks = 0,94 и 0,82 для капсул и спрея соответственно).

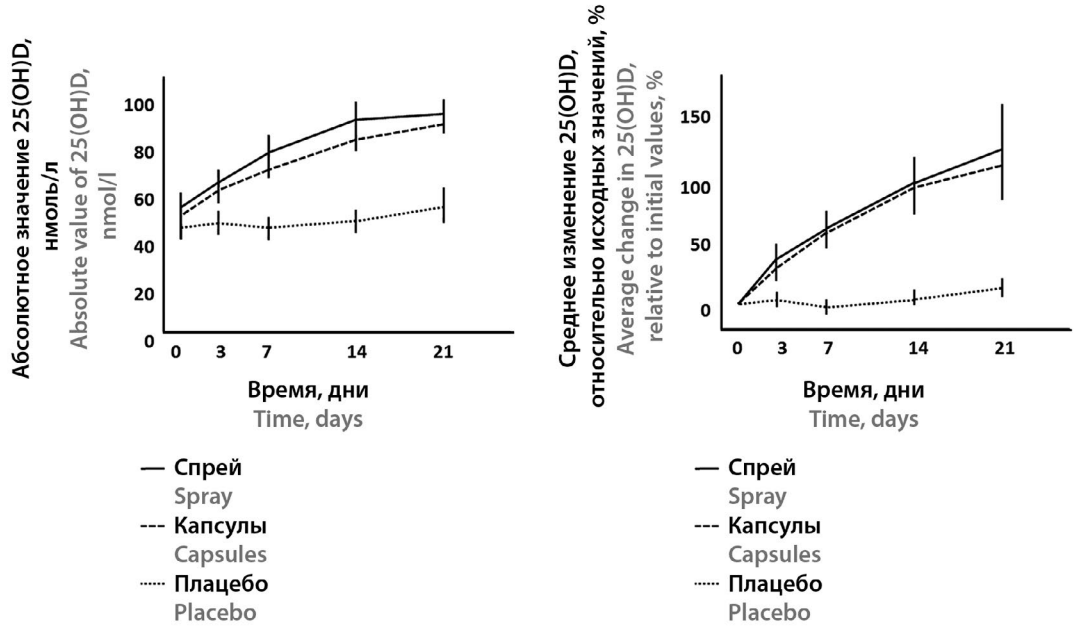


Рисунок 3. Динамика и средние показатели изменения уровня 25(OH)D в исследовании Williams с соавт. [29]

Figure 3. Dynamics and average changes of 25(OH)D level in Williams et al. study [29]

Кроме того, авторами было отмечено, что показатели изменений в обеих группах были выше у лиц с более низким исходным уровнем 25(OH)D.

В детской популяции за последние годы также было проведено несколько сравнительных исследований спреевых препаратов витамина D. В частности, в рандомизированном исследовании 2017 года Penagini с соавт. [30] оценивали сравнительную эффективность буккального спрея (800 МЕ/день) и капель для приема внутрь (750 МЕ/день) с витамином D_3 у детей от 5 до 17 лет ($n = 24$), имеющих нарушения нервной системы и выраженный дефицит 25(OH)D (≤20 нг/мл). Добровольцы были случайным образом распределены на две равные группы и проходили курсовое лечение исследуемыми препаратами в течение 3 месяцев в зимний период. В обеих группах наблюдалось значительное повышение уровня 25(OH)D: с 15,5 до 34,5 нг/мл (на 122 %) в группе, получавшей капли для приема внутрь, и с 11,5 до 26,5 нг/мл (на 136 %) в группе, получавшей буккальный спрей. При этом различия между исходными и конечными показателями паратиреоидного гормона были незначимыми, а показатели костеобразования и резорбции также существенно не изменились в обеих группах. Кроме того, авторы отмечают, что удовлетворенность препаратом по результатам опроса была значительно выше у пациентов, которые использовали спрей.

В более позднем исследовании 2021 года, проведенном Nalbantoğlu с соавт. [24], сравнение трансбуккальной формы витамина D в виде спрея (2000 МЕ, курс приема 6 недель) с пероральными каплями аналогичной дозировки, а также однократной пероральной дозой (300 000 МЕ – stoss-терапия) у здоровых детей и подростков (3–18 лет) с выраженным дефицитом 25(OH)D не показало существенных отличий. Все изученные лекарственные формы также показали себя одинаково эффективными с точки зрения повышения концентрации витамина D до нормальных уровней при краткосрочном лечении. Однако в исследовании того же года, опубликованном E. K. Unsur [22], показано, что у здоровых младенцев, использующих в течение первого года жизни оральный спрей (в дозировке 400 МЕ в день), наблюдаемый уровень витамина D был значимо выше, чем у детей, принимающих капли для перорального приема.

В целом, обобщая данные рассмотренных РКИ, можно дополнительно отметить, что во всех исследованиях спреевых форм витамина D не было зафиксировано каких-либо побочных эффектов как во время, так и после соответствующих периодов приема препаратов. Значительная клиническая неоднородность проведенных РКИ, связанная с разницей в дизайне исследования, продолжительностью приема, назначаемыми дозировками, используемыми методами анализа 25(OH)D, возрастом населения и состоянием здоровья, не позволяет глобально обобщить представленные результаты. Тем не менее можно заключить, что прием витамина D в форме спрея у здоровых добровольцев разных возрастных групп показывает сравнимую и в некоторых случаях превосходящую эффективность по сравнению с перо-

ральными препаратами. В то же время данная форма может быть существенно более эффективной у пациентов, страдающих заболеваниями ЖКТ и дисфагией. В этом отношении можно дополнительно отметить исследование, в котором описан единичный случай применения витамина D сублингвально, в результате которого была устранена его выраженная недостаточность у взрослого пациента с болезнью Крона, перенесшего концевую илеостомию [26]. В ряде рассмотренных исследований отмечается большая приверженность пациентов к использованию спрея, чем пероральной формы витамина D, причем как в детских, так и во взрослых группах. На это также указывает тот факт, что спреевая форма витаминов может являться хорошей альтернативой для тех, кто принимает большое разнообразие пищевых добавок и/или пероральных лекарственных препаратов и хочет ограничить потребление таблеток и капсул.

Вторым по объему представленных исследовательских данных является пул работ, посвященных оральным трансбуккальным формам витаминов группы В, среди которых явным лидером выступает **витамин B_{12} (кобаламин)**. Кобаламин – один из важнейших витаминов, который играет решающую роль в функционировании и метаболизме клеток человека. Витамин B_{12} имеет сложный путь всасывания из пищевой матрицы на большой протяженности ЖКТ, при этом его биодоступность составляет всего 1–5 %. Более того, различные патологические состояния ЖКТ также негативно влияют на данный показатель [31]. В настоящее время на фармацевтическом рынке кобаламин доступен в пероральных, интраназальных, парентеральных и с недавнего времени сублингвальных лекарственных формах [32]. Традиционные пероральные лекарственные формы обладают крайне низкой биодоступностью, в то время как интраназальное введение является дорогостоящим, недостаточно изученным и малопопулярным у большинства людей. Парентеральные препараты также имеют высокую стоимость, их введение является инвазивным, болезненным и требует участия квалифицированного медицинского персонала [31]. В этой связи активно ведется разработка инновационных форм витамина B_{12}, использующих специфические системы доставки, такие как липосомы и наночастицы, и/или альтернативные пути введения – оральные спреи, трансбуккальные мукоадгезивные пленки и зубные пасты [33].

Данные о спреевых оральных формах витамина B_{12} представлены в работе Vitetta с соавт. [32], которые впервые провели сравнительное рандомизированное клиническое исследование с участием взрослых здоровых добровольцев, в ходе которого оценивали профили всасывания витамина B_{12} в течение 6-часового периода приема для пяти различных препаратов: жевательных и рассасывающихся таблеток для перорального приема и оральных спреев для слизистой оболочки полости рта, содержащих липосомальную форму, наночастицы и эмульсию. Было показано, что в эквивалентных дозах (1000 мкг) препарат витамина B_{12} на основе наночастиц – NanoCelle – обеспечивает лучшую биодоступность метилкобаламина. В исследованной линии препаратов оральные спреи на основе NanoCelle и липосом обладали более высоким уровнем усвоения витамина B_{12} (примерно на 28 и 14 % по сравнению с исходным уровнем соответственно), в то время как состав на основе эмульсии, предполагающий простое пассивное проникновение кобаламина через слизистую оболочку подъязычного канала, показал увеличение на 10 %. Наконец, прием таблеток, всасывающихся через желудочно-кишечный тракт, приводил к наименьшему увеличению содержания витамина в плазме крови (на 5 % по сравнению с исходным уровнем). Кроме того, препарат с наночастицами B_{12} (1000 мкг/0,3 мл) продемонстрировал биоэквивалентность по сравнению с таблетированной формой, содержащей в пять раз большую дозу B_{12} (5000 мкг). Отсутствие каких-либо побочных эффектов в ходе исследования у формы NanoCelle (так же как и у других исследованных препаратов) указывает на большой потенциал безопасного использования оральных спреев для лечения и профилактики дефицита витамина B_{12}.

В последние годы эффективность других сублингвальных форм витамина B_{12} в сравнении с пероральным или внутримышечным введением была также тщательно изучена различными исследовательскими группами. Было показано, что сублингвальное введение витамина B_{12} сопоставимо или даже превосходит внутримышечное введение у младенцев (оральные спреи) [34, 35], детей (сублингвальные таблетки и спреи) [34, 36] и взрослых (сублингвальные таблетки) [37], а также может быть хорошей альтернативой для некоторых специфических групп населения (сублингвальные таблетки): пациентов с сахарным диабетом 2 типа, получающих метформин [38], а также веганов и вегетарианцев [39]. В частности, в сравнительном РКИ младенцев и детей в возрасте от 0 до 3 лет, имеющих выраженный дефицит витамина B_{12} (уровень в сыворотке крови <300 нг/л), принимавших в эквивалентных дозах (1000 мг, в течение 2 недель) жидкую пероральную форму цианокобаламина (1-я группа), оральный спрей (2-я группа) или препарат для внутримышечного введения (3-я группа), продемонстрировано, что сублингвальный метилкобаламин столь же эффективен, как и при традиционных способах его введения [34].

В целом данные представленных исследований позволяют заключить, что слизистая оболочка полости рта может обеспечить сравнимое или более высокое усвоение кобаламина и прочих водораст-

воримых витаминов по сравнению с ЖКТ, причем сублингвальные препараты можно использовать в более низких дозах по сравнению с пероральными формами [32].

Данные об индивидуальных исследованиях сублингвальных форм других **витаминов группы В** [тиамин (B_1), ниацин (B_3) и пиридоксин (B_6)] представлены на сегодняшний день преимущественно для форм мукоадгезивных пленок [10, 40], которые демонстрируют достаточно высокий потенциал систем доставки водорастворимых витаминов через ротовую полость. РКИ сублингвальных спреев проводились преимущественно для комплексных препаратов. В частности, Jacobson с соавт. [41] в ходе сравнительного плацебоконтролируемого исследования провели оценку эффективности сублингвального эргогенного спрея, содержащего комплекс водорастворимых витаминов, микроэлементов, аминокислот и кофермента Q, в отношении увеличения мышечной силы спортсменов. Средний возраст добровольцев составлял 20 лет. В качестве критериев оценки был протестирован ряд силовых показателей: жим лежа, вертикальный прыжок и сила хвата. Недельный прием препарата показал значительное улучшение только по одному показателю, что, по мнению авторов исследования, может быть связано с недостаточной дозой и необходимостью ее увеличения и точной корректировки в зависимости от веса добровольцев, а также назначения более длительного курса приема.

Кофермент Q10, как один из ключевым жирорастворимых витаминоподобных микронутриентов, также привлекает к себе особое внимание в качестве объекта для разработки систем доставки через слизистые оболочки ротовой полости. Он уменьшает накопление свободных радикалов, улучшает работу сердечно-сосудистой системы, способствует выработке энергии и укрепляет иммунную систему, что обуславливает его активное применение в терапии и профилактике ряда заболеваний и патологических состояний, а также в качестве эргогенного средства для лиц с активной физической нагрузкой [41]. Гидрофобность молекулы кофермента Q_{10} обуславливает плохие показатели всасывания при пероральном приеме, поэтому оптимизация рецептур и способов его доставки является востребованной терапевтической задачей. Спреевая форма кофермента Q_{10} для орального или интраназального введения была описана еще в 2003 году в патентном исследовании Enzmann и Homburg [42] как средство для профилактики и лечения болевых состояний, возникающих при мигрени и невропатии, а также как вспомогательный препарат в терапии заболеваний, связанных с нарушением когнитивных функций. На сегодняшний день многие достижения в области повышения биодоступности кофермента Q_{10} были достигнуты посредством разработки новых форм лекарственных средств, таких как твердая дисперсия, липосомы, мицеллы, наночастицы, наноэмульсии, самоэмульгирующиеся системы и прочие инновационные системы доставки [43]. Сравнительное РКИ, касающееся его сублингвальной формы, представлено только в одном исследовании [44], в котором были протестированы три коммерческих препарата: два – в форме капсул, содержащих убихинол и убихинон (по 150 мг), и один сублингвальный липосомальный препарат с убихиноном (в дозе 40 мг/мл на 2 нажатиях помпы), который, хотя и значимо повышал уровень кофермента в плазме крови, тем не менее не продемонстрировал превосходящей эффективности над пероральными средствами.

Витамин С (аскорбиновая кислота), являющийся важнейшим гидрофильным антиоксидантом и специфическим кофактором многих ферментативных реакций, отвечает за целый спектр физиологических показателей здоровья человека, включая состояние соединительной ткани, работу иммунной системы и нейропротекцию. Антиоксидантные свойства и роль аскорбиновой кислоты в поддержании оптимальных показателей здоровья полости рта обуславливают ее использование в различных оральных спреевых композициях местного действия для лечения и профилактики воспалительных процессов пародонта, а также удаления и ингибирования образования зубных биопленок, провоцирующих появление зубного налета и зубного камня [45–49]. Кроме того, ряд исследований, касающихся разработки трансбуккальных мукоадгезивных пленок, содержащих аскорбиновую кислоту [50, 51], демонстрирует потенциал ее применения для системной доставки через ротовую полость, однако сравнительных РКИ в этой области пока не проводилось.

Железодефицитные состояния, наиболее частой причиной которых является неправильное и несбалансированное питание, являются достаточно частыми в современном обществе. Основную группу риска составляют вегетарианцы, люди, придерживающиеся жестких диет, а также пожилые люди и дети – из-за сниженной способности кишечника к усвоению железа. Кроме того, нарушение всасывания железа в желудочно-кишечном тракте может наблюдаться после бариатрических операций, в результате атрофии слизистой желудка, снижения секреции соляной кислоты, ожирения, а также при хронических заболеваниях ЖКТ (болезнь Крона, целиакия и др.). Железодефицитная анемия нередко диагностируется у детей, подростков и беременных женщин, поскольку у них ежедневная потребность в железе выше, чем в среднем в популяции. Пероральный прием препаратов железа, хотя и является традиционным подходом к профилактике и лечению этих состояний, обладает рядом недостатков, обусловленных низкой биодоступностью (особенно на фоне обостренных патологий ЖКТ), плохой переносимостью и проявлением многих побочных эффектов, таких как тошнота, диарея, запор, боль в животе или изжога, что, в свою

очередь, приводит к крайне низкой приверженности пациентов данному виду терапии. В этой связи разработка новых форм (систем доставки) и способов введения препаратов железа является весьма интересным направлением фармацевтической разработки [52, 53]. В частности, в японском патентном исследовании [53] представлен широкий спектр рецептур сублингвальных препаратов двухвалентного железа на основе сульфата, цитрата, аскорбата, фумарата, глицината или глюконата железа, которые продемонстрировали большой потенциал такого пути его системной доставки, позволяющего в то же время избежать побочных эффектов, характерных для перорального приема.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая все вышеуказанные сведения о разработанных и применяемых на практике системах и формах доставки витаминов и микроэлементов через слизистую оболочку полости рта, можно отметить, что этот способ введения имеет доказанную эффективность и высокий потенциал востребованности в обществе. Всасывание активных компонентов в ротовой полости позволяет избежать их модификации ферментами ЖКТ и первичного метаболизма в печени, что в ряде случаев позволяет снизить вводимую дозу, нивелируя риски побочных эффектов и обеспечивая довольно выраженный положительный экономический эффект, особенно при высокой себестоимости активной субстанции. Спреевая форма введения витаминов и микроэлементов может являться гораздо более предпочтительной для некоторых групп пациентов, как здоровых – дети и пожилые люди, так и страдающих острыми или хроническими заболеваниями ЖКТ, а также перенесших бариатрические операции. Кроме того, в ряде исследований отмечается большая приверженность терапии подобными препаратами в связи с явным удобством и простотой использования, что в современном активном ритме жизни общества является немаловажным достоинством.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Puratchikody A., Prasanth V.V., Mathew S., Balaraman A. K. Buccal Drug Delivery: Past, Present and Future. *International Journal of Drug Delivery*. 2011;3(2):171–184.
2. Kianfar F., Chowdhry B. Z., Antonijevic M. D., Boateng J. S. Novel films for drug delivery via the buccal mucosa using model soluble and insoluble drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2012;38(10):1207–1220. DOI: 10.3109/03639045.2011.644294.
3. Patel K. V., Patel N. D., Dodiya H. D., Shelat P. K. Buccal bioadhesive drug delivery system: an overview. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2011;2(2):600–609.
4. Kumar Sharma G., Kumar Sharma P., Bansal M. A review on mucoadhesive buccal patch as a novel drug delivery system. *Pharma Science Monitor*. 2012;3(2):30.
5. Kamimori G. H., Karyekar C. S., Otterstetter R., Cox D. S., Balkin T. J., Belenky G. L., Eddington N. D. The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;234(1–2):159–167. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00958-9.
6. Modi P., Mihic M., Lewin A. The evolving role of oral insulin in the treatment of diabetes using a novel RapidMist system. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2002;18(1):38–42. DOI: 10.1002/dmrr.208.
7. Rizk El Maalouf I., Capoccia K., Priefer R. Non-invasive ways of administering insulin. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2022;16(4):102478. DOI: 10.1016/j.dsx.2022.102478.
8. Chaturvedi A., Srivastava P., Yadav S., Bansal M., Garg G., Kumar Sharma P. Fast dissolving films: a review. *Current Drug Delivery*. 2011;8(4):373–380. DOI: 10.2174/156720111795768022.
9. Boateng J., Mani J., Kianfar F. Improving drug loading of mucosal solvent cast films using a combination of hydrophilic polymers with amoxicillin and paracetamol as model drugs. *BioMed Research International*. 2013;198137. DOI: 10.1155/2013/198137.
10. Abd El Azim H., Nafee N., Ramadan A., Khalafallah N. Liposomal buccal mucoadhesive film for improved delivery and permeation of water-soluble vitamins. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;488(1–2):78–85. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.052.
11. Tan Y.-l., Liu C.-G. Preparation and characterization of self-assemblied nanoparticles based on folic acid modified carboxymethyl chitosan. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011;22(5):1213–1220. DOI: 10.1007/s10856-011-4302-y.
12. Yang T.-Z., Wang X.-T., Yan X.-Y., Zhang Q. Phospholipid deformable vesicles for buccal delivery of insulin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2002;50(6):749–753. DOI: 10.1248/cpb.50.749.
13. Parmar K., Patel M. B. A review on sublingual spray: novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017;8(11):4533-4539. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.8(11).4533-39.
14. Khadzhieva Z. D., Pozdnyakova A. E., Zagorskaya N. S., Pozdnyakov D. I. Analysis of the sprays range on the Russian pharmaceutical market. *Health and Education Millennium*. 2019;21(5):42–46. (In Russ.) DOI: 10.26787/nydha-2226-7425-2019-21-5-42-46.
15. Sharma N., Jain S., Sardana S. Buccoadhesive drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 2013;3(1):1–15.
16. Patel V. F., Liu F., Brown M. B. Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2011;153(2):106–116. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.01.027.
17. Thosar M. Intra oral sprays – An overview. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. 2011;2(10):1203.
18. Narang N., Sharma J. Sublingual mucosa as a route for systemic drug delivery. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. 2011;3:18–22.

19. Kurosaki Y., Takatori T., Nishimura H., Nakayama T., Kimura T. Regional variation in oral mucosal drug absorption: permeability and degree of keratinization in hamster oral cavity. *Pharmaceutical Research*. 1991;8(10):1297–1301. DOI: 10.1023/a:1015812114843.
20. Grammatikopoulou M. G., Gkiouras K., Nigdelis M. P., Bogdanos D. P., Goulis D. G. Efficacy of Vitamin D3 Buccal Spray Supplementation Compared to Other Delivery Methods: A Systematic Review of Superiority Randomized Controlled Trials. *Nutrients*. 2020;12(3):691. DOI: 10.3390/nu12030691.
21. Pritchard L., Lewis S., Hickson M. Comparative effectiveness of vitamin D supplementation via buccal spray versus oral supplements on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in humans: a systematic review protocol. *JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports*. 2019;17(4):487–499. DOI: 10.11124/JBISRIR-2017-003907.
22. Unsur E. K. Vitamin D levels of the healthy infants using oral spray or drop form of vitamin D supplement in the first year of life. *Northern Clinics of Istanbul*. 2021;8(1):31–36. DOI: 10.14744/nci.2020.09471.
23. Bakr I. S., Zaki A. M., El-Moslemany R. M., Elsaka R. O. Vitamin D oral gel for prevention of radiation-induced oral mucositis: A randomized clinical trial. *Oral Diseases*. 2021;27:1197–1204. DOI: 10.1111/odi.13650.
24. Nalbantoğlu Ö., Acar S., Arslan G., Köprülü Ö., Özkan B. Investigating the Efficiency of Vitamin D Administration with Buccal Spray in the Treatment of Vitamin D Deficiency in Children and Adolescents. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2021;13(4):426–432. DOI: 10.4274/jcrpe.galenos.2021.2021.0047.
25. Satia M. C., Mukim A. G., Tibrewala K. D., Bhavsar M. S. A randomized two way cross over study for comparison of absorption of vitamin D3 buccal spray and soft gelatin capsule formulation in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption. *Nutrition Journal*. 2015;14:114. DOI: 10.1186/s12937-015-0105-1.
26. McCullough P., Heaney R. Correction of vitamin D deficiency using sublingually administered vitamin D2 in a Crohn's disease patient with mal-absorption and a new ileostomy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;173:211–214. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.12.021.
27. Todd J. J., McSorley E. M., Pourshahidi L. K., Madigan S. M., Laird E., Healy M., Magee P. J. Vitamin D_3 supplementation in healthy adults: a comparison between capsule and oral spray solution as a method of delivery in a wintertime, randomised, open-label, cross-over study. *British Journal of Nutrition*. 2016;116(8):1402–1408. DOI: 10.1017/S0007114516003470.
28. Todd J. J., McSorley E. M., Pourshahidi L. K., Madigan S. M., Laird E., Healy M., Magee P. J. Vitamin D_3 supplementation using an oral spray solution resolves deficiency but has no effect on VO_2 max in Gaelic footballers: results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *European Journal of Nutrition*. 2017;56(4):1577–1587. DOI: 10.1007/s00394-016-1202-4.
29. Williams C. E., Williams E. A., Corfe B. M. Rate of change of circulating 25-hydroxyvitamin D following sublingual and capsular vitamin D preparations. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2019;73:1630–1635. DOI: 10.1038/s41430-019-0503-0.
30. Penagini F., Borsani B., Maruca K., Giosia V., Bova S., Mastrangelo M., Zuccotti G. V., Mora S. Short-Term Vitamin D Supplementation in Children with Neurodisabilities: Comparison of Two Delivery Methods. *Hormone Research in Paediatrics*. 2017;88(3–4):281–284. DOI: 10.1159/000479690.
31. Ma'ali A., Naseef H., Qurt M., Abukhalil A. D., Rabba A. K., Sabri I. The Preparation and Evaluation of Cyanocobalamin Mucoadhesive Sublingual Tablets. *Pharmaceuticals*. 2023;16(10):1412. DOI: 10.3390/ph16101412.
32. Vitetta L., Zhou J., Manuel R., Dal Forno S., Hall S., Rutolo D. Route and Type of Formulation Administered Influences the Absorption and Disposition of Vitamin B12 Levels in Serum. *Journal of Functional Biomaterials*. 2018;9(1):12. DOI: 10.3390/jfb9010012.
33. Yadav R. K., Mishra S., Jain D. Methylcobalamine (Vitamin B12): Water Soluble Vitamin with Various Pharmacological Aspect. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2021;11(1):130–137. DOI: 10.22270/jddt.v11i1.4488.
34. Kiliç B. O., Kiliç S., Eroğlu E. Ş., Gül E., Apak F. B. B. Sublingual Methylcobalamin Treatment Is as Effective as Intramuscular and Peroral Cyanocobalamin in Children Age 0–3 Years. *Hematology*. 2021;26(1):1013–1017. DOI: 10.1080/16078454.2021.2010877.
35. Varkal M. A., Karabocuoglu M. Efficiency of the Sublingual Route in Treating B12 Deficiency in Infants. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2023;93(3):226–232. DOI: 10.1024/0300-9831/a000724.
36. Tugba-Kartal A., Cagla-Mutlu Z. Comparison of Sublingual and Intramuscular Administration of Vitamin B12 for the Treatment of Vitamin B12 Deficiency in Children. *Revista de investigación clínica*. 2020;72(6):380–385. DOI: 10.24875/RIC.20000208.
37. Bensky M. J., Ayalon-Dangur I., Ayalon-Dangur R., Naamany E., Gafter-Gvili A., Koren G., Shiber S. Comparison of Sublingual vs. Intramuscular Administration of Vitamin B12 for the Treatment of Patients with Vitamin B12 Deficiency. *Drug Delivery and Translational Research*. 2019;9(3):625–630. DOI: 10.1007/s13346-018-00613-y.
38. Parry-Strong A., Langdana F., Haeusler S., Weatherall M., Krebs J. Sublingual Vitamin B12 Compared to Intramuscular Injection in Patients with Type 2 Diabetes Treated with Metformin: A Randomised Trial. *The New Zealand Medical Journal*. 2016;129(1436):67–75.
39. Del Bo' C., Riso P., Gardana C., Brusamolino A., Battezzati A., Ciappellano S. Effect of Two Different Sublingual Dosages of Vitamin B_{12} on Cobalamin Nutritional Status in Vegans and Vegetarians with a Marginal Deficiency: A Randomized Controlled Trial. *Clinical Nutrition*. 2019;38(2):575–583. DOI: 10.1016/j.clnu.2018.02.008.
40. Eleftheriadis G., Monou P. K., Andriotis E., Mitsouli E., Moutafidou N., Markopoulou C., Bouropoulos N., Fatouros D. Development and Characterization of Inkjet Printed Edible Films for Buccal Delivery of B-Complex Vitamins. *Pharmaceuticals*. 2020;13(9):203. DOI: 10.3390/ph13090203.
41. Jacobson B. H., Smith D. B., Warren A. J., Glass R. G., Kline C., Fedick J. L., Stemm J. Assessment of the Effectiveness of a Sublingual, Ergogenic Spray on Muscle Strength and

Power. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2009;23(8):2326–2330. DOI: 10.1519/JSC.0b013e3181bab481.
42. Enzmann F. Spray containing ubiquinone Qn. United States patent US 20050019268A1. Available at: https://patents.google.com/patent/US20050019268A1/en. Accessed: 27.01.2005.
43. Maciejewska-Stupska K., Czarnecka K., Szymański P. Bioavailability enhancement of coenzyme Q_{10}: An update of novel approaches. *Archiv der Pharmazie*. 2024;29:e2300676. DOI: 10.1002/ardp.202300676.
44. Vitetta L., Leong A., Zhou J., Dal Forno S., Hall S., Rutolo D. The Plasma Bioavailability of Coenzyme Q10 Absorbed from the Gut and the Oral Mucosa. *Journal of Functional Biomaterials*. 2018;9(4):73. DOI: 10.3390/jfb9040073.
45. Leonhardt C. G., Busby J. C. Oral hygiene products containing ascorbic acid and method of using the same. United States patent US 20080057007A1. Available at: https://patents.google.com/patent/US20080057007A1/en. Accessed: 06.03.2008.
46. Montgomery R. E. Topical oral care compositions. United States patent US 20020137728A1. Available at: https://patents.google.com/patent/WO2002058662A2/en. Accessed: 26.09.2002.
47. Leonhardt C. G., Busby J. C. Oral hygiene products and method of using the same. United States patent US 8163271B2. Accessed: 24.04.2012.
48. Murererehe J., Uwitonze A. M., Nikuze P., Patel J., Razzaque M. S. Beneficial Effects of Vitamin C in Maintaining Optimal Oral Health. *Frontiers in Nutrition*. 2022:8:805809. DOI: 10.3389/fnut.2021.805809.
49. Hersh T. Intra-oral antioxidant preparations. United States patent US 5906811A. Available at: https://patents.google.com/patent/US5906811A/en. Accessed: 25.05.1999.
50. Kristó K., Módra S., Hornok V., Süvegh K., Ludasi K., Aigner Z., Kelemen A., Sovány T., Pintye-Hódi K., Regdon G. Investigation of Surface Properties and Free Volumes of Chitosan-Based Buccal Mucoadhesive Drug Delivery Films Containing Ascorbic Acid. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):345. DOI: 10.3390/pharmaceutics14020345.
51. Atri A. Formulation and characterization of oral dissolving films with ascorbic acid. Selected Full-Text Master Theses. Available at: https://digitalcommons.liu.edu/brooklyn_fulltext_master_theses/8. Accessed: 19.07.2024.
52. Maciel V. B. V., Remedio L. N., Yoshida C. M. P., Carvalho R. A. Carboxymethyl cellulose-based orally disintegrating films enriched with natural plant extract for oral iron delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;66:102852. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102852.
53. Bosi S. P., Lapin D., Sacchetti, Marchi A., Cristina E. P. New methods of iron administration and new formulations suitable for this purpose. Japan patent JP 2016523954A. Accessed: 12.08.2016.

АНАЛИТИКА ЭКСПО

23-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

23–25.04.2025
Москва, Крокус Экспо

Получите билет

analitikaexpo.com

ITE ОРГАНИЗАТОР ORGANISER

0+

Ваш промокод

pharmjournal

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.014

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1841

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка состава и технологии суспензии для приема внутрь на основе твердой дисперсии албендазола

Ю. И. Тихомирова[1]✉, Н. О. Карабинцева[1], В. И. Евсеенко[2], Е. С. Метелева[2], А. В. Душкин[2], М. В. Зеликман[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России). 630091, Россия, г. Новосибирск, ул. Красный проспект, д. 52

[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химии твердого тела и механохимии» Сибирского отделения Российской академии наук (ИХТТМ СО РАН). 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Кутателадзе, д. 18

✉ **Контактное лицо:** Тихомирова Юлия Игоревна. **E-mail:** yulya.tikhomirova.93@bk.ru

ORCID: Ю. И. Тихомирова – https://orcid.org/ 0009-0008-5066-678X;
Н. О. Карабинцева – https://orcid.org/ 0009-0007-1159-2776;
В. И. Евсеенко – https://orcid.org/ 0000-0002-0686-3099;
Е. С. Метелева – https://orcid.org/ 0000-0002-6255-5381;
А. В. Душкин – https://orcid.org/ 0000-0003-0269-4651;
М. В. Зеликман – https://orcid.org/ 0000-0001-8706-5840.

Статья поступила: 03.06.2024 **Статья принята в печать:** 05.02.2025 **Статья опубликована:** 07.02.2025

Резюме

Введение. Применение метода механохимического синтеза для получения твердых дисперсий (ТД) албендазола (АЛБ) позволило увеличить его антигельминтную активность и биодоступность, а также снизить токсичность, в связи с чем актуальным является вопрос разработки состава и технологии доступного отечественного лекарственного препарата на основе ТД АЛБ в рациональной лекарственной форме (ЛФ).

Цель. Разработка и фармакотехнологическое исследование суспензии для приема внутрь на основе ТД АЛБ, полученной механохимическим твердофазным синтезом.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись субстанция АЛБ, сухой экстракт солодки (ЭС) и их ТД, полученные механохимическим твердофазным синтезом в массовом соотношении 1:5, 1:10 и 1:20 при продолжительности механической обработки 2 часа, 8 часов и 16 часов. В качестве вспомогательных веществ использованы вещества, разрешенные для медицинского применения. Исследование растворимости АЛБ из ТД оценивали по содержанию АЛБ в водной среде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Изучение свойств ТД и полученных ЛФ было проведено в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XV издания.

Результаты и обсуждение. Технологические свойства ТД существенно не изменяются в зависимости от массового соотношения лекарственного вещества (ЛВ) и носителя и времени их механообработки, вследствие чего определяющим фактором выбора оптимальной ТД для разработки ЛФ является значение растворимости АЛБ в воде. Использование метода влажного гранулирования и добавление к ТД наполнителя, стабилизатора и консерванта позволяет получить порошки для приготовления суспензии с удовлетворительными технологическими характеристиками.

Заключение. В ходе исследования были изучены технологические характеристики ТД АЛБ с ЭС, полученных механохимическим твердофазным синтезом, а также определена оптимальная ТД с точки зрения наибольшей растворимости АЛБ в воде. Были подобраны вспомогательные вещества, разработан состав суспензии, восстановленной из гранул ТД АЛБ, с оптимальными технологическими параметрами. Проведены фармакотехнологические исследования суспензий на основе ТД АЛБ.

Ключевые слова: албендазол, экстракт солодки, твердые дисперсии, суспензия

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

Вклад авторов. Н. О. Карабинцева, А. В. Душкин спланировали эксперимент. Ю. И. Тихомирова, В. И. Евсеенко. Е. С. Метелева, М. В. Зеликман проводили запланированные исследования. Ю. И. Тихомирова, Н. О. Карабинцева проводили обработку и интерпретацию результатов исследования. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

© Тихомирова Ю. И., Карабинцева Н. О., Евсеенко В. И., Метелева Е. С., Душкин А. В., Зеликман М. В., 2025
© Tikhomirova Yu. I., Karabintseva N. O., Evseenko V. I., Meteleva E. S., Dushkin A. V., Zelikman M. V., 2025

Для цитирования: Тихомирова Ю. И., Карабинцева Н. О., Евсеенко В. И., Метелева Е. С., Душкин А. В., Зеликман М. В. Разработка состава и технологии суспензии для приема внутрь на основе твердой дисперсии албендазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):82–91. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1841

Development of the composition and technology of suspension for oral administration based on a solid dispersion of albendazole

Yulia I. Tikhomirova[1]✉, Natalia O. Karabintseva[1], Veronica I. Evseenko[2], Elizaveta S. Meteleva[2], Alexander V. Dushkin[2], Maxim V. Zelikman[2]

[1] Novosibirsk State Medical University. 52, Krasny prospekt str., Novosibirsk, 630091, Russia
[2] Federal State Budgetary Establishment of Science Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ISSCM SB RAS). 18, Kutateladze str., Novosibirsk, 630090, Russia

✉ **Corresponding author:** Yulia I. Tikhomirova. **E-mail:** yulya.tikhomirova.93@bk.ru

ORCID: Yulia I. Tikhomirova – https://orcid.org/ 0009-0008-5066-678X;
Natalia O. Karabintseva – https://orcid.org/ 0009-0007-1159-2776;
Veronica I. Evseenko – https://orcid.org/ 0000-0002-0686-3099;
Elizaveta S. Meteleva – https://orcid.org/ 0000-0002-6255-5381;
Alexander V. Dushkin – https://orcid.org/ 0000-0003-0269-4651;
Maxim V. Zelikman – https://orcid.org/ 0000-0001-8706-5840.

Received: 03.06.2024 **Accepted:** 05.02.2025 **Published:** 07.02.2025

Abstract

Introduction. The use of the method of mechanochemical synthesis to obtain solid dispersions (SD) of albendazole (ALB) has allowed increasing its anthelmintic activity and bioavailability, as well as reducing its toxicity, and therefore the issue of developing the composition and technology of an affordable domestic drug based on SD of ALB in a rational dosage form (DF) is relevant.

Aim. Development and pharmacotechnological study of suspension for oral administration based on TD ALB obtained by mechanochemical solid-phase synthesis.

Materials and methods. The objects of the study were ALB substance (ALB), licorice dry extract (LE) and their SD obtained by mechanochemical solid-phase synthesis in a mass ratio of 1:5, 1:10 and 1:20, with a mechanical treatment duration of 2 hours, 8 hours and 16 hours. Substances approved for medical use are used as excipients. The study of the solubility of ALB from SD was evaluated by the content of ALB in an aqueous medium using high-performance liquid chromatography. The study of the properties of SD and the obtained DF was carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (SP RF) XV edition.

Results and discussion. The technological properties of SD do not change significantly depending on the mass ratio of medicinal substance (MS) to the carrier and the time of their machining, as a result of which the determining factor in choosing the optimal SD for the development of a DF is the value of the solubility of ALB in water. The use of the wet granulation method and the addition of a filler, stabilizer and preservative to the SD make it possible to obtain powders for the preparation of a suspension with satisfactory technological characteristics.

Conclusion. During the study, the technological characteristics of SD ALB with LE obtained by mechanochemical solid-phase synthesis were studied, and the optimal SD was determined from the point of view of the highest solubility of ALB in water. Excipients were selected, the composition of the suspension restored from SD ALB granules with optimal technological parameters was developed. Pharmacotechnological studies of suspensions based on SD ALB were conducted.

Keywords: albendazole, licorice extract, solid dispersions, suspension

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

Contribution of the authors. Natalia O. Karabintseva, Alexander V. Dushkin planned the experiment. Yulia I. Tikhomirova, Veronica I. Evseenko. Elizaveta S. Metelev, Maxim V. Zelikman carried out the planned research. Yulia I. Tikhomirova, Natalia O. Karabintseva processed and interpreted the research results. All authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Tikhomirova Yu. I., Karabintseva N. O., Evseenko V. I., Meteleva E. S., Dushkin A. V., Zelikman M. V. Development of the composition and technology of suspension for oral administration based on a solid dispersion of albendazole. *Drug development & registration*. 2025;14(1):82–91. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1878

ВВЕДЕНИЕ

Проблема паразитарных заболеваний, таких как описторхоз, остается значительной медицинской и социальной проблемой во многих регионах мира, особенно в странах с высоким уровнем рыболовства и употребления сырых или недостаточно обработанных рыб и моллюсков. По данным Всемирной организации здравоохранения, описторхоз является одним из наиболее распространенных гельминтозов у человека [1, 2]. Несмотря на существующие методы лечения и профилактики описторхоза, проблема продолжает оставаться актуальной из-за развития резистентности паразитов к существующим препаратам, побочных эффектов при их применении, а также недостаточной эффективности в связи с их низкой растворимостью в воде. В этом плане интерес представляет албендазол (АЛБ) (рисунок 1) – противогельминтный препарат широкого спектра действия, обладающий в том числе и описторхоцидным действием [3]. В настоящее время из 12 зарегистрированных в Российской Федерации лекарственных препаратов (ЛП) албендазола только 4 отечественного производства и выпускаются они только в форме таблеток, покрытых оболочкой[1]. Таким образом, выбор лекарственных форм (ЛФ) ограничен, что снижает, безусловно, комфорт лечения пациентов и персонифицированный характер фармакотерапии. Разработка ЛФ с оптимизированными биофармацевтическими свойствами АЛБ для лечения описторхоза является актуальной.

Перспективным направлением изменения растворимости и биодоступности активной фармацевтической субстанции является метод введения фармацевтических субстанций в твердые дисперсии (ТД) посредством механохимического твердофазного синтеза. Было установлено, что при совместном механохимическом воздействии лекарственного вещества (ЛВ) и носителя происходит разупорядочение твердой фазы ЛВ, молекулярное диспергирование ЛВ в избыток твердой фазы комплексообразователей с образованием твердых растворов либо межмолекулярных комплексов [5]. Формирование более прочных комплексов в твердой фазе приводит к повышению или снижению растворимости ЛВ [7, 11]. Применение метода механохимического синтеза для получения ТД АЛБ позволило увеличить его биодоступность и антигельминтную активность, а также снизить его токсичность в действующих дозах [4, 11–13, 16].

В качестве комплексообразователя для получения ТД использован сухой экстракт солодки (ЭС), что обусловлено его основным активным компонентом – глицирризиновой кислотой (ГК) (рисунок 1), свойства которой как носителя многократно изучались [5–9, 15]. Установлено, что ГК обладает способностью повышать растворимость включенных соединений, при этом увеличивая их мембранную проницаемость. В ходе проведенных ранее исследований была обоснована возможность применения ЭС в качестве полимера для получения ТД антигельминтных препаратов, показана их повышенная эффективность и снижение токсических свойств [5–9, 14, 15]. ГК обладает противовоспалительной, антиоксидантной и гепатопротекторной активностью [10]. Отсутствие корреляции между проявлением перечисленных эффектов и массовым содержанием ЭС при получении ТД АЛБ способствует увеличению его антигельминтной активности посредством повышения растворимости, что позволяет разработать ЛФ АЛБ для лечения описторхоза с повышенной биодоступностью.

В качестве ЛФ была выбрана суспензия, восстановленная из гранул, поскольку для нее характерны следующие преимущества: высокая фармакологическая активность, простота получения, портативность, устойчивость при хранении по сравнению с жидкими ЛФ, удобство приема. Гранулы для суспензии получали на основе ТД АЛБ с ЭС, что обеспечивало высокую биодоступность АЛБ и реализацию необходимых требований к выбранной ЛФ.

Цель исследования: разработка и фармакотехнологическое исследование суспензии для приема внутрь на основе ТД АЛБ, полученной механохимическим твердофазным синтезом.

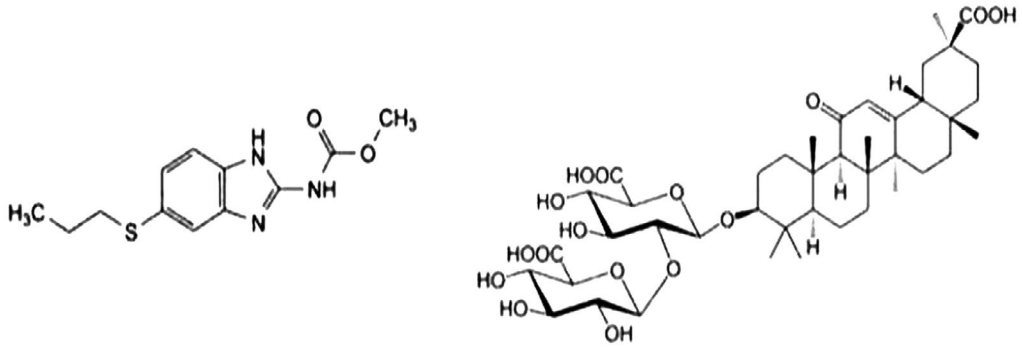
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция АЛБ (Wuhan Dasen Biotechnology Co. Ltd.), солодки (корень) экстракт сухой (содержание глицирризиновой кислоты 26,3 %, ТУ 10.89.3-016-20997969-2020, ООО «Вистерра», Россия). Образцы ТД АЛБ и ЭС, полученные механохимическим твердофазным синтезом в массовых соотношениях 1:5, 1:10 и 1:20 при продолжительности механической обработки 2 часа, 8 часов и 16 часов.

Исследование высвобождения АЛБ из ТД оценивали по содержанию АЛБ в водной среде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ацетонитрил / ацетатный буфер pH 3,4, 40/60, скорость потока 1 мл/мин, объем пробы 5 мкл, детектирование при 300 нм) с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Германия). Навеску ТД (из расчета 0,01 г по основному веществу) растворяли в 5 мл воды в течение 3 ч при 37 °C в шейкере при 200 об/мин. Далее раствор центрифугировали в течение 5 мин при 12000 об/мин и фильтровали. Навеску для стандартного образца растворяли в диметилсульфоксиде.

Характер поверхности частиц исходных субстанций и их ТД исследованы методом сканирующей электронной микроскопии с помощью электронного микроскопа ТМ-1000 (Hitachi, Япония) с системой микроанализа.

[1] Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: https://grls.minzdrav.gov.ru/default.aspx. Ссылка активна на 03.06.2024.



А
A

Б
B

Рисунок 1. Структурные формулы лекарственных средств:
А – албендазол; Б – глицирризиновая кислота

Figure 1. Structural formulas of drugs:
A – albendazole; B – glycyrrhizic acid

Технологические свойства образцов ТД оценивали по общепринятым фармакопейным методикам. Для прогнозирования изменения сыпучести ТД был использован расчет коэффициента прессуемости и коэффициента Хауснера, так как методика определения скорости сыпучести через отверстие для ТД затруднена. Для коэффициента прессуемости и коэффициента Хауснера использовалась общепринятая шкала сыпучести[1], приведенная в таблице 1.

Таблица 1. Шкала сыпучести

Table 1. Flowability scale

Коэффициент прессуемости, % Compressibility factor, %	**Характеристика сыпучести** Charcteristics of flowability	**Коэффициент Хауснера** Hausner coefficient
1–10	Отличная Excellent	1,00–1,11
11–15	Хорошая good	1,12–1,18
16–20	Приемлемая Acceptable	1,19–1,25
21–25	Удовлетворительная Satisfactory	1,26–1,34
26–31	Слабая Weak	1,35–1,45
32–37	Плохая Bad	1,46–1,59
Более 38 More 38	Очень плохая Very bad	Более 1,60 More 1,60

[1] Фармакопея Евразийского экономического союза. Доступно по: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-11082020_5/farmakopeia/ Ссылка активна на 03.06.2024.

Формулы расчета индексов:
Коэффициент Хауснера (*H*):

$$H = \frac{Py}{P}.$$

Коэффициент прессуемости (*J*):

$$J = \frac{100 \cdot (Py - P)}{Py},$$

где *Py* – насыпная плотность после уплотнения; *P* – насыпная плотность до уплотнения.

В качестве вспомогательных веществ использовали спирт этиловый 95%-й (ГОСТ 5962-2013), метилцеллюлозу (ГОСТ 33310-2015), камедь ксантановую (ГОСТ 33333-2015), натрия бензоат (ГОСТ 32777-2014), глюкозу (ГОСТ Р 70295-2022), воду очищенную (ФС.2.2.0020).

Модельные смеси гранул получали последовательным смешиванием необходимого количества ТД и вспомогательных веществ до получения однородной смеси, далее увлажняли гранулирующей жидкостью (ГЖ). Количество ГЖ было подобрано экспериментально. Полученную увлажненную массу пропускали через сито-гранулятор с диаметром отверстий 3 мм, высушивали при температуре 25–27 °С в течение 30 мин. Далее проводили регрануляцию. Технологические характеристики экспериментальных образцов гранул и суспензий для приема внутрь анализировали на момент получения. Модельные суспензии анализировали в соответствии с ГФ РФ XV изд., ОФС.1.4.1.0014 «Суспензии»[2]. Результаты исследования обработаны методами первичной и вторичной статистической обработки данных.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ Ссылка активна на 03.06.2024.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью разработки состава и технологии суспензии для приема внутрь были изучены технологические свойства субстанций АЛБ, сухого ЭС и их ТД, полученных в разных массовых соотношениях и при разном времени механообработки. Оценка таких технологических характеристик, как фракционный состав, сыпучесть, угол естественного откоса и насыпная плотность, необходима для научно обоснованного выбора рационального режима механохимической обработки для получения ТД и определения степени необходимости корректирования их технологических свойств в разработке ЛФ на их основе.

Исследование фракционного состава продемонстрировало, что вследствие мелкодисперсного состава сухого ЭС при всех исследуемых режимах механохимического воздействия в ТД АЛБ обеспечивается сравнительно схожее высокое содержание частиц с размером от 0,2 до 0,1 мм и составляет до 80 % от общей массы навески порошка. Данные, полученные в ходе ситового анализа, свидетельствуют о том, что массовое соотношение ЭС к основному веществу АЛБ существенно не влияет на степень однородности в отношении фракционного состава ТД (рисунок 2).

Одной из важнейших операций в технологическом процессе получения гранул для приготовления суспензии для приема внутрь является дозирование, для которого необходимы оптимальные технологические свойства – сыпучесть и насыпная плотность материала, для наполнения первичной упаковки. Вследствие продолжительной механической обработки ТД АЛБ с ЭС в шаровой мельнице на поверхности частиц ТД было выявлено образование выступов и шероховатостей, возникновение микротрещин (рисунок 3), а также увеличение удельной поверхности в связи с уменьшением размера частиц. Перечисленные факторы, в свою очередь, повышают межчастичное трение и затрудняют перемещение

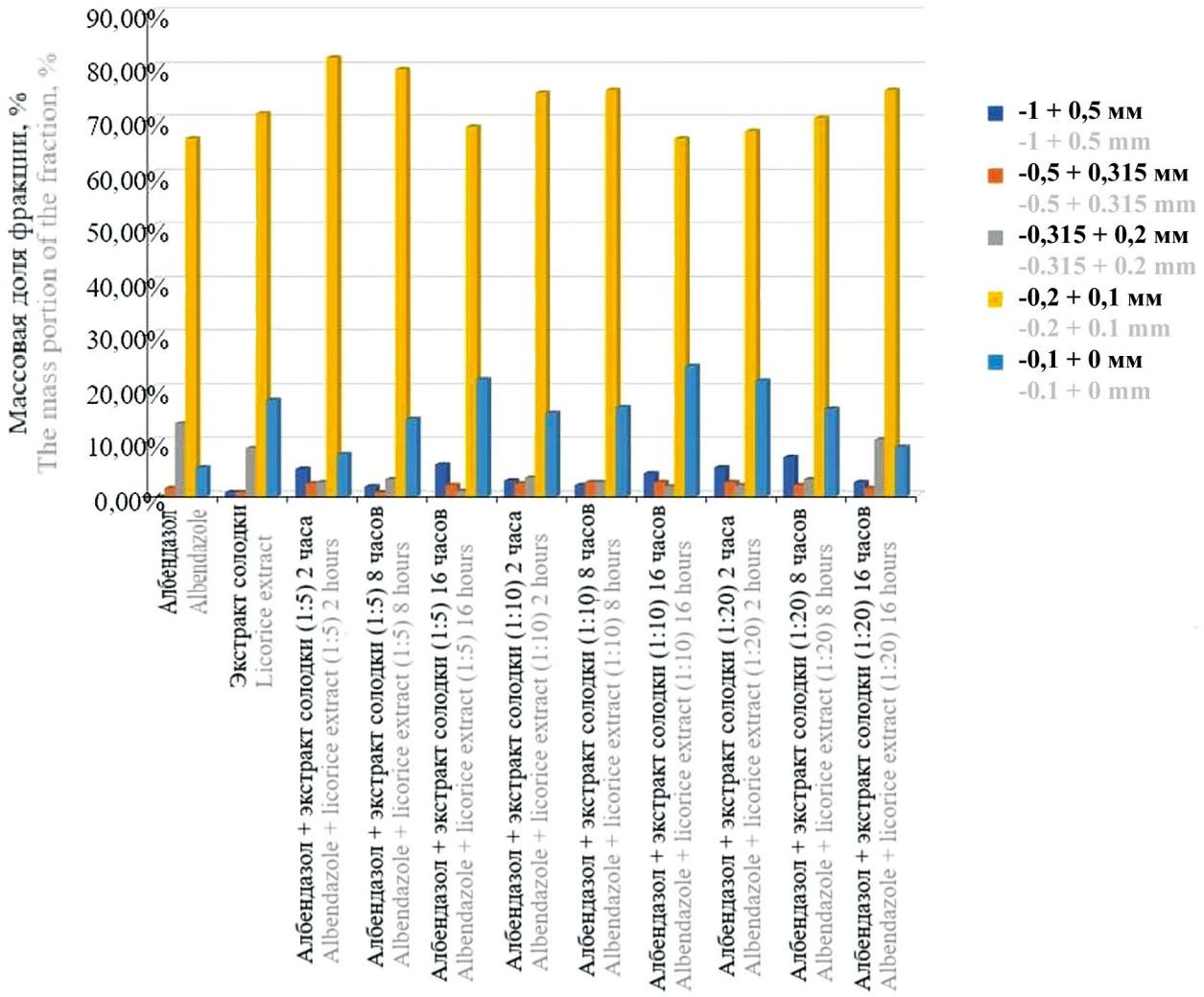


Рисунок 2. Фракционный состав албендазола, сухого экстракта солодки и их твердых дисперсий

Figure 2. The fractional composition of albendazole, dry licorice extract and their solid dispersions

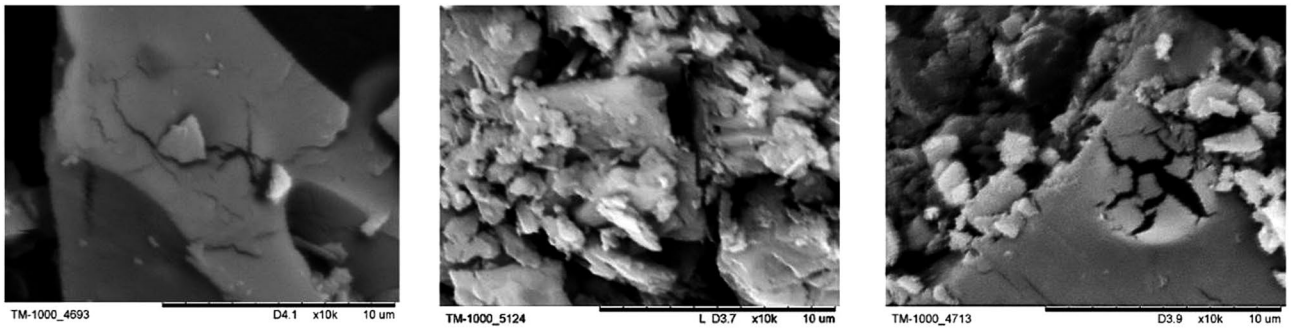


Рисунок 3. Электронно-микроскопические фотографии:

А – экстракт солодки до механохимической обработки; Б – исходная субстанция албендазола; В – твердая дисперсия албендазола с экстрактом солодки (1 : 20) 2 ч (увеличение ×10 000)

Figure 3. Electron microscopic photographs:

A – licorice extract before mechanochemical treatment; B – the starting substance of albendazole; C – solid dispersion of albendazole with licorice extract (1 : 20) 2 h (magnification ×10 000)

частиц относительно друг друга. Данный процесс, по всей вероятности, приводит к снижению насыпной плотности изучаемых ТД и обуславливает снижение у них такой важной технологической характеристики, как сыпучесть.

Результаты изучения технологических свойств исходных субстанций АЛБ, ЭС и их ТД представлены в таблице 2.

По результатам исследования сыпучести было установлено, что субстанция АЛБ обладает «слабой» сыпучестью, сухой ЭС обладает «отличной» сыпучестью. При анализе данных было выявлено, что массовое соотношение основного вещества к носителю и продолжительность механообработки не оказывают значительного влияния на сыпучесть ТД АЛБ с ЭС.

Таким образом, для решения проблемы плохой сыпучести ТД АЛБ с ЭС, а также снижения пылящих свойств ТД было предложено проведение направленного укрупнения частиц и придания им более правильной формы посредством влажной грануляции.

В связи с тем, что технологические свойства ТД АЛБ с ЭС существенно не изменяются в зависимости от массового соотношения лекарственного вещества и носителя и времени их механообработки, определяющим фактором для дальнейшего выбора ТД будет являться значение растворимости АЛБ в воде из состава ТД (рисунок 4).

При исследовании растворимости АЛБ из состава ТД установлено, что наибольшее значение растворимости у образца ТД АЛБ с ЭС с массовым соотношением 1 : 20 и при 8 ч механообработки составляет 45,5 мг/л, что превышает растворимость АЛБ из субстанции в 61 раз. Таким образом, по совокупности вышеизложенных результатов технологических определений и значений растворимости АЛБ для дальнейшей разработки ЛФ была выбрана ТД АЛБ + ЭС 1 : 20 8 ч.

На следующем этапе исследования с добавлением вспомогательных веществ были получены модельные составы гранул для восстановленных суспензий, которые отличались между собой выбором стабилизатора-загустителя (таблица 3). Экстракт солодки, который присутствует в составе ТД в качестве носителя для основного действующего вещества АЛБ, благодаря своим органолептическим свойствам (сладковатому вкусу и запаху), предположительно, может решить проблему корригирования вкуса. В качестве ГЖ использовали спирт этиловый 95%-й, который обеспечивает необходимую смачиваемость ингредиентов, уменьшение пылеобразования при растирании смеси, а также сравнительно быстрое время высыхания гранулята. В качестве индифферентного наполнителя была использована глюкоза, а стабилизаторов – природный пищевой загуститель камедь ксантановая и метилцеллюлоза. С целью увеличения срока хранения разработанных гранул в качестве консерванта был предложен натрия бензоат.

Проведение влажной грануляции позволило получить равномерные гранулы с хорошей сыпучестью, что обеспечивает равномерность распределения фармацевтических субстанций для данной ЛФ.

Модельные гранулы анализировали по показателям «описание», «размер частиц», «сыпучесть», «угол естественного откоса» в соответствии с требованиями ГФ XV (таблица 4). По результатам анализа состав № 1 и состав № 2 имеют удовлетворительные технологические характеристики.

Таблица 2. **Технологические характеристики албендазола, сухого экстракта солодки и их твердых дисперсий**

Table 2. **Technological characteristics of albendazole, dry licorice extract and their solid dispersions**

№	Вещество / твердая дисперсия Substance / solid dispersion	Режим механо-обработки Mechanical processing mode	Насыпная плотность до уплотнения, г/мл ($n = 3$, $X_{ср.} \pm \Delta x$) Bulk density before compaction, g/ml ($n = 3$, $X_{av.} \pm \Delta x$)	Насыпная плотность после уплотнения, г/мл ($n = 3$, $X_{ср.} \pm \Delta x$) Bulk density after compaction, g/ml ($n = 3$, $X_{av.} \pm \Delta x$)	Коэффициент прессуемости, % Compressibility factor, %	Коэффициент Хаусснера Hausner coefficient
1	Албендазол Albendazole	Без обработки Without processing	0,37 ± 0,03	0,51 ± 0,04	28	1,38
2	Экстракт солодки Licorice Extract	Без обработки Without processing	0,69 ± 0,02	0,74 ± 0,03	3,45	1,07
3	Албендазол + экстракт солодки (1 : 5) Albendazole + licorice extract (1 : 5)	2 часа 2 hours	0,68 ± 0,04	0,79 ± 0,03	12,96	1,16
		8 часов 8 hours	0,62 ± 0,03	0,72 ± 0,04	14,7	1,16
		16 часов 16 hours	0,69 ± 0,03	0,72 ± 0,04	3,7	1,04
4	Албендазол + экстракт солодки (1 : 10) Albendazole + licorice extract (1 : 10)	2 часа 2 hours	0,60 ± 0,02	0,65 ± 0,03	7,69	1,08
		8 часов 8 hours	0,62 ± 0,04	0,73 ± 0,03	15,7	1,18
		16 часов 16 hours	0,69 ± 0,03	0,72 ± 0,02	3,7	1,04
5	Албендазол + экстракт солодки (1 : 20) Albendazole + licorice extract (1 : 20)	2 часа 2 hours	0,71 ± 0,01	0,76 ± 0,03	6,25	1,07
		8 часов 8 hours	0,69 ± 0,03	0,74 ± 0,04	6,0	1,07
		16 часов 16 hours	0,56 ± 0,01	0,69 ± 0,02	19,4	1,23

Примечание. $X_{ср.}$ – выборочное среднее; Δx – ошибка среднего.

Note. $X_{av.}$ – sample average; Δx – the error of the average.

Таблица 3. **Составы гранул для приготовления суспензии**

Table 3. **Compositions of granules for preparation of suspension**

Функциональное назначение вещества Functional purpose of the substance	Состав № 1 Composition № 1	Состав № 2 Composition № 2
Действующее вещество Active substance	Твердая дисперсия АЛБ + ЭС (1 : 20) 8 ч Solid dispersion ALB + LE (1 : 20) 8 h	Твердая дисперсия АЛБ + ЭС (1 : 20) 8 ч Solid dispersion ALB + LE (1 : 20) 8 h
Наполнитель, корригент вкуса Filler, flavor corrector	Глюкоза Glucose	Глюкоза Glucose
Связывающее вещество Stabilizer (Thickener)	Камедь ксантановая Xanthan gum	Метилцеллюлоза Methylcellulose
Консервант Preservative	Бензоат натрия Sodium Benzoate	Бензоат натрия Sodium Benzoate
Гранулирующая жидкость Granulating liquid	Спирт этиловый 95%-й Ethyl alcohol 95 %	Спирт этиловый 95%-й Ethyl alcohol 95 %

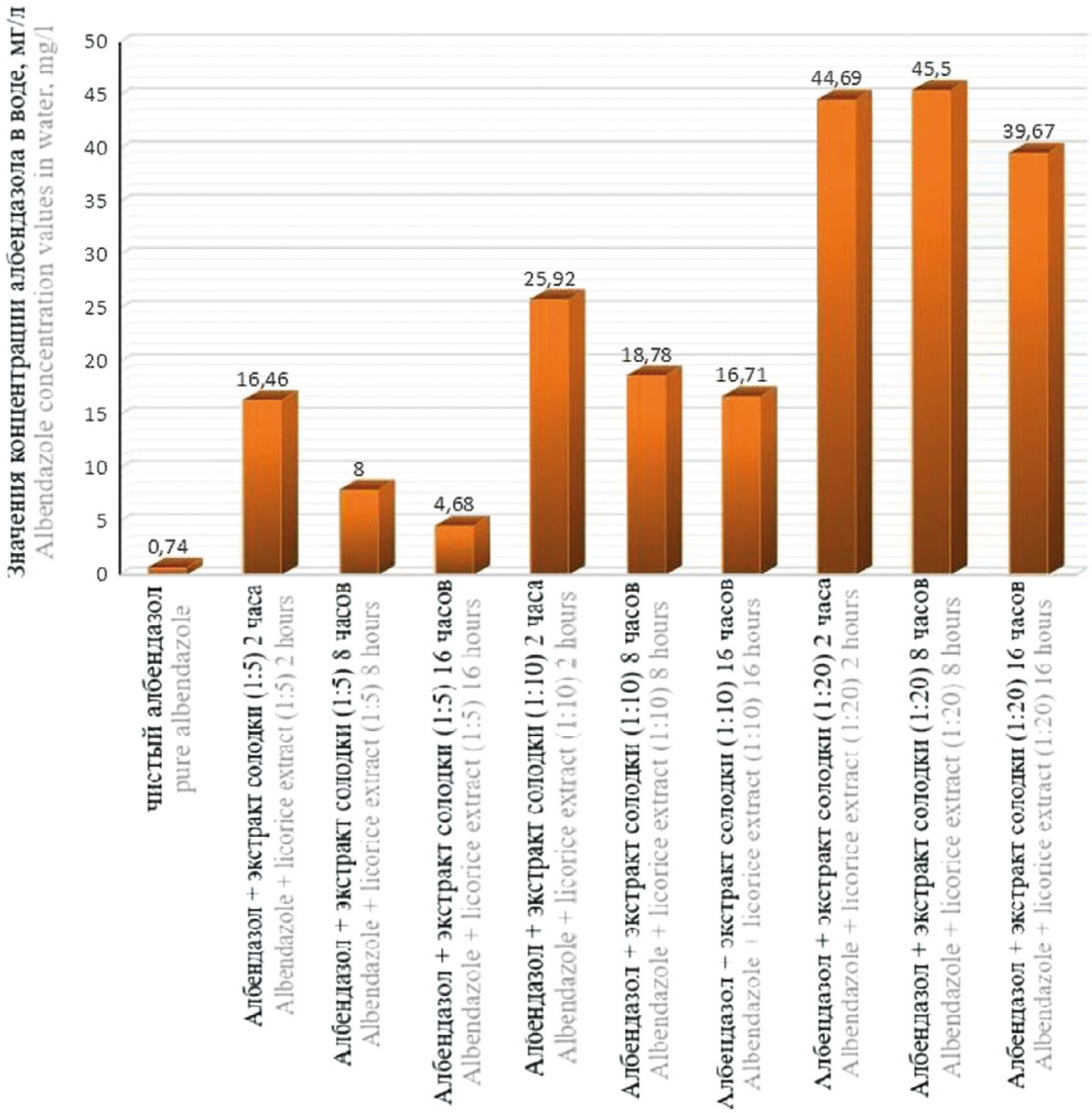


Рисунок 4. **Концентрация албендазола в воде в чистом виде и в составе твердых дисперсий**

Figure 4. **The concentration of albendazole in pure water and in the composition of solid dispersions**

Таблица 4. **Показатели качества модельных гранул для приготовления суспензии**

Table 4. **Quality indicators of the model granules for suspension preparation**

Показатели Indicators	**Состав № 1** Composition № 1	**Состав № 2** Composition № 2
Описание Description	**Однородные гранулы светло-коричневого цвета** Homogeneous granules of light brown color	
Размер гранул Granules size	**До 300 мкм** Up to 300 μm	**До 300 мкм** Up to 300 μm
Сыпучесть, г/с ($n = 3$, $X_{ср.} \pm \Delta x$) Flowability, g/s ($n = 3$, $X_{av.} \pm \Delta x$)	5 ± 0,5	5 ± 0,5
Угол естественного откоса, ° ($n = 3$, $X_{ср.} \pm \Delta x$) Angle of natural slope, ° ($n = 3$, $X_{ср.} \pm \Delta x$)	40 ± 2	42 ± 2
Время диспергирования, мин ($n = 3$, $X_{ср.} \pm \Delta x$) Dispersion time, min ($n = 3$, $X_{ср.} \pm \Delta x$)	2 ± 0,5	3 ± 0,5

Таблица 5. Показатели качества суспензий ТД АЛБ (на момент получения)

Table 5. Quality indicators of suspensions (at the time of receipt)

Показатели Indicators	**Состав № 1** Composition № 1	**Состав № 2** Composition № 2
Описание Description	Светло-коричневая жидкость с однородно распределенными в ней частицами, с характерным запахом экстракта солодки A light brown liquid with uniformly distributed particles in it, with a characteristic odor of licorice extract	Светло-коричневая жидкость с неоднородно распределенными в ней крупными частицами, с характерным запахом экстракта солодки A light brown liquid with irregularly distributed large particles in it, with a characteristic odor of licorice extract
Размер частиц твердой фазы Particle size of the solid phase	До 100 мкм Up to 100 μm	>100 мкм >100 μm
Время ресуспендирования Resuspending time	5 с 5 s	>1 мин >1 min
Время выпадения осадка Precipitation time	>3 мин >3 min	<2 мин Наблюдаются агрегаты и агломераты частиц дисперсной фазы <2 min Aggregates and agglomerates of dispersed phase particles are observed

На следующем этапе исследования путем смешивания с водой были получены модельные суспензии. Результаты изучения технологических свойств суспензий для приема внутрь представлены в таблице 5. По итогам анализа было установлено, что состав № 2 имеет неудовлетворительные характеристики по показателям «описание», «размер частиц твердой фазы», «время ресуспендирования» и «время выпадения осадка». Состав № 1 с использованием камеди ксантановой в качестве стабилизатора обладает удовлетворительными технологическими характеристиками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования было проведено сравнение технологических характеристик ТД АЛБ с ЭС, полученных в разных массовых соотношениях основного вещества и носителя и при разном времени механообработки. Определена оптимальная ТД АЛБ с ЭС, в которой растворимость АЛБ из состава ТД многократно превышает таковую по сравнению с субстанцией. Разработан состав и технология получения суспензии на основе гранул ТД АЛБ. В качестве стабилизатора суспензии использована камедь ксантановая.

В перспективе дальнейших исследований лежит необходимость изучения биофармацевтических показателей, а также стабильности суспензии ТД АЛБ в условиях долгосрочных испытаний.

Таким образом, ТД АЛБ с ЭС, полученная механохимическим способом, в виде суспензии позволит создать лекарственный препарат для перорального приема для фармакотерапии описторхоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бибик О. И. Описторхоз – актуальная проблема здравоохранения (обзор и анализ проблемы). *Российский паразитологический журнал.* 2020;14(4):38–49. DOI: 10.31016/1998-8435-2020-14-4-38-49.
2. Плотникова Е. Ю., Баранова Е. Н. Описторхоз: осложнения и проблемы лечения. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* 2018;(3):14–18.
3. Саакова К. А., Мирзоева Р. К., Селецкая В. В. Современные противогельминтные препараты. *Евразийский союз ученых.* 2020;76(5):51–54. DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2020.5.76.928.
4. Чистяченко Ю. С., Душкин А. В., Хвостов М. В., Жукова Н. А., Толстикова Т. Г., Белоусов А. И., Пахарукова М. Ю., Катохин А. В., Мордвинов В. А., Халиков С. С. Перспективный противоописторхозный препарат на основе албендазола. *Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями.* 2014;15:339–342.
5. Душкин А. В., Метелева Е. С., Толстикова Т. Г., Хвостов М. В., Поляков Н. Э., Ляхов Н. З. Супрамолекулярные системы доставки молекул лекарственных веществ на основе водорастворимых растительных метаболитов. Физико-химические, фармакологические свойства и особенности механохимического получения. *Химия в интересах устойчивого развития.* 2019;27:233–244.
6. Душкин А. В., Метелева Е. С., Толстикова Г. В., Хвостов В. И., Долгих М. П., Толстиков Г. А. Комплексирование фармаконов с глицирризиновой кислотой – путь создания препаратов повышенной эффективности. *Химия в интересах устойчивого развития.* 2010;18:517–525.
7. Халиков С. С., Евсеенко В. И., Варламова А. И., Халиков М. С., Ильин М. М., Метелева Е. С., Архипов И. А. Получение комплексных антигельминтных препаратов методами механохимии. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2023;2:44–52. DOI: 10.17513/mjpfi.13512. DOI: 10.17513/mjpfi.13512.
8. Su X., Wu L., Hu M., Dong W., Xu M., Zhang P. Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2017;95:670–678. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.123.

9. Selyutina O. Yu., Polyakov N. E. Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier – From physicochemical properties to biomedical applications: A modern insight on the ancient drug. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;559:271–279. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.047.
10. Толстиков Г. А., Балтина Л. А., Гранкина В. П. Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине. Новосибирск: Академическое издательство «Гео»; 2007. 307 с.
11. Khalikov S. S., Khalikov M. S., Meteleva E. S., Guskov S., Evseenko V. I., Dushkin A. V., Buranbaev V. S., Fazlaev G., Galimova Z. K., Galiullina A. M. Mechanochemical Modification of the Properties of Antihelminthic Preparations. *Chemistry for Sustainable Development*. 2011;19(6):699–703.
12. Душкин А. В., Чистяченко Ю. С., Халиков М. С., Халиков С. С., Архипов И. А., Гламаздин И. И., Одоевская И. М., Ляхов Н. З. Противопаразитарное средство на основе альбендазола и способ его использования для лечения кишечных гельминтозов млекопитающих. Патент РФ на изобретение № RU 2546535. 10.04.2015. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2546535C1_20150410. Ссылка активна на 29.10.2024.
13. Душкин А. В., Метелева Е. С., Ляхов Н. З., Чистяченко Ю. С., Халиков С. С., Толстикова Т. Г., Хвостов М. В., Баев Д. С., Жукова Н. А., Мордвинов В. А., Катохин А. В., Пахарукова М. Ю. Композиция на основе албендазола с противоописторхозной фармакологической активностью. Патент РФ на изобретение № RU 2545797. 10.04.2015. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2545797C1_20150410. Ссылка активна на 29.10.2024.
14. Архипов И. А., Варламова А. И., Халиков С. С., Садов К. М., Душкин А. В. Влияние механохимической технологии на антигельминтную эффективность супрамолекулярных комплексов фенбендазола с экстрактом солодки. *Российский паразитологический журнал*. 2020;14(1):70–74. DOI: 10.31016/1998-8435-2020-14-1-70-74.
15. Dushkin A. V., Tolstikova T. G., Khvostov M. V., Tolstikov G. A. Complexes of Polysaccharides and Glycyrrhizic Acid with Drug Molecules – Mechanochemical Synthesis and Pharmacological Activity. In: Karunaratne D. N., editor. The Complex World of Polysaccharides. London: IntechOpen; 2012. P. 573–602. DOI: 10.5772/48182.
16. Варламова А. И., Халиков С. С., Метелева Е. С., Евсеенко В. И., Халиков М. С., Архипов И. А. Эффективность комплексных твердых дисперсий антигельминтиков при экспериментальном трихинеллезе. *Российский паразитологический журнал*. 2023;17(1):142–150. DOI: 10.31016/1998-8435-2023-17-1-142-150.

REFERENCES

1. Bibik O. I. Opisthorchosis is a topical health problem (problem overview and analysis). *Russian Journal of Parasitology*. 2020;14(4):38–49. (In Russ.) DOI: 10.31016/1998-8435-2020-14-4-38-49.
2. Plotnikova E. Yu., Baranova E. N. Opistorchoz: complications and problems of treatment. *Gastrojenterologija Sankt-Peterburga*. 2018;(3):14–18. (In Russ.)
3. Saakova K. A., Mirzoeva R. K., Seleckaya V. V. Modern antihelminth preparations. *Eurasian Union of Scientists*. 2020;76(5):51–54. (In Russ.) DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2020.5.76.928.
4. Chistyachenko Y. S., Dushkin A. V., Khvostov M. V., Zhukova N. A., Tolstikova T. G., Belousov A. I., Paharukova M Yu., Katokhin A. V., Mordvinov V. A., Khalikov S. S. A promising antiopisthorchiasis drug based on albendazole. *Teorija i praktika bor'by s parazitarnymi boleznjami*. 2014;15:339–342. (In Russ.)
5. Dushkin A. V., Meteleva E. S., Tolstikova T. G., Khvostov M. V., Polyakov N. E., Lyakhov N. Z. Supramolecular Systems for the Delivery of the Molecules of Medicinal Substances Based on Water-Soluble Plant Metabolites. Physicochemical, Pharmacological Properties and the Features of Mechanochemical Preparation. *Chemistry for sustainable development*. 2019;27:233–244. (In Russ.)
6. Dushkin A. V., Meteleva E. S., Tolstikova G. V., Khvostov V. I., Dolgikh M. P., Tolstikov G. A. Complexation of pharmacones with glycyrrhizic acid – a way to create drugs of increased effectiveness. *Chemistry for sustainable development*. 2010;18:517–525. (In Russ.)
7. Khalikov S. S., Eveenko V. I., Varlamova A. I., Khalikov M. S., Ilin M. M., Meteleva E. S., Arkhipov I. A. Preparation of complex antihelminth drugs by methods of mechanochemistry. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2023;2:44–52. (In Russ.) DOI: 10.17513/mjpfi.13512.
8. Su X., Wu L., Hu M., Dong W., Xu M., Zhang P. Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;95:670–678. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.123.
9. Selyutina O. Yu., Polyakov N. E. Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier – From physicochemical properties to biomedical applications: A modern insight on the ancient drug. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;559:271–279. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.047.
10. Tolstikov G. A., Baltina L. A., Grankina V. P. Licorice: biodiversity. chemistry. application in medicine. Novosibirsk: Akademicheskoe izdatel'stvo «Geo»; 2007. 307 p. (In Russ.)
11. Khalikov S. S., Khalikov M. S., Meteleva E. S., Guskov S., Evseenko V. I., Dushkin A. V., Buranbaev V. S., Fazlaev G., Galimova Z. K., Galiullina A. M. Mechanochemical Modification of the Properties of Antihelminthic Preparations. *Chemistry for Sustainable Development*. 2011;19(6):699–703.
12. Dushkin A. V., Chistyachenko Yu. S., Khalikov M. S., Khalikov S. S., Arkhipov I. A., Glamazdin I. I., Odoevskaya I. M., Lyakhov N. Z. Antiparasitic agent for based on albendazole and a method of its use for the treatment of intestinal helminthiasis of mammals. Patent RUS № 2546535. 10.04.2015. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU2546535C1_20150410. Accessed: 29.10.2024. (In Russ.)
13. Dushkin A. V., Meteleva E. S., Lyakhov N. Z., Chistyachenko Yu. S., Khalikov S. S., Tolstikova T. G., Khvostov M. V., Baev D. S., Zhukova N. A., Mordvinov V. A., Katohin A. V., Pakharukova M. Yu. Composition based on albendazole with antiopisthorchiasis pharmacological activity. Patent RUS № 2545797, 10.04.2015. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU2545797C1_20150410. Accessed: 29.10.2024. (In Russ.)
14. Arkhipov I. A., Varlamova A. I., Khalikov S. S., Sadov K. M., Dushkin A. V. The Influence of Mechanochemical Technology on Anthelmintic Efficacy of Supramolecular Complexes of Fenbendazole with Licorice Extract. *Russian Journal of Parasitology*. 2020;14(1):70–74. (In Russ.) DOI: 10.31016/1998-8435-2020-14-1-70-74.
15. Dushkin A. V., Tolstikova T. G., Khvostov M. V., Tolstikov G. A. Complexes of Polysaccharides and Glycyrrhizic Acid with Drug Molecules – Mechanochemical Synthesis and Pharmacological Activity. In: Karunaratne D. N., editor. The Complex World of Polysaccharides. London: IntechOpen; 2012. P. 573–602. DOI: 10.5772/48182.
16. Varlamova A. I., Khalikov S. S., Meteleva E. S., Evseenko V. I., Khalikov M. S., Arkhipov I. A. The efficacy of complex solid dispersions of anthelmintics against experimental trichinellosis. *Russian Journal of Parasitology*. 2023;17(1):142–150. (In Russ.) DOI: 10.31016/1998-8435-2023-17-1-142-150.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.012.6

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1889

Check for updates

CC BY 4.0

Оптимизация метода рефолдинга Fc-слитого белка, полученного в бактериальной системе экспрессии

П. С. Астрелина✉, С. А. Ищук, А. В. Кабанова, Р. В. Драй

Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, поселок Стрельна, ул. Связи, д. 34, литера А

✉ **Контактное лицо:** Астрелина Полина Сергеевна. **E-mail:** Polina.Astrelina@geropharm.com

ORCID: П. С. Астрелина – https://orcid.org/0000-0002-7984-1253;
С. А. Ищук – https://orcid.org/0000-0002-5754-7491;
А. В. Кабанова – https://orcid.org/0009-0007-0648-6354;
Р. В. Драй – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Статья поступила: 06.08.2024 **Статья принята в печать:** 06.02.2025 **Статья опубликована:** 07.02.2025

Резюме

Введение. Производство Fc-слитых белков в прокариотических системах приводит к образованию нерастворимых агрегатов из-за неправильного сворачивания полипептидных цепей. Для получения функциональных белков требуется стадия рефолдинга, процесс подбора условий которого может быть трудоемким. Оптимизация параметров ренатурации с помощью подхода дизайна эксперимента (Design of Experiments, DoE) позволяет рассчитать оптимальные параметры процесса и оценить влияние факторов и их взаимодействий.

Цель. Оценка влияния концентраций окислителя, восстановителя и pH буфера ренатурации на эффективность рефолдинга Fc-слитого белка *in vitro* и определение оптимальных условий.

Материалы и методы. В работе использовали тельца включения Fc-слитого белка, полученные в бактериальной системе экспрессии *Escherichia coli* BL21. Планирование эксперимента осуществляли с помощью ортогонального композиционного дизайна (Orthogonal Central Composite design, CCO). Дизайн эксперимента, статистическую обработку данных и оптимизацию параметров производили в программе MODDE (v. 12.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Германия). В качестве откликов использовали показатели хроматографической чистоты и выход целевого белка по данным высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии.

Результаты и обсуждение. Проведена оптимизация условий ренатурации Fc-слитого белка с применением подхода DoE. На основании полученных данных были построены графики поверхности откликов и определены оптимальные значения параметров pH буферной среды, концентрации окислителя и восстановителя. Полученные статистические модели демонстрируют высокую прогностическую способность и воспроизводимость данных. Была проведена успешная валидация процесса рефолдинга в оптимизированных условиях. Наблюдали снижение количества высокомолекулярных примесей и неправильно свернутых форм белка в целевом продукте. Значение хроматографической чистоты целевого белка по данным высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии удалось повысить более чем на 10 %.

Заключение. Было установлено значительное влияние pH буферного раствора, соотношения концентраций окислительно-восстановительной пары и их взаимное влияние на выход и хроматографическую чистоту Fc-слитого белка. Показана тесная взаимосвязь эффектов окислительного и восстановительного компонентов с pH раствора. Повышенный pH буферной среды улучшает растворимость белка, что создает лучшие условия для правильного сворачивания полипептидной цепи.

Ключевые слова: рефолдинг, Fc-слитый белок, дизайн эксперимента, методология поверхности отклика

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

Вклад авторов. П. С. Астрелина – планирование и проведение эксперимента, анализ данных, интерпретация результатов, написание текста рукописи. С. А. Ищук – планирование эксперимента, редактирование текста, интерпретация результатов. А. В. Кабанова – анализ образцов методом высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии. Р. В. Драй – утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

© Астрелина П. С., Ищук С. А., Кабанова А. В., Драй Р. В., 2025
© Astrelina P. S., Ishchuk S. A., Kabanova A. V., Drai R. V., 2025

Финансирование. Спонсор данного исследования – ООО «ГЕРОФАРМ».

Для цитирования: Астрелина П. С., Ищук С. А., Кабанова А. В., Драй Р. В. Оптимизация метода рефолдинга Fc-слитого белка, полученного в бактериальной системе экспрессии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):92–102. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1889

Optimization of the Fc-fusion protein refolding method produced from the bacterial expression system

Polina S. Astrelina✉, Sergey A. Ishchuk, Alyona V. Kabanova, Roman V. Drai

JSC "Pharm-Holding". 34A, Svyazi str., Strelna village, Saint-Petersburg, 198515, Russia

✉ **Corresponding author:** Polina S. Astrelina. **E-mail:** Polina.Astrelina@geropharm.com

ORCID: Polina S. Astrelina – https://orcid.org/0000-0002-7984-1253;
Sergey A. Ishchuk – https://orcid.org/0000-0002-5754-7491;
Alyona V. Kabanova – https://orcid.org/0009-0007-0648-6354;
Roman V. Drai – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Received: 06.08.2024 **Accepted:** 06.02.2025 **Published:** 07.02.2025

Abstract

Introduction. The production of Fc-fused proteins in prokaryotic systems often results in the formation of insoluble aggregates due to improper folding of polypeptide chains. To obtain functional proteins, a refolding step is required. However, developing refolding parameters can be time-consuming. The optimization of renaturation conditions using the Design of Experiments (DoE) approach allows for the calculation of optimal process parameters and the evaluation of contributing factors and their interactions.

Aim. This study aims to evaluate the effects of denaturation buffer pH, as well as oxidative and reducing agent concentrations, on the efficiency of Fc-fusion protein refolding *in vitro* and to determine optimal refolding parameters.

Materials and methods. Fc-fusion protein inclusion bodies were obtained from an *Escherichia coli* BL21 bacterial expression system. The experiment was designed using an orthogonal composite design (Orthogonal Central Composite Design, CCO). Experimental design, statistical data processing, and parameter optimization were conducted using MODDE (v. 12.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Germany). Chromatographic purity and yield of the target protein, as determined by high-performance size-exclusion chromatography, were used as response variables.

Results and discussion. The DoE approach successfully optimized the Fc-fusion protein refolding process. Response surface plots were constructed, and the optimal factor values were determined. The statistical models demonstrated high predictive accuracy and data reproducibility. The refolding process was successfully validated under optimized conditions, resulting in a decrease in high-molecular-weight impurities and improperly folded protein forms. The chromatographic purity of the target protein increased by more than 10 %, as confirmed by high-performance size-exclusion chromatography.

Conclusion. The study established significant effects of buffer pH, redox pair concentrations, and their interactions on the yield and chromatographic purity of the Fc-fused protein. The interplay between oxidative and reducing components and buffer pH was demonstrated. Increasing the buffer pH led to improved refolding efficiency.

Keywords: refolding, Fc-fused protein, Design of Experiments, Response Surface Methodology

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 S. Astrelina – planning and conducting the experiment, data analysis, interpretation of results, writing the manuscript. Sergey A. Ishchuk – experiment planning, text editing, interpretation results. Alyona V. Kabanova – analysis of samples using high-performance liquid exclusion chromatography. Roman V. Drai – approval of the final version of the article for publication.

Funding. The sponsor of this study is LLC "GEROPHARM".

For citation: Astrelina P. S., Ishchuk S. A., Kabanova A. V., Drai R. V. Optimization of the Fc-fusion protein refolding method produced from the bacterial expression system. *Drug development & registration*. 2025;14(1):92–102. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1889

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы исследования терапевтического потенциала Fc-слитых белков представляют особый интерес, так как лекарственные препараты на основе платформы Fc-fusion демонстрируют эффективность в отношении многих хронических и врожденных заболеваний [1, 2]. Рекомбинантная молекулярная конструкция, полученная в результате слияния Fc-домена иммуноглобулина G с пептидом интереса, обеспечивает молекуле увеличенный период полураспада, что значительно продлевает терапевтическое действие препарата [3].

Для наработки Fc-слитых белков часто используются прокариотические системы экспрессии, такие как *E. coli*, ввиду простоты их культивирования. Однако из-за отсутствия необходимых посттрансляционных модификаций синтез продукта осуществляется в виде нерастворимых агрегатов – телец включения [4]. Такие образования являются результатом мисфолдинга – неправильного сворачивания полипептидной цепи [5]. Для биофармацевтического производства крайне важно в процессе выделения и очистки снизить количество нецелевых форм белка в готовом продукте, так как они не имеют должной биологической активности, а также могут обладать иммуногенными свойствами [6]. Это обуславливает необходимость введения дополнительной технологической стадии – рефолдинга белка.

Функциональная трехмерная структура белка определяется исключительно его аминокислотной последовательностью [7, 8]. Сворачивание происходит спонтанно, начиная с образования локальных вторичных структур, сопровождающегося уплотнением молекулы. Элементы вторичной структуры впоследствии взаимодействуют, образуя подобласти и домены, стабилизированные третичными взаимодействиями [9]. Наличие дисульфидной связи в нативной структуре белка имеет важное значение для формирования его третичной структуры, поэтому образование нецелевых S—S между аминокислотными остатками цистеинов может способствовать образованию молекул с некорректной конформацией в бактериальных системах экспрессии [10].

Разработка условий рефолдинга – нетривиальная задача. В промышленном масштабе самым простым и наиболее часто используемым способом перехода от денатурирующих условий к ренатурирующим является быстрое разбавление концентрированного белкового денатуранта в буфере рефолдинга [11]. За последние годы была накоплена большая информационная база добавок, которые способствуют принятию правильной конформации полипептидной цепи в растворе [11, 12]. Вспомогательные вещества можно классифицировать на следующие группы: денатуранты, стабилизаторы, ингибиторы агрегации, модуляторы pH и окислительно-восстановительные агенты. Последние два фактора играют особую роль в формировании пространственной структуры белка, так как обеспечивают условия для протекания окислительно-восстановительных реакций [13], что важно при установлении корректных внутримолекулярных взаимодействий [14]. Но поскольку каждый белок имеет уникальную аминокислотную последовательность, подбор буферного состава осуществляется эмпирически и является уникальным для каждого продукта.

Для решения этой задачи в статье рассмотрено применение статистического подхода дизайна эксперимента (DoE, Design of Experiment) [15]. В контексте подбора условий рефолдинга DoE представляет систематический подход к тестированию различных факторов, таких как pH, концентрации вспомогательных веществ и другие параметры, которые могут влиять на эффективность процесса рефолдинга белков. Данный метод предполагает несколько этапов: (i) скрининг – выявления наиболее значимых факторов для изучаемого процесса; (ii) оптимизация – подбор оптимальных параметров на основании статистической модели с проведением наименьшего числа экспериментов; (iii) валидация полученных результатов – сравнение предсказанных моделью результатов в заданных условиях с фактическими. Этап скрининга может быть пропущен, если набор факторов, влияющих на процесс, известен заранее.

Об эффективности процесса ренатурации могут свидетельствовать показатели хроматографической чистоты целевого белка. Агрегаты целевого белка – одна из основных примесей биотехнологического продукта, которые важно контролировать на конечных этапах производства. Предыдущие исследования показывают, что некорректно свернутые молекулы более склонны к агрегации, чем белки в нативной конформации [16]. Подходы математического моделирования описывают процесс повторного сворачивания как сочетание двух кинетически конкурирующих реакций: образование нерастворимых агрегатов и правильной формы белка [11, 17]. В продукте высокомолекулярные примеси могут быть идентифицированы с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC, Size exclusion high-performance liquid chromatography) позволяет разделять молекулы в соответствии с их гидродинамическим радиусом. Отделение агрегатов выполняется в условиях неденатурирующего элюирования, поэтому метод предоставляет воспроизводимую и быструю информацию о наличии высокомолекулярных примесей [18]. Различия в молекулярной массе между агрегатами и нормально сложенными молекулами позволяют использовать SEC-HPLC для оценки содержания высокомолекулярных примесей в конечном продукте.

Таким образом, целью работы являлась оценка влияния факторов концентраций окислителя, восстановителя и pH буфера ренатурации на эффективность процесса рефолдинга Fc-слитого белка *in vitro* и выявление оптимальных условий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом данной работы являлся Fc-слитый белок, полученный в бактериальной системе экспрессии *Escherichia coli* BL21, синтезируемый в виде нерастворимых телец включения (ТВ). Содержание белка в ТВ – 167,86 мг/г. В прокариотической системе экспрессии целевой белок синтезируется в форме мономера. Молекулярная масса димера – 64,4 кДа, изоэлектрическая точка – 5,81.

Солюбилизация телец включения

Замороженные тельца включения в размере 5 г размораживали при комнатной температуре (22 ± 2) °C в течение часа. Для растворения 5 г телец использовали 25 мл буфера солюбилизации следующего состава: 100 мМ трис (pure EP, USP, neoFroxx GmbH, Германия), 7 М гуанидина гидрохлорида (ч.д.а., ООО «Диаэм», Россия), 1,5 мМ DL-дитиотреитола (х.ч., Helicon, Россия), pH 9,5. Солюбилизат использовали сразу после приготовления.

Оптимизация условий ренатурации

Планирование эксперимента осуществлялось при помощи программного обеспечения MODDE (v. 12.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Германия). В работе использована методология поверхности отклика (Response Surface Methodology), которая применяется для оптимизации параметров процесса, если функция, описывающая его, неизвестна. Подход позволяет оценить влияние факторов и их взаимодействия на зависимую переменную. План экспериментов был составлен согласно ортогональному композиционному дизайну (Orthogonal Central Composite design, CCO). В качестве входных факторов были рассмотрены концентрации окислителя [цистамина дигидрохлорид, чистота 98 % (Macklin, Китай)], восстановителя [L-цистеин для клеточной биологии (BioFroxx GmbH, Германия)] и pH буфера для ренатурации, диапазоны их значений представлены в таблице 1. Для центральной точки эксперимент проводился в трехкратной повторности для оценки воспроизводимости процесса. Концентрации других компонентов буфера оставляли фиксированными: 1,5 М мочевины (pure EP, USP, neoFroxx GmbH, Германия), 0,3 М L(+)-аргинина (PhE, USP, АО «ВЕКТОН», Россия), 5 мМ ЭДТА динатриевой соли (ч.д.а., АО «ЛенРеактив», Россия), 20 мМ трис (pure EP, USP, neoFroxx GmbH, Германия). Для проведения ренатурации в 15 мл буфера брали 149 мкл солюбилизата. Ренатурацию проводили при температуре 4 °C в течение 16 ч.

Таблица 1. Дизайн эксперимента по оптимизации условий ренатурации Fc-слитого белка

Table 1. Design of an experiment to optimize the conditions of Fc-fusion protein renaturation

№	pH	Восстановитель, мМ Reducing agent, mM	Окислитель, мМ Oxidative agent, mM	Выход белка, площадь под пиком Yield, the area under the peak	Хроматографическая чистота, % Chromatographic purity, %
1	7,5	0,75	0,75	342,977	41,7891
2	9	0,75	0,75	430,338	51,2618
3	7,5	1,5	0,75	355,909	43,9371
4	9	1,5	0,75	468,153	54,1092
5	7,5	0,75	1,5	353,767	44,0363
6	9	0,75	1,5	417,976	50,2719
7	7,5	1,5	1,5	347,427	44,8696
8	9	1,5	1,5	436,884	51,7405
9	7,23515	1,125	1,125	331,486	43,1242
10	9,26485	1,125	1,125	444,901	53,8106
11	8,25	0,617576	1,125	379,96	46,8583
12	8,25	1,63242	1,125	388,856	47,9297
13	8,25	1,125	0,617576	393,335	47,742
14	8,25	1,125	1,63242	396,955	48,096
15	8,25	1,125	1,125	404,675	49,0536
16	8,25	1,125	1,125	414,575	48,8749
17	8,25	1,125	1,125	407,375	48,4818

Примечание. Выход белка определяли как абсолютное значение площади *S* под пиком, хроматографическую чистоту – как отношение площади целевого пика к общей площади под пиками, выражали в %.

Note. Protein yield was determined as the absolute value of the area S under the peak, chromatographic purity is the ratio of the area of the target peak to the total area under the peaks as a percentage.

В качестве выходных переменных рассматривали хроматографическую чистоту димерной формы и выход белка по данным высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии.

Для описания процесса и оценку прогностической модели проводили согласно уравнению множественной линейной регрессии для каждого отклика:

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^{3} A_i X_i + \sum_{i<j}^{3} A_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^{3} A_{ii} X_i^2, \quad (1)$$

где A_0, A_i, A_{ii} и A_{ij} – коэффициенты регрессии; Y – значение зависимой переменной, X_i, X_j – независимые переменные.

Оценку статистической модели проводили по показателям коэффициента детерминации R^2 (характеризует долю дисперсии, которая объясняется моделью) и коэффициента точности прогнозирования Q^2 (оценивает предсказательную способность модели). Модель считается приемлемой при показателях $R^2 > 0{,}75$ и $Q^2 > 0{,}5$. Также разница между Q^2 и R^2 не должна превышать 0,3.

Валидация модели и результатов оптимизации

Для валидации модели был проведен рефолдинг в трехкратной повторности в условиях, подобранных в результате оптимизации. Для полученных результатов рассчитывали среднее арифметическое и доверительный интервал. После чего сравнивали значения откликов, предсказанные моделью, с экспериментальными данными.

Для валидации результатов был проведен рефолдинг в буфере стандартного состава и в условиях, подобранных в результате оптимизации с подходом DoE. Тельца включения, параметры солюбилизации и неварьируемые условия ренатурации были идентичными, как для этапа оптимизации. Условия рефолдинга для стандартных и оптимизированных условий представлены в таблице 2.

Таблица 2. Параметры рефолдинга Fc-слитого белка в стандартных и оптимизированных условиях

Table 2. Parameters of Fc-fusion protein refolding under standard and optimized conditions

Параметр Parameter	Стандартные условия Standard conditions	Оптимизированные условия Optimized conditions
pH буферной среды pH of the buffer solution	8,0	9,15
Окислитель, мМ Reducing agent, mM	1,5	0,88
Восстановитель, мМ Oxidative agent, mM	1,5	1,36

После окончания рефолдинга пробы образцов были проанализированы методом SEC-HPLC.

Оценка хроматографической чистоты и выхода продукта методом SEC-HPLC

В данной работе использовался жидкостный хроматограф Prominence-i LC-2030C (серийный номер L21445301965 AE, Shimadzu Corporation, Япония) и хроматографическая колонка TSKgel G2000SW, 300 × 7,5 мм, 10 мкм (Tosoh Bioscience). В качестве подвижной фазы применяли 10 мМ фосфатно-солевой буфер с 490 мМ натрия хлорида при pH = 7,40 ± 0,05. Установленное значение скорости потока – 1,0 мл/мин, температура колонки составляла 30 °C, а длина волны детектирования – 230 нм.

В качестве холостой пробы использовали воду для хроматографии. Для проверки разделительной способности в хроматографическую виалу помещали 2 мг стандартного образца (стандартный образец предприятия, лиофилизат целевого белка с подтвержденной подлинностью, чистотой и количественным определением) и выдерживали 15 мин при 105 °C. Затем добавляли 1 мл воды для хроматографии и перемешивали

Чувствительность методики оценивали на растворе целевого белка с концентрацией около 0,001 мг/мл. Испытуемый образец разводили в 10 раз.

Интегрирование проводили с 7-й по 14-ю минуту. На хроматограмме испытуемого образца не учитывались пики, присутствующие на хроматограмме холостой пробы, а также пики с площадью, меньшей площади пика целевого белка на хроматограмме раствора для проверки чувствительности.

Содержание высокомолекулярных примесей определяли как отношение площади высокомолекулярных примесей к площади пика целевого белка, выраженное в процентах.

Статистическая обработка

Для проверки статистических моделей и оценки значимости изучаемых факторов в рамках DoE применяли дисперсионный анализ (ANOVA). Данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения при уровне значимости 95 %. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения MODDE.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий ренатурации Fc-слитого белка с использованием статистического подхода DoE

После проведения серии экспериментов согласно составленному ранее дизайну полученные данные были проанализированы с помощью методологии поверхности отклика.

Для параметра «хроматографическая чистота» значения критериев R^2 и Q^2 составили 0,993 и 0,973, для выхода белка – 0,954 и 0,988. Различие между значениями R^2 и Q^2 было менее 0,3 для каждой модели. Эти результаты свидетельствуют о том, что полученные модели хорошо описывают экспериментальные данные и обладают прогностической способностью, что подтверждает их пригодность для дальнейшей работы.

Для описания изучаемых переменных были получены следующие квадратичные уравнения регрессии:

$$Y_1 = -118{,}62 + 55{,}84X_1 - 128{,}40X_2 + 198{,}29X_3 + \\ + 22{,}28X_1X_2 - 20{,}42X_1X_3 - 33{,}94X_2X_3, \quad (2)$$

$$Y_2 = -36{,}88 + 8{,}67X_1 + 14{,}70X_2 + 32{,}16X_3 - \\ - 4{,}45X_2^2 - 2{,}41X_3^2 - 2{,}91X_1X_3 - 2{,}39X_2X_3, \quad (3)$$

где Y_1 и Y_2 – выход белка и хроматографическая чистота соответственно; X_1 – pH буферной среды; X_2 – концентрация восстановителя; X_3 – концентрация окислителя.

Эффект изучаемых параметров процесса признавался статистически значимым при $p < 0{,}05$. Коэффициенты исключались из уравнений, если *p*-значение для них превышало 0,05 и их удаление не снижало предсказательную способность модели. Уравнения использовали для поиска оптимальных значений переменных с помощью программного обеспечения MODDE, при которых изучаемые отклики максимальны. На основании полученных квадратичных моделей были построены графики поверхностей откликов для каждой из зависимых переменных (рисунок 1).

Было показано, что на оба отклика среди всех рассматриваемых параметров наибольшее влияние оказывает pH буферной среды (рисунок 2). Между этим фактором и зависимыми переменными наблюдалась положительная обратная связь: чем выше pH буферной среды, тем больше выход целевого белка и выше процент хроматографической чистоты. Полученный результат соотносится с предыдущими исследованиями: с отдалением pH среды от изоэлектрической точки белка повышается его растворимость [11], что увеличивает долю целевого белка в образце и способствует правильной повторной укладке молекулы. Кроме того, в таких условиях белок имеет суммарный отрицательный заряд и неспецифические электростатические взаимодействия снижают его склонность к агрегации [19], что также положительно сказывается на реакциях повторного сворачивания. Однако следует учитывать, что экстремальные значения pH (>10) могут привести к потенциальным изменениям структуры, функции, стабильности и иммуногенности белка [20].

Обнаруживается также значимое линейное положительное и квадратичное отрицательное влияние концентрации восстановителя на показатель хроматографической чистоты целевого белка. Вероятно, в небольшой концентрации восстановитель снижает количество нецелевых S—S-связей, однако избыток цистеина смещает равновесие окислительно-восстановительной реакции в сторону восстановления, что приводит к разрыву всех дисульфидных взаимодействий и нарушению вторичной структуры белка [21].

Внутридоменные дисульфидные связи Fc-фрагмента важны для стабилизации молекулы в физиологических условиях [22]. Известно, что образование этих связей является критическим фактором для корректной пространственной структуры при повторном сворачивании белка [23]. Присутствие восстановителя в небольших количествах позволяет снизить число нецелевых внутри- и межмолекулярных взаимодействий путем поддержания остатков цистеина в восстановленном состоянии [16, 24]. Тенденция линейного влияния фактора наблюдается также и для второго отклика ($p = 0{,}0642$)

Для фактора «концентрация окислителя» не было обнаружено значимого влияния на изучаемые отклики, однако исключить данный параметр из математических уравнений невозможно: для выхода целевого белка в этом случае наблюдается значительное снижение показателей качества модели (R^2 и Q^2), а в уравнении хроматографической чистоты присутствуют значимые коэффициенты взаимодействий с другими факторами (уравнение 2).

Было выявлено значимое взаимное влияние факторов «pH буферной среды» и «концентрация окислителя», а также концентрации окислителя и восстановителя на показатель хроматографической чистоты целевого продукта (рисунок 2). Известно, что окислительно-восстановительный потенциал системы определяется именно этими факторами (согласно уравнению Нернста) [25]. В тиол-дисульфидных реакциях окисления и восстановления участвуют ионы водорода, поэтому pH среды также оказывает существенное влияние. Смещение равновесного потенциала реакции за счет таких сложных взаимодействий изменяет условия формирования дисульфидных связей в белке.

По результатам оптимизации максимальные значения откликов достигаются при следующих параметрах: pH среды – 9,15, концентрация окислителя и восстановителя – 0,88 и 1,36 мМ соответственно. Полученное расчетное значение концентрации восстановителя превышает концентрацию окислителя, что объясняется уравнением окислительно-восстановительной реакции: в восстановлении задействованы две молекулы тиола, в то время как для окисления необходима одна молекула дисульфида (рисунок 3). Добавление восстановителя способствует поддержанию остатков цистеина в восстановленном состоянии и таким образом предотвращает образование нецелевых дисульфидных связей в белковых растворах при щелочном pH [16].

Валидация модели и условий рефолдинга

Валидацию модели считали успешной, если при трехкратном воспроизведении эксперимента с оптимальными параметрами предсказанное значение находилось в пределах доверительного интервала, рассчитанного на основании полученных экспериментальных данных. На рисунке 4 представлено сравнение предсказанного значения для исследуемых показателей со значением, полученным экспериментально при проведении рефолдинга белка в оптимальных условиях.

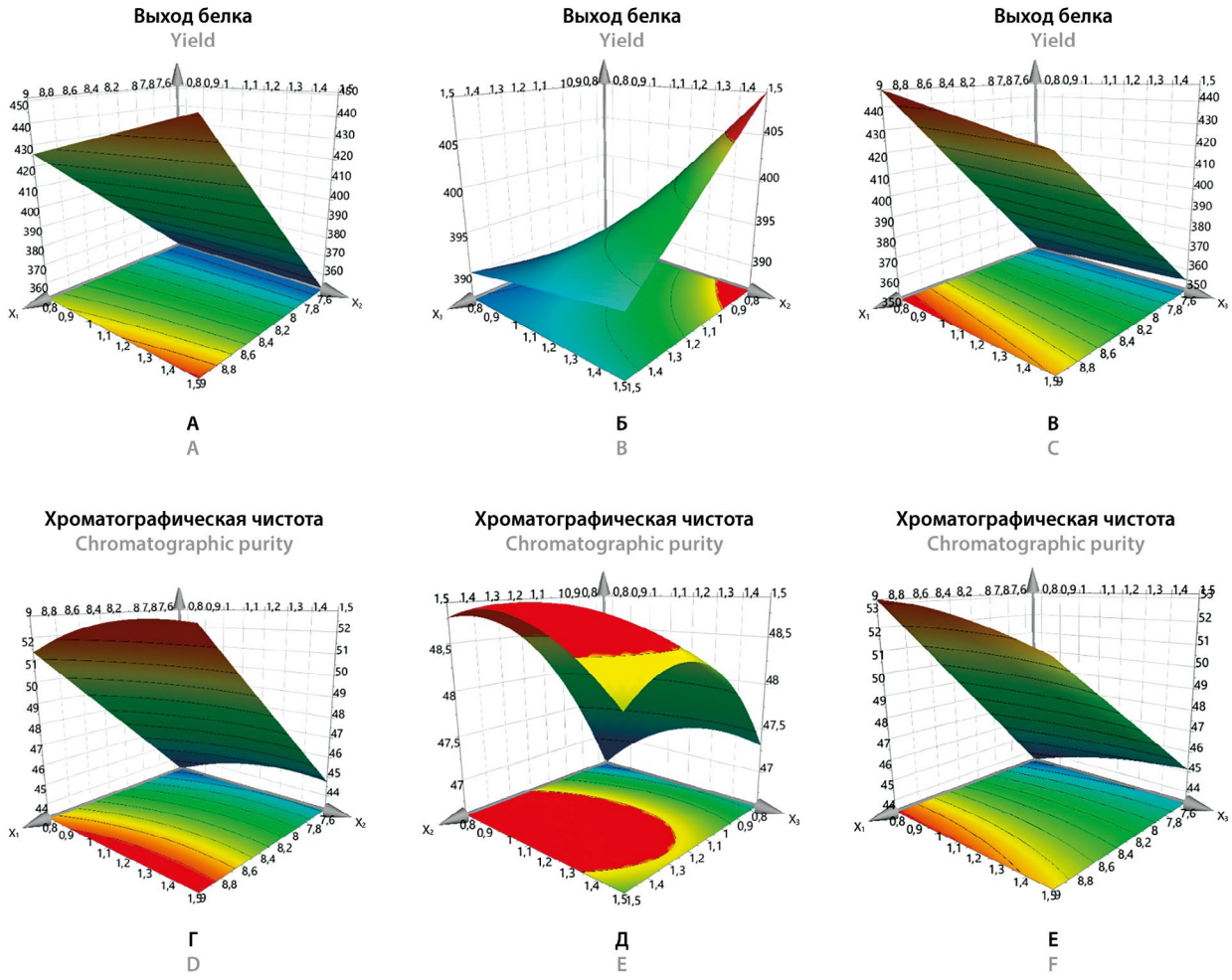


Рисунок 1. Трехмерные графики поверхностей откликов:

X_1 – pH среды; X_2 – концентрация восстановителя; X_3 – концентрация окислителя. А – трехмерный график поверхности отклика для выхода белка, показывающий взаимодействие эффектов pH среды и концентрации восстановителя при постоянном значении концентрации окислителя 1,125 мМ; Б – трехмерный график поверхности отклика для выхода белка, показывающий взаимодействие эффектов концентрации окислителя и концентрации восстановителя при постоянном значении pH 8,25; В – трехмерный график поверхности отклика для выхода белка, показывающий взаимодействие эффектов pH среды и концентрации окислителя при постоянном значении концентрации восстановителя 1,125 мМ; Г – трехмерный график поверхности отклика для хроматографической чистоты, показывающий взаимодействие эффектов pH среды и концентрации восстановителя при постоянном значении концентрации окислителя 1,125 мМ; Д – трехмерный график поверхности отклика для хроматографической чистоты, показывающий взаимодействие эффектов концентрации окислителя и концентрации восстановителя при постоянном значении pH 8,25; Е – трехмерный график поверхности отклика для хроматографической чистоты, показывающий взаимодействие эффектов pH среды и концентрации окислителя при постоянном значении концентрации восстановителя 1,125 мМ

Figure 1. Three-dimensional response surface plots:

X_1 – pH of the buffer; X_2 – concentration of the reducing agent; X_3 – concentration of the oxidative agent. A – three-dimensional response surface plot for protein yield, showing the interaction of the effects of the pH of the buffer and the concentration of the reducing agent at a constant value of the oxidative agent concentration of 1.125 mM; B – three-dimensional response surface plot for protein yield, showing the interaction of the effects of the concentration of the oxidative agent and the concentration of the reducing agent at a constant the pH value of 8.25; C – three-dimensional response surface plot for protein yield, showing the interaction of the effects of the pH of the buffer and the concentration of the oxidative agent at a constant value of the reducing agent concentration of 1.125 mM; D – three-dimensional response surface plot for chromatographic purity, showing the interaction of the effects of the pH of the buffer and the concentration of the reducing agent at a constant value of the oxidative agent concentration of 1.125 mM; E – three-dimensional response surface plot for chromatographic purity, showing the interaction of the effects of the concentration of the oxidative agent and the concentration of the reducing agent at a constant pH value of 8.25; F – three-dimensional response surface plot for chromatographic purity, showing the interaction of the effects of the pH of the buffer and the concentration of the oxidative agent at a constant value of the reducing agent concentration of 1.125 mM

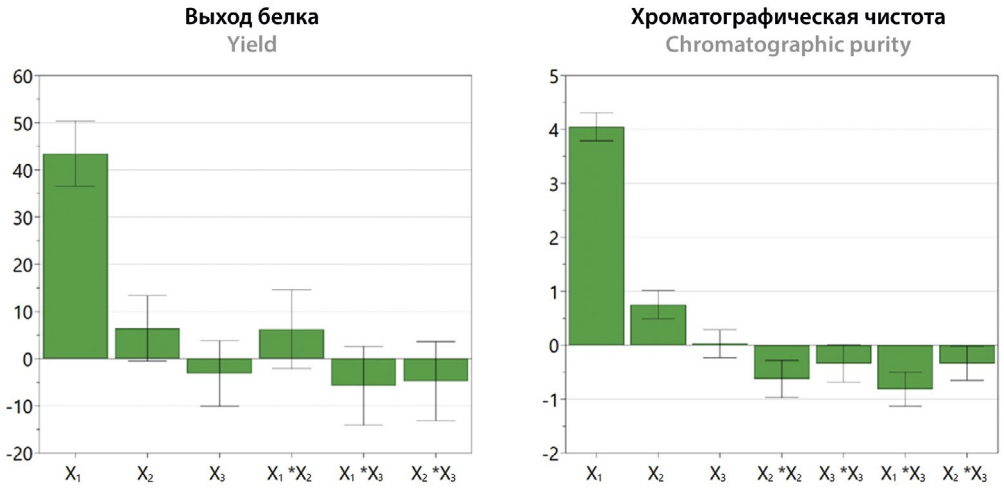


Рисунок 2. Коэффициенты регрессии для откликов «выход белка» (слева) и «хроматографическая чистота» (справа):

X_1 – pH среды; X_2 – концентрация восстановителя; X_3 – концентрация окислителя

Figure 2. Regression coefficients for protein yield response (left) and chromatographic purity response (right):

X_1 – pH of the buffer; X_2 – concentration of the reducing agent; X_3 – concentration of the oxidative agent

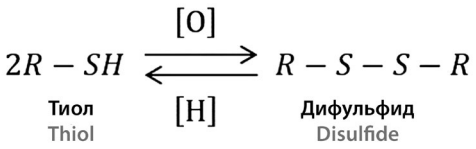


Рисунок 3. Уравнение окислительно-восстановительной реакции

Figure 3. The equation of the redox reaction

Полученные данные демонстрируют, что предсказанные моделью значения находятся в границах доверительного интервала экспериментальных данных, что подтверждает валидность модели и позволяет использовать ее в дальнейшей работе.

Для валидации результатов оптимизации был проведен рефолдинг Fc-слитого белка в буфере стандартного состава и в условиях, подобранных в результате оптимизации с подходом DoE. Образцы были проанализированы методом SEC-HPLC (рисунок 5, таблица 3).

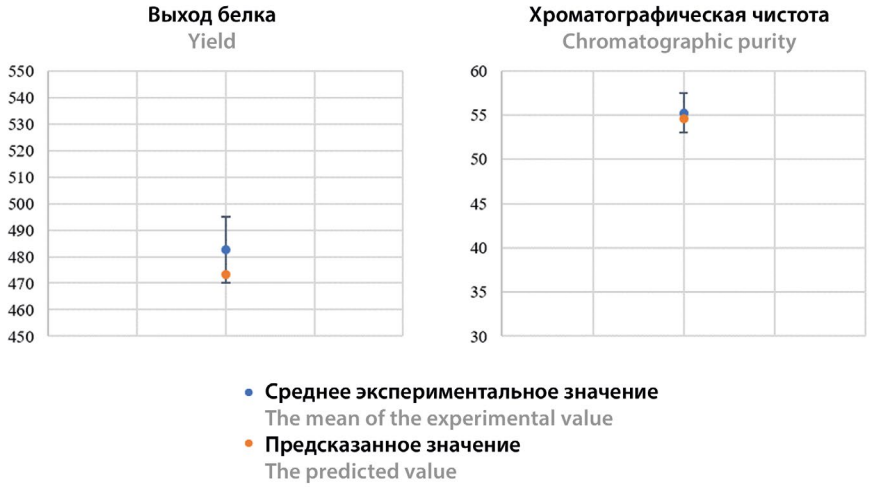


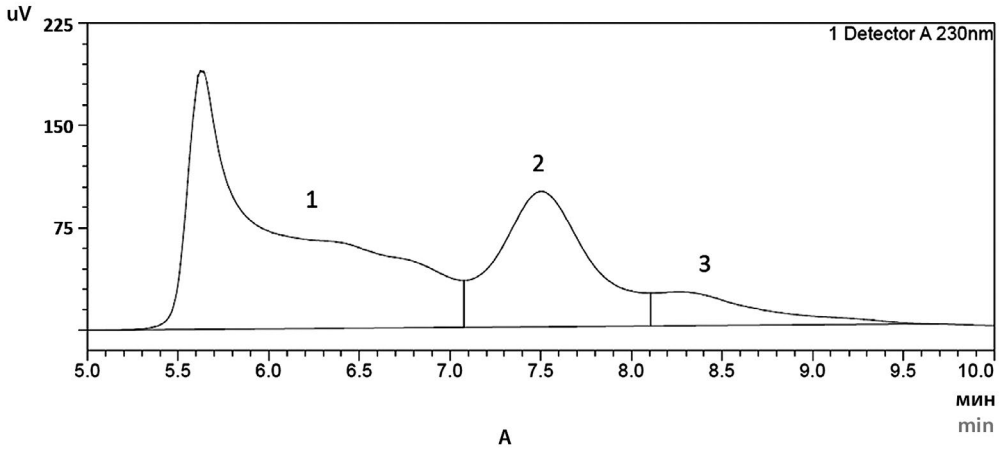
Рисунок 4. Валидация результатов DoE (среднее экспериментальное значение – среднее арифметическое, полученное на основании трехкратно проведенного эксперимента в оптимальных условиях; предсказанное значение – теоретическое значение исследуемых параметров, предсказанное моделью)

Figure 4. Validation of DoE results (the average experimental value is the mean obtained on the basis of a three–time experiment conducted under optimal conditions; the predicted value is the theoretical value of the studied parameters predicted by the model)

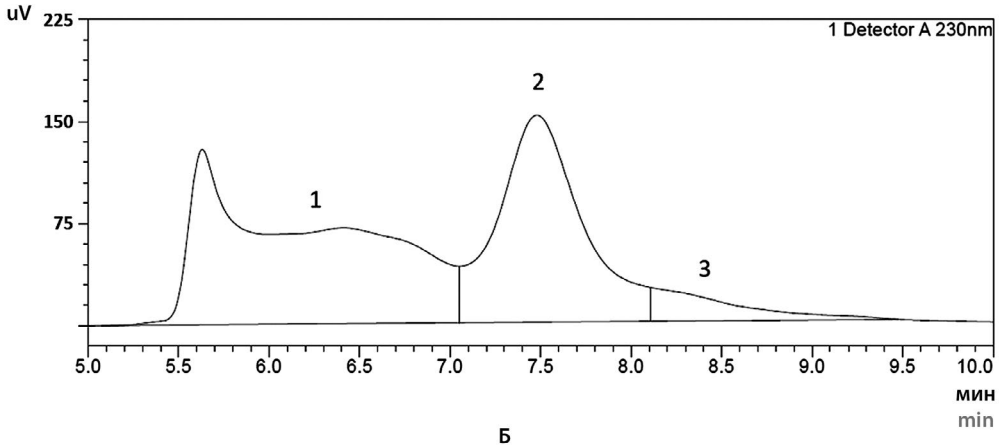
Таблица 3. Сравнение показателей хроматографической чистоты и выхода белка для стандартных и оптимизированных условий рефолдинга

Table 3. Comparison of chromatographic purity and protein yield for standard and optimized refolding conditions

Соединение Compound	Выход белка Yield		Процент площади пика от общей площади интегрирования Percentage of the peak area of the total integration area	
	Стандартные условия Standart conditions	Оптимизированные условия Optimized conditions	Стандартные условия Standart conditions	Оптимизированные условия Optimized conditions
Высокомолекулярные примеси High molecular weight compounds	727,58	633,99	69,57	60,62
Димер Fc-слитого белка Fc-fused protein dimer	360,80	482,61	34,50	46,14
Несложенные молекулы Unfolded molecules	102,90	74,70	9,84	7,14



А
A



Б
B

Рисунок 5. Хроматограммы SEC-HPLC для стандартных (А) и оптимизированных условий рефолдинга (Б).
1 – пик высокомолекулярных соединений; 2 – пик димера Fc-слитого белка; 3 – пик несложенных молекул

Figure 5. SEC-HPLC chromatograms for standard (A) and optimized refolding conditions (B).
1 – peak of high molecular weight compounds; 2 – peak of Fc-fused protein dimer; 3 – peak of unfolded molecules

На полученных хроматограммах наблюдается сокращение площади под пиками высокомолекулярных соединений и несложенных молекул в оптимальных условиях относительно стандартных. При этом хроматографическую чистоту димера удалось увеличить более чем на 10 %.

Таким образом, в ходе проведенных исследований удалось оптимизировать условия рефолдинга Fc-слитого белка. Полученные результаты валидации подтверждают значимое влияние на эффективность процесса факторов pH буферной среды, концентрации окислителя и восстановителя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была показана эффективность статистического подхода DoE для решения задач, требующих большого количества однотипных экспериментов, на примере подбора условий ренатурации Fc-слитого белка. Построенные статистические модели демонстрируют высокую прогностическую способность и хорошо описывают экспериментальные данные (разница между R^2 и Q^2 не превышает 0,3 для каждой из моделей), что позволяет использовать их в дальнейшей работе.

Оптимизация условий ренатурации позволила сократить число высокомолекулярных примесей и несложенных форм белка в целевом продукте. Отмечено значимое влияние pH буферного раствора, соотношения концентраций окислительно-восстановительной пары и взаимного влияния факторов на выход и хроматографическую чистоту Fc-слитого белка. Предположено, что оптимальное соотношение компонентов окислительно-восстановительной пары должно обеспечивать потенциал среды, необходимый для формирования правильных дисульфидных связей, при этом концентрация восстановителя должна превышать концентрацию окислителя. Эффекты, оказываемые окислительным и восстановительным компонентами, находятся в тесной взаимосвязи с pH раствора. Повышенный pH буферной среды способствует улучшению растворимости белка, что обеспечивает лучшие условия для реакций повторного сворачивания полипептидной цепи.

Результаты работы могут быть использованы при разработке технологий выделения и очистки аналогичных белковых молекул. Установленные взаимосвязи позволят проводить подбор условий рефолдинга для схожих молекулярных конструкций более эффективно.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Jafari R., Zolbanin N. M., Rafatpanah H., Majidi J., Kazemi T. Fc-fusion Proteins in Therapy: An Updated View. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(12):1228–1237. DOI: 10.2174/0929867324666170113112759.
2. Rath T., Baker K., Dumont J. A., Peters R. T., Jiang H., Qiao S.-W., Lencer W. I., Pierce G. F., Blumberg R. S. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. Critical Reviews in Biotechnology. 2015;35(2):235–254. DOI: 10.3109/07388551.2013.834293.
3. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein & Cell*. 2018;9(1):15–32. DOI: 10.1007/s13238-017-0408-4.
4. Carrió M. M., Cubarsi R., Villaverde A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*. 2000;471(1):7–11. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01357-0.
5. Bhatwa A., Wang W., Hassan Y. I., Abraham N., Li X.-Z., Zhou T. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:630551. DOI: 10.3389/fbioe.2021.630551.
6. Maas C., Hermeling S., Bouma B., Jiskoot W., Gebbink M. F. B. G. A Role for Protein Misfolding in Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(4):2229–2236. DOI: 10.1074/jbc.M605984200.
7. Micheletti C. Comparing proteins by their internal dynamics: Exploring structure–function relationships beyond static structural alignments. *Physics of Life Reviews*. 2013;10(1):1–26. DOI: 10.1016/j.plrev.2012.10.009.
8. Bahar I., Lezon T. R., Yang L.-W., Eyal E. Global Dynamics of Proteins: Bridging Between Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*. 2010;39:23–42. DOI: 10.1146/annurev.biophys.093008.131258.
9. Seckler R., Jaenicke R. Protein folding and protein refolding. *The FASEB Journal*. 1992;6(8):2545–2552. DOI: 10.1096/fasebj.6.8.1592207;
10. Depuydt M., Messens J., Collet J.-F. How Proteins Form Disulfide Bonds. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;15(1):49–66. DOI: 10.1089/ars.2010.3575.
11. Buscajoni L., Martinetz M. C., Berkemeyer M., Brocard C. Refolding in the modern biopharmaceutical industry. *Biotechnology Advances*. 2022;61:108050. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108050.
12. Roufarshbaf M., Akbari V. Development of Solubilization and Refolding Buffers. In: Kopp J., Spadiut O., editors. Inclusion Bodies. Totowa: Humana Press; 2023. P. 155–164. DOI: 10.1007/978-1-0716-2930-7_10.
13. Feige M. J., Hendershot L. M. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011;23(2):167–175. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.10.012.
14. Narayan M. Revisiting the Formation of a Native Disulfide Bond: Consequences for Protein Regeneration and Beyond. *Molecules*. 2020;25(22):5337. DOI: 10.3390/molecules25225337.
15. Mandenius C.-F., Brundin A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress*. 2008;24(6):1191–1203. DOI: 10.1002/btpr.67.
16. De Bernardez Clark E. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001;12(2):202–207. DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00200-7.
17. Maiti M., Rao M., Sastry S. Competition between folding and aggregation in a model for protein solutions.

The European Physical Journal E. 2010;32(2):217–221. DOI: 10.1140/epje/i2010-10621-4.
18. Brusotti G., Calleri E., Colombo R., Massolini G., Rinaldi F., Temporini C. Advances on Size Exclusion Chromatography and Applications on the Analysis of Protein Biopharmaceuticals and Protein Aggregates: A Mini Review. *Chromatographia*. 2018;81(1):3–23. DOI: 10.1007/s10337-017-3380-5.
19. Alam P., Siddiqi K., Kumar Chturvedi S., Khan R. H. Protein aggregation: From background to inhibition strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;103:208–219. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.048.
20. Gervais D. Protein deamidation in biopharmaceutical manufacture: understanding, control and impact. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2016;91(3):569–575. DOI: 10.1002/jctb.4850.
21. Góngora-Benítez M., Tulla-Puche J., Albericio F. Multifaceted Roles of Disulfide Bonds. Peptides as Therapeutics. *Chemical Reviews*. 2014;114(2):901–926. DOI: 10.1021/cr400031z.
22. Wang T., Fodor S., Hapuarachchi S., Grace Jiang X., Chen K., Apostol I., Huang G. Analysis and characterization of aggregation of a therapeutic Fc-fusion protein. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;72:59–64. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.09.010.
23. Wiedemann C., Kumar A., Lang A., Ohlenschläger O. Cysteines and Disulfide Bonds as Structure-Forming Units: Insights From Different Domains of Life and the Potential for Characterization by NMR. *Frontiers in Chemistry*. 2020;8:280. DOI: 10.3389/fchem.2020.00280.
24. Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*. 2014;4(1):235–251. DOI: 10.3390/biom4010235.
25. Walczak M. M., Dryer D. A., Jacobson D. D., Foss M. G., Flynn N. T. pH Dependent Redox Couple: An Illustration of the Nernst Equation. *Journal of Chemical Education*. 1997;74(10):1195.

Обзорная статья / Review article

УДК 616-006-091.818-085.277.3:547.656.6

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1852

Check for updates

CC BY 4.0

Противоопухолевая активность синтетических производных нафтохинона (обзор)

Е. Л. Головина✉, **В. А. Серебрякова, О. Е. Ваизова**

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

✉ **Контактное лицо:** Головина Евгения Леонидовна. **E-mail:** golovina.el@ssmu.ru

ORCID: Е. Л. Головина – https://orcid.org/0000-0001-6132-9617;
В. А. Серебрякова – https://orcid.org/0000-0001-7078-4988;
О. Е. Ваизова – https://orcid.org/0000-0003-4083-976X.

Статья поступила: 10.06.2024 **Статья принята в печать:** 13.02.2025 **Статья опубликована:** 14.02.2025

Резюме

Введение. Рак является основной причиной смертности во всем мире. Нафтохиноны – группа природных органических соединений с широким спектром активности, включающим кардио-, гепато-, нейропротективное действие, а также противомикробную, противовоспалительную и противоопухолевую активность. 1,4-нафтохинон легко поддается окислению, восстановлению, присоединяет нуклеофилы. Простые и хорошо разработанные методы химической модификации нафтохинонов делают их привлекательными для разработки новых соединений. Известно о противоопухолевом действии природных соединений нафтохинона – плюмбагина, шиконина, лапахола. Такие противоопухолевые антибиотики, как доксорубицин, даунорубицин, имеют в своей структуре 1,4-нафтохиноновый фрагмент.

Текст. Настоящий обзор посвящен анализу информации о механизмах противоопухолевого действия синтетических производных 1,4-нафтохинона. Обсуждаются возможные мишени их противоопухолевого действия.

Заключение. Анализ литературных данных показал, что синтетические соединения на основе молекулы 1,4-нафтохинона обладают противоопухолевым потенциалом. Механизм их противоопухолевого действия может быть связан с индукцией апоптоза через сигнальный путь митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК) и путь сигнального преобразователя и активатора транскрипции 3 (STAT3), с ингибированием фосфатазы клеточного цикла (Cdc25), накоплением активных форм кислорода (АФК), угнетением ангиогенеза. Данные, полученные исследователями разных стран, подтверждают перспективность поиска новых соединений с противоопухолевой активностью среди синтетических производных 1,4-нафтохинона для разработки на их основе новых лекарственных средств.

Ключевые слова: 1,4-нафтохинон, противоопухолевое действие, апоптоз, ангиогенез

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

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям. Е. Л. Головина – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания. В. А. Серебрякова – проверка критически важного интеллектуального содержания, научное редактирование статьи. О. Е. Ваизова – утверждение окончательного варианта рукописи, ответственность за целостность содержания статьи, научное редактирование статьи.

Для цитирования: Головина Е. Л., Серебрякова В. А., Ваизова О. Е. Противоопухолевая активность синтетических производных нафтохинона. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):103–111. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1852

Antitumor activity of synthetic naphthoquinone derivatives (review)

Eugenija L. Golovina✉, **Valentina A. Serebryakova, Olga E. Vaizova**

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

✉ **Corresponding author:** Eugenija L. Golovina. **E-mail:** golovina.el@ssmu.ru

© Головина Е. Л., Серебрякова В. А., Ваизова О. Е., 2025
© Golovina E. L., Serebryakova V. A., Vaizova O. E., 2025

ORCID: Eugenija L. Golovina – https://orcid.org/0000-0001-6132-9617;
Valentina A. Serebryakova – https://orcid.org/0000-0001-7078-4988;
Olga E. Vaizova – https://orcid.org/0000-0003-4083-976X.

Received: 10.06.2024 **Accepted:** 13.02.2025 **Published:** 14.02.2025

Abstract

Introduction. Cancer is the leading cause of death worldwide. Naphthoquinones are a group of natural organic compounds with a wide range of activity, including cardio-, hepato-, neuroprotective effects, as well as antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor activity. 1,4-naphthoquinone is easily oxidized, reduced, and may be easily attached with nucleophiles. Well-developed methods of chemical modification of naphthoquinones make them attractive for the development of new types substances. It is known about the antitumor effect of natural naphthoquinone compounds – plumbagin, shikonin, lapachol. Antitumor antibiotics such as doxorubicin and daunorubicin have a 1,4-naphthoquinone fragment in their structure.

Text. This review is devoted to the analysis of information on the mechanisms of antitumor action of synthetic derivatives of 1,4-naphthoquinone. Possible targets of their antitumor action are discussed.

Conclusion. An analysis of the literature data showed that synthetic compounds based on the 1,4-naphthoquinone molecule have antitumor activity. The mechanism of antitumor action may be associated with the induction of apoptosis through the signaling pathway of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the pathway of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), inhibition of cell division cycle phosphatase (Cdc25), accumulation of reactive oxygen species (ROS), inhibition of angiogenesis. The data obtained by researchers from different countries confirm the prospects of searching for new compounds with antitumor activity among synthetic derivatives of 1,4-naphthoquinone for the development of new medicines based on them.

Keywords: 1,4-naphthoquinone, antitumor effect, apoptosis, angiogenesis

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

Contribution of the authors. The authors declare that their authorship meets international criteria. Eugenija L. Golovina – development of the concept and design of the study, analysis and interpretation of data, verification of critical intellectual content. Valentina A. Serebryakova – verification of critical intellectual content, scientific editing of the article. Olga E. Vaizova – approval of the final version of the manuscript, responsibility for the integrity of the content of the article, scientific editing of the article.

For citation: Golovina E. L., Serebryakova V. A., Vaizova O. E. Antitumor activity of synthetic naphthoquinone derivatives. *Drug development & registration*. 2025;14(1):103–111. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1852

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

4-ОНТ	4-гидрокситамоксифен.
5-ФУ	5-фторурацил.
АФК	активные формы кислорода.
МАРК	митогенактивируемая протеинкиназа.
МКК4	киназа митогенактивируемой протеинкиназы 4.
МКК7	киназа митогенактивируемой протеинкиназы 7.
ТНРМЖ	тройной негативный рак молочной железы.
ФНО	фактор некроза опухоли.
Cdc25	фосфатаза клеточного цикла.
ERK	киназа, регулируемая внеклеточными сигналами.
IM	иматиниба мезилат.
JNK	N-концевая киназа c-Jun.
STAT3	сигнальный преобразователь и активатор транскрипции 3.
VEGF-A	фактор роста эндотелия сосудов альфа.
ΔΨm –	мембранный потенциал митохондрий

ВВЕДЕНИЕ

1,4-нафтохинон – природное органическое соединение, получаемое на основе нафталина [1]. Высокая реакционная способность нафтохинонов делает эту группу соединений привлекательной для разработки новых типов веществ с высокой биологической активностью. 1,4-нафтохинон легко поддается окислению, восстановлению, присоединяет нуклеофилы [2]. Для 1,4-нафтохинонов характерны кардиопротективные, противоишемические, гепато- и нейропротективные свойства, показана их роль в защите от нейродегенеративных заболеваний [3]. В литературе встречаются данные о противовоспалительной, противомикробной и противоопухолевой активности как природных, так и синтетических соединений [4–6]. Изучено противоопухолевое действие природных соединений нафтохинона – плюмбагина, шиконина, лапахола [7–9]. Противоопухолевые антибиотики доксорубицин, даунорубицин, имеющие в своей структуре 1,4-нафтохиноновый фрагмент, эф-

фективны в лечении саркомы костей и мягких тканей, лимфомы, острого лейкоза, некоторых солидных опухолей [10]. Некоторые производные нафтохинона могут быть использованы в качестве биохимических инструментов для неинвазивного обнаружения патологических участков в клетках и тканях при инфаркте миокарда и нейродегенеративных заболеваниях с использованием современных методов молекулярной визуализации [3].

По данным ВОЗ, опухолевые заболевания являются основной причиной смертности во всем мире. В 2020 году на их долю приходилось почти 10 миллионов смертей, или почти каждая шестая смерть[1]. Традиционные методы терапии включают хирургическое вмешательство, лучевую и/или системную терапию (химиотерапия, гормональное лечение, таргетная биологическая терапия). В некоторых ситуациях хирургическое вмешательство невозможно, а химиотерапия имеет массу нежелательных последствий. Среди природных соединений 1,4-нафтохинона плюмбагин и шиконин использовались при разработке потенциальных противоопухолевых соединений [11–13]. Ряд исследований продемонстрировал, что различные структуры заместителей позволяют производным нафтохинона обладать разной биологической активностью [14, 15]. Таким образом, путем модификации молекулы 1,4-нафтохинона возможно получение соединений, проявляющих высокую цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам с минимальными побочными эффектами.

Возможные мишени противоопухолевой терапии и их участие в опухолевой прогрессии

Апоптоз – генетически запрограммированный способ гибели клеток, играющий важную роль в развитии организма и гомеостазе тканей. Большинство методов лечения опухолей индуцируют апоптоз и регулируют сигнальные пути для уничтожения клеток. Существуют два основных пути апоптоза: внешний и внутренний. Внешний путь связан с рецепторопосредованной инициацией апоптоза. Активация рецепторов фактора некроза опухоли альфа (ФНО), расположенных на клеточной мембране, приводит к расщеплению прокаспаз с образованием активных каспаз [16, 17]. Каспазы занимают центральное место в механизме апоптоза, являясь одновременно инициаторами (каспазы-2, -8, -9 и -10, ответственные за начало апоптотического пути) и исполнителями (каспазы-3, -6 и -7, ответственные за определенное расщепление клеточных компонентов) клеточной гибели [18]. Каспаза-3 существует в виде неактивного фермента, который подвергается протеолитическому расщеплению в консервативных аспарагиновых остатках с образованием больших и малых субъединиц, которые димеризуются в активный фермент [19]. Долгое время считалось, что каспаза-7 функционально дублирует каспазу-3, но подробные биохимические исследования показали, что она также выполняет отдельные, недублирующие роли в апоптозе и воспалении. Эти исследования демонстрируют, что каспазы-3 и -7 проявляют различную активность по отношению к белковым субстратам, при этом каспаза-7 является более селективной. Зрелые каспазы-3 и -7 расщепляют большой набор субстратов, что в конечном итоге приводит к характерным морфологическим признакам апоптоза, таким как ядерная конденсация и фрагментация геномной ДНК [20].

Внутренний путь апоптоза опосредован внутриклеточными сигналами, которые сходятся на митохондриальном уровне [21]. Митохондрии играют важную роль в передаче сигналов, вызывающих гибель клеток, которая регулируется проапоптотическими белками Bax и антиапоптотическими белками Bcl-2 [17]. Проапоптотические белки, такие как Bax и Bak, при активации образуют поры во внешней митохондриальной мембране. Апоптогенные факторы (например, цитохром c) могут высвобождаться через эту мембрану в цитозоль, что приводит к активации каскада каспаз и к клеточной гибели. Антиапоптотические белки – Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w и Bfl-1/A1 – ингибируют внутренний путь апоптоза, прямо или косвенно противодействуя активности Bak/Bax [22, 23].

Митогенактивируемая протеинкиназа (MAPK) – критический сигнальный фермент, играющий роль в выживании, распространении и устойчивости опухолевых клеток к лекарственной терапии. Семейство MAPK, которое включает киназу, регулируемую внеклеточными сигналами (ERK), p38, MAPK и N-концевую киназу c-Jun (JNK), играет важную роль в пролиферации клеток, регуляции клеточного цикла, дифференцировке, выживании и апоптозе [24]. ERK в основном связаны с пролиферацией и дифференцировкой, в то время как киназы JNK и p38 регулируют реакцию на клеточные стрессы. Передача сигналов JNK влияет на метастазирование и злокачественную трансформацию клеток [25]. Протеинкиназы JNK активируются путем двойного фосфорилирования треонина и тирозина с помощью киназ митогенактивируемых протеинкиназ 4 и 7 (MKK4 и MKK7). MKK7 активируется в первую очередь цитокинами (например, ФНО), а MKK4 – в ответ на стрессовые стимулы [26]. Таким образом, разработка специфических ингибиторов MKK7 может представлять собой новую терапевтическую стратегию лечения различных патологий, при этом физиологическая роль JNK, регулируемая MKK4, будет сохранена [27].

Фосфатазы Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B и Cdc25C у человека), которые отвечают за дефосфорилирование специфических остатков тирозина/треонина на цик-

[1] Рак. Всемирная организация здравоохранения. Доступно по: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer. Ссылка активна на 10.06.2024.

линзависимых киназах, действуют как важные регуляторы контроля клеточного цикла во время нормального деления эукариотических клеток. Поскольку сверхэкспрессия Cdc25A и Cdc25B выявляется у многих видов опухолей и часто коррелирует с плохим клиническим исходом, ингибирование этих ферментов рассматривается как возможная противоопухолевая стратегия [28]. Так, сверхэкспрессия Cdc25A и Cdc25B выявлена при неходжкинской лимфоме, раке пищевода, желудка, легких, щитовидной железы, а также раке головы и шеи [29].

Сигнальный преобразователь и активатор транскрипции 3 (STAT3) регулирует рост опухолевых клеток и их устойчивость к апоптозу и был исследован в качестве лекарственной мишени для терапии рака [30]. STAT3 участвует в регуляции пролиферации, апоптоза, метастазирования, ангиогенеза, устойчивости к лекарствам, также выявлены его новые функции, такие как эпигенетическая регуляция, иммунный надзор, воспаление опухоли [31].

Одним из отличительных и почти универсальных признаков роста опухоли является гипоксия. Некоторые исследования показывают, что истощение кислорода стимулирует митохондрии опухолевых клеток к выработке активных форм кислорода (АФК) с последующей активацией сигнальных путей, способствующих выживанию клеток и росту опухоли [32]. То есть клетки опухоли используют сигналы АФК для управления пролиферацией и другими событиями, необходимыми для прогрессирования опухоли. Это приводит к состоянию повышенного базального окислительного стресса. В то же время именно это делает клетки опухоли уязвимыми к действию химиотерапевтических агентов, которые еще больше усиливают генерацию АФК или ослабляют антиоксидантную защиту клетки. Таким образом, опухолевые клетки могут погибать при участии тех же систем, которые им необходимы [33]. Интересно, что митохондрии являются как источником, так и мишенью АФК. Высвобождение цитохрома с из митохондрий, которое запускает активацию каспаз, в значительной степени опосредовано прямым или косвенным действием АФК [34]. Таким образом, селективное накопление АФК клетками опухоли может являться многообещающей стратегией терапии рака.

Исследования противоопухолевой активности синтетических производных на основе молекулы 1,4-нафтохинона

В попытке разработать соединения со сниженными побочными и оптимизированными противоопухолевыми эффектами были синтезированы два новых типа производных 1,4-нафтохинона, а именно 2,3-дигидро-2,3-эпокси-2-пропилсульфонил-5,8-диметокси-1,4-нафтохинон (EPDMNQ) и 2,3-дигидро-2,3-эпокси-2-нонилсульфонил-5,8-диметокси-1,4-нафтохинон (ENDMNQ) [35]. Исследование противоопухолевой активности соединений проводилось на клеточных линиях гепатоцеллюлярной карциномы человека Hep3B и Huh7 и гепатобластомы человека HepG2, а также на неопухолевых линиях клеток человека – фибробластов легких IMR-90, печени L-02 и эпителия желудка GES-1. Цитотоксическое действие исследуемых соединений сравнивали с эффектами 5-фторурацила (5-ФУ). EPDMNQ и ENDMNQ ингибировали пролиферацию клеток Hep3B, HepG2 и Huh7 дозозависимым образом. Цитотоксический эффект EPDMNQ и ENDMNQ на клетки рака печени был значительно выше по сравнению с 5-ФУ. При этом исследуемые соединения проявляли более низкую цитотоксичность по сравнению с обработкой 5-ФУ в клеточных линиях здоровых тканей. Процент апоптотических клеток после 24 часов обработки EPDMNQ и ENDMNQ составил 59,0 и 47,4 % соответственно. Наиболее чувствительными к обработке EPDMNQ и ENDMNQ из трех линий опухолевых клеток оказались клетки Hep3B. Обработка клеток Hep3B соединениями EPDMNQ и ENDMNQ значительно повышала уровни Bax, каспазы-3 и снижала уровни белка Bcl-2. Апоптоз, индуцированный EPDMNQ и ENDMNQ, сопровождался накоплением АФК [35].

В исследовании H. Wang и соавт. [36] изучались 2 производных 1,4-нафтохинона с высокой липофильностью, названные 2-(бутан-1-сульфинил)-1,4-нафтохинон (BQ) и 2-(октан-1-сульфинил)-1,4-нафтохинон (OQ), и была показана их противоопухолевая активность в зависимости от длины углеродной цепи. Исследование проводилось на восьми клеточных линиях рака желудка (AGS, MKN-45, NCI-N87, SUN-5, KATO-3, YCC-1, YCC-6, YCC-16 и SNU-5). В качестве контроля использовались неопухолевые клеточные линии GES-1, L-02, IMR-90. Цитотоксичность измеряли с использованием MTT-анализа в сравнении с 5-ФУ или шиконином. Результаты показали, что BQ и OQ значительно снижали жизнеспособность клеток рака желудка человека дозозависимым образом, а проапоптотические эффекты были выше, чем в группах положительного контроля 5-ФУ и шиконина, при этом жизнеспособность неопухолевых клеточных линий человека пострадала минимально. Результаты проточной цитометрии и вестерн-блоттинга показали, что BQ и OQ индуцируют апоптоз клеток зависимым от времени образом. Популяция апоптотических клеток после обработки исследуемыми соединениями значительно увеличивалась, а также повышалась экспрессия проапоптотического белка Bad, каспазы-3 и снижалась – антиапоптотического белка Bcl-2. BQ и OQ заметно повышали фосфорилирование p38 и JNK и снижали фосфорилирование ERK и STAT3 в клетках линии AGS в зависимости от времени воздействия на клетки. Авторы делают вывод, что сигнальные пути MAPK и STAT3 играют важную роль в апоптозе, индуцированном BQ и OQ. Несмотря на

то, что оба соединения имеют одни и те же мишени, противоопухолевая активность BQ была выше, чем у OQ, в клетках линии AGS. Предположительно разница может быть вызвана двумя причинами. BQ обладает более низкой молекулярной массой и с большей вероятностью проникнет через клеточную мембрану и попадет в клетку. Во-вторых, OQ с более длинной углеродной цепью обладает хорошими пленкообразующими свойствами, поэтому его собственная эффекторная группа в меньшей степени подвергается связыванию с соответствующей молекулой-мишенью [36].

Одной из многообещающих стратегий улучшения и оптимизации свойств противоопухолевых средств можно считать комбинацию двух соединений в структуре молекулы. В исследовании [37] синтезировали и проанализировали гибридные молекулы, содержащие как 1,4-нафтохиноновое ядро, так и 2-хлорэтилтиогруппу (сернистый иприт), которая воздействует на ДНК за счет необратимого алкилирования остатков гуанина. Их противоопухолевая активность (отдельно и в сочетании с традиционными химиотерапевтическими средствами) изучалась на андрогеннезависимых клеточных линиях 22Rv1 рака простаты. Для сравнения были выбраны неопухолевые эпителиальные клетки простаты человека PNT2, а также человеческие фибробласты MRC-9. Из синтезированной библиотеки соединений два (под номерами **30** и **32**) проявили самую высокую активность и избирательность и были отобраны для дальнейших исследований. Значительная дозозависимая фрагментация ДНК была обнаружена в трех клеточных линиях после 48 часов инкубации с соединениями **30** и **32**. Проапоптотические эффекты обоих соединений были менее выражены в клетках MRC-9, что подчеркивает их более высокую активность в клетках опухолей. Соединения **30** и **32**, а также разобщитель митохондриального окислительного фосфорилирования карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон провоцируют деполяризацию митохондриальной мембраны, что проявляется уменьшением мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi m$). Одновременно наблюдалось снижение экспрессии Bcl-2, что также может способствовать потере $\Delta\Psi m$. Повышение уровня АФК наблюдалось уже через 2 часа лечения в области наномолярных концентраций соединений. Одновременная обработка антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином резко подавляла цитотоксические эффекты обоих соединений. Таким образом, высказано предположение, что механизмом противоопухолевой активности является классический каспазозависимый апоптоз, предположительно осуществляемый посредством индукции цитотоксических АФК, воздействия на митохондрии и повреждения ДНК [37].

В работе [38] сообщается о синтезе, структурной характеристике и биологической оценке новых производных фениламиносульфанил-1,4-нафтохинона. Цитотоксическая активность синтезированных соединений оценивалась в отношении трех линий опухолевых клеток человека: A549 (карцинома легкого человека), HeLa (опухоль шейки матки) и MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы). Три соединения – **5e** [3,5-дихлор-N-(4-((4-((1,4-диоксо-3-(фенилтио)-1,4-дигидронафталин-2-ил)амино)фенил) сульфонил)фенил)бензамид], **5f** [N-(4-((4-((1,4-диоксо-3-(фенилтио)-1,4-дигидронафталин-2-ил)амино)фенил)сульфонил)фенил)-3,5-динитробензамид] и **5p** [N-(4-((4-((1,4-диоксо-3-(фенилтио)-1,4-дигидронафталин-2-ил)амино)фенил)сульфонил)фенил)тиофен-2-карбоксамид] – проявили заметную цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток и показали низкую токсичность в отношении нормальных клеток почек человека. Эффективность соединений сравнивали с действием доксорубицина. Во всех трех линиях опухолевых клеток соединения при использовании в дозах 0,10 мкм (**5e**), 0,18 мкм (**5f**) и 0,04 мкм (**5p**) индуцировали апоптоз у 99, 98 и 99 % клеток соответственно. Обработка клеток данными соединениями в течение 48 часов приводила к повышению экспрессии мРНК каспазы-3 и каспазы-7. Таким образом, синтезированные производные индуцируют апоптоз в результате усиления экспрессии генов каспаз-3 и -7 [38].

Еще одно исследование посвящено снижению токсичности и повышению противоопухолевого потенциала производных 1,4-нафтохинона. Синтезировано новое производное 1,4-нафтохинона, 2-(нафталин-2-тио)-5,8-диметокси-1,4- нафтохинон (NTDMNQ), его проапоптотические эффекты исследованы в линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, Hep3B и Huh7 в сравнении с 5-ФУ. NTDMNQ значительно ингибировал жизнеспособность клеток гепатоцеллюлярной карциномы и оказывал меньшее цитотоксическое воздействие на клетки линий L-02, IMR90. В дальнейшем исследование продолжалось на более чувствительной линии HepG2. В зависимости от времени воздействия (3, 6, 12 и 24 ч) уровень апоптоза клеток увеличился с 3,5 до 54,8 %. Кроме того, NTDMNQ снизил количество Bcl-2 и увеличил уровень каспазы-3. Эти результаты доказывают, что NTDMNQ может в значительной степени индуцировать апоптоз клеток HepG2 митохондриальным путем. NTDMNQ увеличивал фосфорилирование p38 и JNK и снижал фосфорилирование STAT3 в зависимости от времени инкубации. Эти результаты позволяют предположить, что MAPK и STAT3 опосредуют NTDMNQ-индуцированный апоптоз. Предварительная обработка клеток N-ацетилцистеином значительно ингибировала апоптоз, подавляла NTDMNQ-индуцированное фосфорилирование MAPK и STAT3 и ослабляла активацию каспазы-3. Таким образом, NTDMNQ индуцирует апоптоз через АФК-опосредованные сигнальные пути MAPK и STAT3 [39].

Тройной негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) представляет собой высокоагрессивную форму рака молочной железы. При ТНРМЖ отсутствует экспрессия рецептора эстрогена α (ERα), рецептора прогестерона (PR) и рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2). Утрата этих терапевтических мишеней ограничивает возможности химиотерапии. В исследовании [40] рассматривается использование 2,3-дихлор-5,8-диметокси-1,4-нафтохинона (Z285) и 4-гидрокситамоксифена (4-OHT) по отдельности или в комбинации на клеточных линиях рака молочной железы MCF7 и TNBC. В одном из ранних исследований было показано, что подобное соединение на основе 1,4-нафтохинона вызывает ингибирование топоизомеразы I, что могло привести к апоптозу [41]. Тамоксифен и его активные метаболиты являются лигандами ERα, ERβ, GPER1, эстрогенсвязанного рецептора β и эстрогенсвязанного рецептора γ [42]. Показано, что 4-OHT является агонистом ERβ, ингибирующим пролиферацию, миграцию и инвазию клеток в клеточных линиях TNBC [43]. Результаты настоящей работы показали зависимое от дозы и времени снижение пролиферации клеточных линий рака молочной железы при обработке Z285, 4-OHT и их комбинацией. Однако механизмы, связанные с аддитивным эффектом, до конца не выяснены.

Целью исследования A. J. de Sousa Portilho и соавт. [44] было изучение противоопухолевого действия 5-гидрокси-2-(4-толилтио)нафталин-1,4-диона (CNN1) в клеточной линии лейкемии с множественной лекарственной устойчивостью. Использовали линии хронического миелолейкоза (K-562), устойчивые к винкристину (K-562-Lucena1), устойчивые к даунорубицину (FEPS). Иматиниба мезилат (IM) использовали в качестве положительного контроля. Нафтохинон CNN1 проявлял цитотоксическую активность, запуская апоптоз в клеточных линиях K-562 и FEPS. Выявлено нарушение целостности клеточных мембран лейкозных клеток. CNN1 вызывал деполяризацию мембранного потенциала митохондрий в обеих линиях лейкозных клеток, и его эффект был более выраженным по сравнению с действием IM ($p < 0{,}001$). CNN1 индуцировал сверхэкспрессию *H2AFX* в клетках K-562 ($p < 0{,}01$) и FEPS ($p < 0{,}01$). Предполагается, что активация гена *H2AFX* играет важную роль в инициации гибели клеток в клеточных линиях лейкоза с множественной лекарственной устойчивостью через сигнальный путь повреждения ДНК. *H2AFX* кодирует белок, член семейства гистонов H2AX, необходимый для передачи сигналов белков репарации ДНК, главным образом в местах возможного повреждения хроматина, а также для активации белков контрольных точек, блокирующих клеточный цикл [45].

Объединение 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона с тимидином и его производными позволило получить новый класс гибридов тимидина как потенциальных противоопухолевых средств. В работе [46] синтезированы семь гибридов 1,4-нафтохинона с производными тимидина. Цитотоксичность синтезированных соединений была проверена в отношении клеточных линий плоскоклеточного рака (SCC-9 и SCC-25), рака подчелюстной железы (A-253) и неопухолевой эпителиальной клеточной линии (Beas-2B). Так как апоптоз может быть вызван ингибированием антиапоптотических белков (в частности Bcl-2), исследование было дополнено анализом молекулярного докинга для выяснения реакции между гибридами и белком Bcl-2. В результате исследования выяснено, что 2-хлор-3-(3'-азидо-3'-дезокситимидин)-1,4-нафтохинон (соединение **5**) проявляет наибольшую цитотоксичность в отношении линии плоскоклеточного рака (SCC-25). В концентрации 7 мкМ снижает количество жизнеспособных клеток примерно до 70 % и увеличивает количество апоптотических клеток примерно до 30 %. По результатам молекулярного докинга лиганд **5** создает водородные связи с активным центром белка Bcl-2, что может способствовать проявлению цитотоксичности [46].

Терапия, направленная на ингибирование ангиогенеза опухоли, является одной из разрабатываемых стратегий лечения солидных опухолей. Предложены ингибиторы ангиогенеза, нацеленные на фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) для комбинированной терапии [47]. После проверки библиотеки синтетических соединений H. Murota и соавт. [48] обнаружили, что 6-тиофен-3-ил-2-метокси-1,4-нафтохинон (6-TMNQ) избирательно ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток. Для оценки ингибирования пролиферации использовали линию сосудистых эндотелиальных клеток мыши F-2 и неэндотелиальные фибробласты линии 3T3. 6-TMNQ ингибировал пролиферацию эндотелиальных клеток, стимулированную сывороткой, фактором роста эндотелия сосудов и основным фактором роста фибробластов, но не влиял на пролиферацию фибробластов. 6-TMNQ заметно подавлял как миграцию, так и образование трубочек эндотелиальных клеток. Пероральное применение 6-TMNQ заметно уменьшало размеры опухоли у мышей за счет ингибирования ангиогенеза. Авторы предполагают, что отсутствие влияния на пролиферацию фибробластов связано с влиянием 6-TMNQ на специфичные для эндотелиальных клеток сигнальные пути [48].

О влиянии нового производного 1,4-нафтохинона PPE8 на ангиогенез также сообщается в исследовании M. J. Hsu и соавт. [49]. Эффекты соединения анализировались на линиях клеток меланомы B16F10, клеток рака молочной железы MDA-MB-231, первичных эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) и клетках фибробластов крайней плоти человека Hs68. Показано, что PPE8 приводит к уменьшению VEGF-A-индуцированной пролиферации, мигра-

ции и инвазии, а также образования трубок в эндотелиальных клетках HUVEC.

В исследовании I. A. Schepetkin и соавт. [27] 33 производных нафтохинона, включая синтетические и природные соединения, были оценены на предмет их ингибирующей/связывающей активности в отношении Cdc25 A/B и MKK7. Для представления о возможном взаимодействии соединений при связывании провели исследования молекулярного докинга MKK7 и Cdc25B. Двадцать выбранных соединений оценивали на предмет их антипролиферативной активности *in vitro* против девяти линий опухолевых клеток человека и первичных мононуклеарных клеток человека с использованием сунитиниба в качестве положительного контроля. Анализ показал, что соединения обладают сродством к MKK7 и высокой ингибирующей активностью в отношении Cdc25 A/B. Показано, что природный нафтохинон плюмбагин обладает высокой ингибирующей активностью в отношении Cdc25A и B и что синтетические соединения **7** и **22e** имеют относительно высокую аффинность связывания с MKK7, но не с MKK4. Молекулярный докинг показал, что все производные нафтохинона, которые ингибировали Cdc25 A/B, фиксировались внутри сайта связывания фермента рядом с Cys473, что благоприятно для переноса электрона от атома серы цистеина к нафтохиноновому фрагменту. Не обнаружено корреляции между сродством связывания нафтохинона с MKK7 и цитотоксичностью соединения, но наблюдалась определенная зависимость между активностью соединений в отношении Cdc25 A/B и цитотоксической активностью против восьми из девяти протестированных линий опухолевых клеток. Авторы делают вывод, что молекулы **6** и **7** могут быть прототипами для создания аналогов с двойной ингибирующей активностью по отношению к MKK7/Cdc25 [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день в литературе представлено достаточное количество публикаций о механизмах реализации противоопухолевого действия производных 1,4-нафтохинона. Соединения на основе молекулы 1,4-нафтохинона проявляют активность против различных опухолевых клеток путем инициации их апоптоза как по внешнему, так и по внутреннему путям. Во многих исследованиях противоопухолевую активность 1,4-нафтохинонов связывают с накоплением АФК, что приводит к окислительному стрессу и последующей гибели опухолевых клеток. Изменение активности фосфатазы с двойной специфичностью Cdc25 и MKK7 в клеточных линиях опухолевых клеток может нарушать клеточный цикл и препятствовать метастазированию. Еще одним возможным механизмом действия производных 1,4-нафтохинона при опухолях может являться угнетение ангиогенеза. Многообразие механизмов действия и исследования на различных линиях опухолевых клеток в сочетании с низкой токсичностью в отношении нормальных клеток делает данную группу соединений привлекательной для дальнейшей разработки с целью поиска потенциальных противоопухолевых лекарственных кандидатов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Thomson R. H., Naturally occurring quinones. 4th ed. London, New York: Blackie Academic & Professional; 1997. 746 p.
2. Shen X., Liang X., He C., Yin L., Xu F., Li H., Tang H., Lv C. Structural and pharmacological diversity of 1,4-naphthoquinone glycosides in recent 20 years. *Bioorganic Chemistry*. 2023;138:106643. DOI: 10.1016/j.bioorg.2023.106643.
3. Aminin D., Polonik S. 1,4-Naphthoquinones: Some Biological Properties and Application. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2020;68(1):46–57. DOI: 10.1248/cpb.c19-00911.
4. Mahmoud I.S., Hatmal M.M., Abuarqoub D., Esawi E., Zalloum H., Wehaibi S., Nsairat H., Alshaer W. 1,4-Naphthoquinone Is a Potent Inhibitor of IRAK1 Kinases and the Production of Inflammatory Cytokines in THP-1 Differentiated Macrophages. *ACS Omega*. 2021;6(39):25299–25310. DOI: 10.1021/acsomega.1c03081.
5. Ravichandiran P., Sheet S., Premnath D., Kim A. R., Yoo D. J. 1,4-Naphthoquinone Analogues: Potent Antibacterial Agents and Mode of Action Evaluation. *Molecules*. 2019;24(7):1437. DOI: 10.3390/molecules24071437.
6. Kayashima T., Mori M., Yoshida H., Mizushina Y., Matsubara K. 1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. *Cancer Letters*. 2009;278(1):34–40. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.12.020.
7. Tripathi S. K., Panda M., Biswal B. K. Emerging role of plumbagin: Cytotoxic potential and pharmaceutical relevance towards cancer therapy. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;125:566–582. DOI: 10.1016/j.fct.2019.01.018.
8. Yadav S., Sharma A., Nayik G. A., Cooper R., Bhardwaj G., Singh Sohal H., Mutreja V., Kaur R., Areche F. O., AlOudat M., Shaikh A. M., Kovács B., Ahmed A. E. M. Review of Shikonin and Derivatives: Isolation, Chemistry, Biosynthesis, Pharmacology and Toxicology. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:905755. DOI: 10.3389/fphar.2022.905755.
9. Mendes Miranda S. E., de Alcântara Lemos J., Salgado Fernandes R., de Oliveira Silva J., Ottoni F. M., Townsend D. M., Rubello D., Alves R. J., Cassali G. D., Miranda Ferreira L. A., Branco de Barros A. L. Enhanced antitumor efficacy of lapachol-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;133:110936. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110936.
10. Muggia F. M., Green M. D. New anthracycline antitumor antibiotics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1991;11(1):43–64. DOI: 10.1016/1040-8428(91)90017-7.
11. Liu Y., Cai Y., He C., Chen M., Li H. Anticancer Properties and Pharmaceutical Applications of Plumbagin: A Review. The *American Journal of Chinese Medicine*. 2017;45(3):423–441. DOI: 10.1142/S0192415X17500264.
12. Yan C., Li Q., Sun Q., Yang L., Liu X., Zhao Y., Shi M., Li X., Luo K. Promising Nanomedicines of Shikonin for Cancer Therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2023;18:1195–1218. DOI: 10.2147/IJN.S401570.

13. Thakor N., Janathia B. Plumbagin: A Potential Candidate for Future Research and Development. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2022;23(15):1800–1812. DOI: 10.2174/1389201023666211230113146.
14. Deniz N. G., Ibis C., Gokmen Z., Stasevych M., Novikov V., Komarovska-Porokhnyavets O., Ozyurek M., Guclu K., Karakas D., Ulukaya E. Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Antioxidant and Cytotoxic Activity of Heteroatom-Substituted 1,4-Naphtho- and Benzoquinones. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2015;63(12):1029–1039. DOI: 10.1248/cpb.c15-00607.
15. Golmakaniyoon S., Askari V.R., Abnous K., Zarghi A., Ghodsi R. Synthesis, Characterization and *In-vitro* Evaluation of Novel Naphthoquinone Derivatives and Related Imines: Identification of New Anticancer Leads. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2019;18(1):16–29.
16. Xu X., Lai Y., Hua Z.-C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*. 2019;39(1):BSR20180992. DOI: 10.1042/BSR20180992.
17. Newton K., Strasser A., Kayagaki N., Dixit V. M. Cell death. *Cell*. 2024;187(2):235–256. DOI: 10.1016/j.cell.2023.11.044.
18. Thornberry N. A., Lazebnik Yu. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312–1316. DOI: 10.1126/science.281.5381.1312.
19. Asadi M., Taghizadeh S., Kaviani E., Vakili O., Taheri-Anganeh M., Tahamtan M., Savardashtaki A. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2022;69(4):1633–1645. DOI: 10.1002/bab.2233.
20. Lamkanfi M., Kanneganti T.-D. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42(1):21–24. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.09.013.
21. Pistritto G., Trisciuoglio D., Ceci C., Garufi A., D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 2016;8(4):603–619. DOI: 10.18632/aging.100934.
22. Chipuk J. E., Green D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology*. 2008;18(4):157–164. DOI: 10.1016/j.tcb.2008.01.007.
23. Kim H., Rafiuddin-Shah M., Tu H.-C., Jeffers J. R., Zambetti G. P., Hsieh J. J.-D., Cheng E. H.-Y. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biology*. 2006;8(12):1348–1358. DOI: 10.1038/ncb1499.
24. Zhang W., Liu H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. 2002;12:9–18. DOI: 10.1038/sj.cr.7290105.
25. Wu Q., Wu W., Fu B., Shi L., Wang X., Kuca K. JNK signaling in cancer cell survival. *Medicinal Research Reviews*. 2019;39(6):2082–2104. DOI: 10.1002/med.21574.
26. Davis R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000;103(2):239–252. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00116-1.
27. Schepetkin I. A., Karpenko A. S., Khlebnikov A. I., Shibinska M. O., Levandovskiy I. A., Kirpotina L. N., Danilenko N. V., Quinn M. T. Synthesis, anticancer activity, and molecular modeling of 1,4-naphthoquinones that inhibit MKK7 and Cdc25. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;183:111719. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111719.
28. Lavecchia A., Coluccia A., Di Giovanni C., Novellino E. Cdc25B phosphatase inhibitors in cancer therapy: latest developments, trends and medicinal chemistry perspective. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2008;8(8):843–856. DOI: 10.2174/187152008786847783.
29. Kristjánsdóttir K., Rudolph J. Cdc25 phosphatases and cancer. *Chemistry & Biology*. 2004;11(8):1043–1051. DOI: 10.1016/j.chembiol.2004.07.007.
30. Kim B.-H., Yi E. H., Ye S.-K. Signal transducer and activator of transcription 3 as a therapeutic target for cancer and the tumor microenvironment. *Archives of Pharmacal Research*. 2016;39(8):1085–1099. DOI: 10.1007/s12272-016-0795-8.
31. Hu Y., Dong Z., Liu K. Unraveling the complexity of STAT3 in cancer: molecular understanding and drug discovery. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2024;43(1):23. DOI: 10.1186/s13046-024-02949-5.
32. Fruehauf J. P., Meyskens F. L. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical Cancer Research*. 2007;13(3):789–794. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2082.
33. Schumacker P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*. 2006;10(3):175–176. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.08.015.
34. Kumar N., Shukla A., Kumar S., Ulasov I., Singh R. K., Kumar S., Patel A., Yadav L., Tiwari R., Paswan R., Mohanta S. P., Kaushalendra, Antil J., Acharya A. FNC (4'-azido-2'-deoxy-2'-fluoro(arbino)cytidine) as an Effective Therapeutic Agent for NHL: ROS Generation, Cell Cycle Arrest, and Mitochondrial-Mediated Apoptosis. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2024;82:623–639. DOI: 10.1007/s12013-023-01193-6.
35. Wang Y., Luo Y.-H., Piao X.-J., Shen G.-N., Meng L.-Q., Zhang Y., Wang J.-R., Li J.-Q., Wang H., Xu W.-T., Liu Y., Zhang Y., Zhang T., Wang S.-N., Sun H.-N., Han Y.-H., Jin M.-H., Zang Y.-Q., Zhang D.-J., Jin C.-H. Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce reactive oxygen species-mediated apoptosis in liver cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. 2019;19(3):1654–1664. DOI: 10.3892/mmr.2018.9785.
36. Wang H., Luo Y.-H., Shen G.-N., Piao X.-J., Xu W.-T., Zhang Y., Wang J.-R., Feng Y.-C., Li J.-Q., Zhang Y., Zhang T., Wang S.-N., Xue H., Wang H.-X., Wang C.-Y., Jin C.-H. Two novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest by regulating reactive oxygen species-mediated MAPK/Akt/STAT3 signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*. 2019;20(3):2571–2582. DOI: 10.3892/mmr.2019.10500.
37. Dyshlovoy S. A., Pelageev D. N., Jakob L. S., Borisova K. L., Hauschild J., Busenbender T., Kaune M., Khmelevskaya E. A., Graefen M., Bokemeyer C., Anufriev V. P., von Amsberg G. Activity of New Synthetic (2-Chloroethylthio)-1,4-naphthoquinones in Prostate Cancer Cells. *Pharmaceuticals*. 2021;14(10):949. DOI: 10.3390/ph14100949.
38. Ravichandiran P., Subramaniyan S. A., Kim S.-Y., Kim J.-S., Park B.-H., Shim K. S., Yoo D. J. Synthesis and Anticancer Evaluation of 1,4-Naphthoquinone Derivatives Containing a Phenylaminosulfanyl Moiety. *ChemMedChem*. 2019;14(5):532–544. DOI: 10.1002/cmdc.201800749.
39. Liu Y., Luo Y.-H., Li S.-M., Shen G.-N., Wang J.-R., Zhang Y., Feng Y.-C., Xu W.-T., Zhang Y., Zhang T., Xue H., Wang H.-X., Cui Y., Wang Y., Jin C.-H. 2-(Naphthalene-2-thio)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone induces apoptosis via ROS-mediated MAPK, AKT, and STAT3 sig-

naling pathways in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Drug and Chemical Toxicology*. 2022;45(1):33–43. DOI: 10.1080/01480545.2019.1658767.

40. Robinson A. G. J., Kanaan Y. M., Copeland R. L. Combinatorial Cytotoxic Effects of 2,3-Dichloro-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone and 4-hydroxytamoxifen in Triple-negative Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Research*. 2020;40(12):6623–6635. DOI: 10.21873/anticanres.14687.
41. Copeland R. L. (Jr.), Das J. R., Bakare O., Enwerem N. M., Berhe S., Hillaire K., White D., Beyene D., Kassim O. O., Kanaan Y. M. Cytotoxicity of 2,3-dichloro-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines. *Anticancer Research*. 2007;27:1537–1546.
42. Tremblay G. B., Bergeron D., Giguere V. 4-Hydroxytamoxifen is an isoform-specific inhibitor of orphan estrogen-receptor-related (ERR) nuclear receptors β and γ. *Endocrinology*. 2001;142(10):4572–4575. DOI: 10.1210/endo.142.10.8528.
43. Austin D., Hamilton N., Elshimali Y., Pietras R., Wu Y., Vadgama J. Estrogen receptor-beta is a potential target for triple negative breast cancer treatment. *Oncotarget*. 2018;9(74):33912–33930. DOI: 10.18632/oncotarget.26089.
44. De Sousa Portilho A. J., da Silva E. L., Austregésilo Bezerra E. C., Borges de Souza Moraes Rego Gomes C., Ferreira V., Amaral de Moraes M. E., Rodrigues da Rocha D., Rodriguez Burbano R. M., Aquino Moreira-Nunes C., Carvalho Montenegro R. 1,4-Naphthoquinone (CNN1) Induces Apoptosis through DNA Damage and Promotes Upregulation of H2AFX in Leukemia Multidrug Resistant Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(15):8105. DOI: 10.3390/ijms23158105.
45. Podhorecka M., Skladanowski A., Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acids*. 2010;2010:920161. DOI: 10.4061/2010/920161.
46. Kadela-Tomanek M., Krzykawski K., Halama A., Kubina R. Hybrids of 1,4-Naphthoquinone with Thymidine Derivatives: Synthesis, Anticancer Activity, and Molecular Docking Study. *Molecules*. 2023;28(18):6644. DOI: 10.3390/molecules28186644.
47. Patel S. A., Nilsson M. B., Le X., Cascone T., Jain R. K., Heymach J. V. Molecular Mechanisms and Future Implications of VEGF/VEGFR in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2023;29(1):30–39. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1366.
48. Murota H., Shinya T., Nishiuchi A., Sakanaka M., Toda K.-I., Ogata T., Hayama N., Kimachi T., Takahashi S. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by a novel 1,4-naphthoquinone derivative. *Drug Development Research*. 2019;80(3):395–402. DOI: 10.1002/ddr.21513.
49. Hsu M.-J., Chen H.-K., Lien J.-C., Huang Y.-H., Huang S.-W. Suppressing VEGF-A/VEGFR-2 Signaling Contributes to the Anti-Angiogenic Effects of PPE8, a Novel Naphthoquinone-Based Compound. *Cells*. 2022;11(13):2114. DOI: 10.3390/cells11132114.

Обзорная статья / Review article

УДК 615.45; 614.014.2; 544.582.3

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1882

Check for updates

CC BY 4.0

Фармацевтическая разработка и практические подходы к синтезу радиофармацевтического лекарственного препарата на основе тропантиола ([^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1) для диагностики нейродегенеративных заболеваний (обзор)

Е. П. Павленко✉, **А. О. Малышева**, **А. А. Ларенков**✉✉

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России). 123098, Россия, г. Москва, ул. Живописная, д. 46

✉ **Контактное лицо:** Павленко Екатерина Павловна. **E-mail:** pavlenko.katya@yandex.ru
✉✉ **Контактное лицо:** Ларенков Антон Алексеевич. **E-mail:** anton.larenkov@gmail.com

ORCID: Е. П. Павленко – https://orcid.org/0000-0002-6638-4292;
А. О. Малышева – https://orcid.org/0000-0002-9508-2840;
А. А. Ларенков – https://orcid.org/0000-0003-4810-4346.

Статья поступила: 25.07.2024 **Статья принята в печать:** 11.12.2024 **Статья опубликована:** 13.12.2024

Резюме

Введение. Симптомы болезни Паркинсона в основном связаны с образованием белковых внутринейрональных включений с тельцами Леви, а также прогрессирующей потерей дофаминергических нейронов черной субстанции (*Substantia nigra*) и их аксонов. Существующие диагностические критерии для постановки диагноза «болезнь Паркинсона» зачастую учитывают симптомы, возникающие на поздних стадиях заболевания. Таким образом, для более точной постановки диагноза на ранних стадиях необходимо подтвердить патологические изменения в тканях головного мозга методами молекулярной визуализации, такими как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ). При этом ОФЭКТ является более доступным методом диагностики нейродегенеративных заболеваний по сравнению с ПЭТ из-за возможности получения медицинских радионуклидов для визуализации методом ОФЭКТ с помощью мобильных генераторных систем, в частности генератора ^{99}Mo/^{99m}Tc. Среди препаратов на основе ^{99m}Tc и производных тропана, предложенных для визуализации транспортеров дофамина (DAT), наиболее эффективным является [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 (меченный технецием-99m тропантиол). На данный момент предложены различные составы готовых наборов реагентов в форме лиофилизатов для синтеза [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1, облегчающих процесс его изготовления на месте применения, что вместе с доступностью генератора техенция-99m в медицинском учреждении, а также оптимальной фармакокинетикой делает [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 препаратом выбора для рутинного применения в клинической практике.

Текст. В данном обзоре были рассмотрены различные подходы к разработке и оптимизации состава готовых наборов реагентов для синтеза [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 (лиофилизатов), включая количество и соотношение активного вещества и вспомогательных веществ, условия синтеза препарата, в частности температурный режим, время синтеза и pH реакционной смеси.

Заключение. Разработка и оптимизация состава готовых наборов лиофилизатов для синтеза [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 является актуальной задачей в контексте совершенствования его применения в клинической практике. На основании опубликованных данных прослеживаются четкие зависимости, которые могут лечь в основу дальнейшей разработки и оптимизации состава готовых наборов лиофилизатов для синтеза [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 для диагностики болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний методом ОФЭКТ в Российской Федерации.

Ключевые слова: радиофармацевтические препараты, технеций-99m, диагностика, нейродегенеративные заболевания, болезнь Паркинсона, транспортер дофамина, тропантиол, TRODAT-1, фармацевтическая разработка

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

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

© Павленко Е. П., Малышева А. О., Ларенков А. А., 2025
© Pavlenko E. P., Malysheva A. O., Larenkov A. A., 2025

Для цитирования: Павленко Е. П., Малышева А. О., Ларенков А. А. Фармацевтическая разработка и практические подходы к синтезу радиофармацевтического лекарственного препарата на основе тропантиола ([^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1) для диагностики нейродегенеративных заболеваний. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):112–126. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1882

Pharmaceutical development and practical approach to synthesis of tropantiol radiopharmaceutical ([^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1) for diagnostic of neurodegenerative diseases (review)

Ekaterina P. Pavlenko✉, Anna O. Malysheva, Anton A. Larenkov✉✉

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

✉ **Corresponding author:** Ekaterina P. Pavlenko. **E-mail:** pavlenko.katya@yandex.ru
✉✉ **Corresponding author:** Anton A. Larenkov. **E-mail:** anton.larenkov@gmail.com

ORCID: Ekaterina P. Pavlenko – https://orcid.org/0000-0002-6638-4292;
Anna O. Malysheva – https://orcid.org/0000-0002-9508-2840;
Anton A. Larenkov – https://orcid.org/0000-0003-4810-4346.

Received: 25.07.2024 **Accepted:** 11.12.2024 **Published:** 13.12.2024

Abstract

Introduction. The symptoms of Parkinson's disease are mainly associated with the formation of intraneuronal protein inclusions with Lewy bodies, and the progressive loss of dopaminergic neurons of the *Substantia nigra* and their axons. Existing diagnostic criteria for the diagnosis of Parkinson's disease often take into account symptoms occurring in the later stages of the disease. Thus, for a more accurate diagnosis in the early stages, it is necessary to confirm pathologic changes in brain tissue by molecular imaging methods such as positron emission tomography (PET) and single-photon emission computed tomography (SPECT). At the same time SPECT is a more accessible method of diagnostics of neurodegenerative diseases in comparison with PET, because of the possibility to obtain medical radionuclides for SPECT imaging using mobile generator systems, in particular ^{99}Mo/^{99m}Tc generator. Among the formulations based on ^{99m}Tc and tropane derivatives proposed for dopamine transporter (DAT) imaging, [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 (technetium-99m-labeled tropantiol) is the most effective. Currently, various compositions of the freeze-dried kits for the synthesis of [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 have been proposed, facilitating the process of its production *in situ*, which, together with the availability of technetium-99m generator in a healthcare facility, as well as favorable pharmacokinetics, makes [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 a drug of choice for routine use in clinical practice.

Text. In this review, various approaches to design and optimize the composition of the freeze-dried kits for the synthesis of [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1, including the amount and ratio of active ingredient and excipients, synthesis conditions, in particular the temperature regime, synthesis time and pH of the reaction mixture, have been considered.

Conclusion. Development and optimization of the composition of the freeze-dried kits for the synthesis of [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 is an urgent task in the context of improving its use in clinical practice. Based on the published data, clear dependencies can be traced, which may form the basis for further development and optimization of the composition of the freeze-dried kits for [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 synthesis for the diagnosis of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases by SPECT in the Russian Federation.

Keywords: radiopharmaceuticals, technetium-99m, diagnostics, neurodegenerative diseases, Parkinson's disease, dopamine transporter, tropantiol, TRODAT-1, pharmaceutical design

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

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

For citation: Pavlenko E. P., Malysheva A. O., Larenkov A. A. Pharmaceutical development and practical approach to synthesis of tropantiol radiopharmaceutical ([^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1) for diagnostic of neurodegenerative diseases. *Drug development & registration*. 2025;14(1):112–126. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1882

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона – хроническое, прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое вызывает двигательные нарушения, такие как брадикинезия в конечностях, за которыми следуют постуральная нестабильность, ригидность, тремор покоя и нарушения походки, которые в основном связаны с образованием белковых внутринейрональных включений с тельцами Леви, а также прогрессирующей потерей дофаминергических нейронов черной субстанции и их аксонов [1, 2]. Помимо нигростриарной дофаминергической системы, обнаруживается патология обонятельной системы, ствола и коры головного мозга [3]. Таким образом, возникает вегетативная дисфункция, обонятельная дисфункция, а также когнитивные и психологические патологии (усталость, тревога, депрессия, компульсивность, психоз) [4–10].

Для постановки диагноза «болезнь Паркинсона» клиническое обследование пациентов проводится в несколько этапов и содержит определенный ряд критериев, которые со временем подвергались критике и в последствии дорабатывались [11]. Например, критерии Гельба [12] и UKPDSBB (UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Diagnostic Criteria) ориентированы только на двигательные функции, тогда как было показано, что болезнь Паркинсона связана с многочисленными когнитивными симптомами, дающими положительный ответ на лечение леводопой (L-DOPA, 3-гидрокси-L-тирозин): нарушениями сна, расстройствами настроения, вегетативной недостаточностью, сенсорными проблемами и когнитивными нарушениями. При этом сильно выраженные когнитивные нарушения, согласно критериям Гельба [12], становятся причиной исключения болезни Паркинсона и постановки альтернативного диагноза – деменция с тельцами Леви [11, 13, 14]. Однако такое взаимоисключение остается спорным, так как оба заболевания сопровождаются паркинсонизмом и деменцией [15]. Кроме того, клинические особенности болезни Паркинсона присутствуют также при таких заболеваниях, как эссенциальный тремор, кортикобазальная дегенерация, множественная системная атрофия, прогрессирующий супрануклеарный паралич [16], которые чаще всего встречаются у пожилых людей и еще больше усложняют постановку диагноза данной группе населения [17, 18]. Таким образом, ошибочный диагноз, особенно на ранних стадиях заболевания, встречается достаточно часто и спустя несколько лет наблюдения может быть изменен [19]. Хотя клиническая дифференциация имеет решающее значение для подходящей лекарственной терапии и мониторинга реакции пациентов на терапию [20], многие современные диагностические критерии учитывают признаки и симптомы, возникающие на более поздних стадиях заболевания [18]. Соответственно для более точной постановки диагноза необходимо подтвердить патологические изменения в тканях головного мозга как можно раньше [21].

Молекулярная визуализация – метод диагностики биологических процессов *in vivo* на молекулярном или клеточном уровне. Неинвазивные методы молекулярной визуализации с использованием радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП), такие как однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), обладают чувствительностью, необходимой для визуализации большинства взаимодействий между физиологическими мишенями и лигандами, такими как нейромедиаторы и рецепторы головного мозга. С помощью методов визуализации с использованием РФЛП возможно определять плотность отдельных рецепторов при концентрации конкретных биомолекул даже в пикомолярном диапазоне [22].

Таким образом, методы ОФЭКТ и ПЭТ позволяют диагностировать болезнь Паркинсона на ранних стадиях (зачастую до клинических проявлений), дифференцировать от других нейродегенеративных заболеваний [23], кроме того, дают возможность оценить прогрессирование заболевания и эффективность лечения [24]

Препараты для молекулярной визуализации структур головного мозга, входящих в дофаминергическую систему, с помощью ПЭТ

В научной литературе опубликована достаточно большая номенклатура РФЛП на основе позитрон-излучающих радионуклидов ^{11}C и ^{18}F, которые используются для функциональной диагностики мозга с помощью ПЭТ: [^{18}F]-DOPA (6-[^{18}F]-L-3,4-дигидроксифенилаланин) [25, 26], являющийся субстратом для декарбоксилазы ароматических аминокислот (AADC) – катализатора синтеза дофамина; [^{11}C](+)-DTBZ (^{11}C-(+)-α-дигидротетрабеназин) [27, 28] и [^{18}F]FP-DTBZ ([^{18}F]-9-фторпропил-(+)-дигидротетрабеназин, [^{18}F]AV-133) [29] для визуализации везикулярного переносчика моноаминов 2 (VMAT2); [^{11}C]-CFT для визуализации транспортера дофамина (DAT) [30]; [^{11}C]-раклоприд [31, 32] – антагонист D_2/D_3-рецепторов дофамина (рисунок 1).

Функциональная диагностика головного мозга с помощью ПЭТ является ценным инструментом для дифференциации болезни Паркинсона в связи с зачастую большей разрешающей способностью, чем ОФЭКТ, и возможностью более точной количественной оценки плотности дофаминергических нейронов [33]. Однако, несмотря на все преимущества, ПЭТ является более сложной и дорогостоящей процедурой по сравнению с ОФЭКТ. Из-за получения позитрон-излучающих радионуклидов, применяемых в диагностике нейродегенеративных заболеваний, только с использованием циклотрона, а также их короткого периода полураспада, в особенности ^{11}C

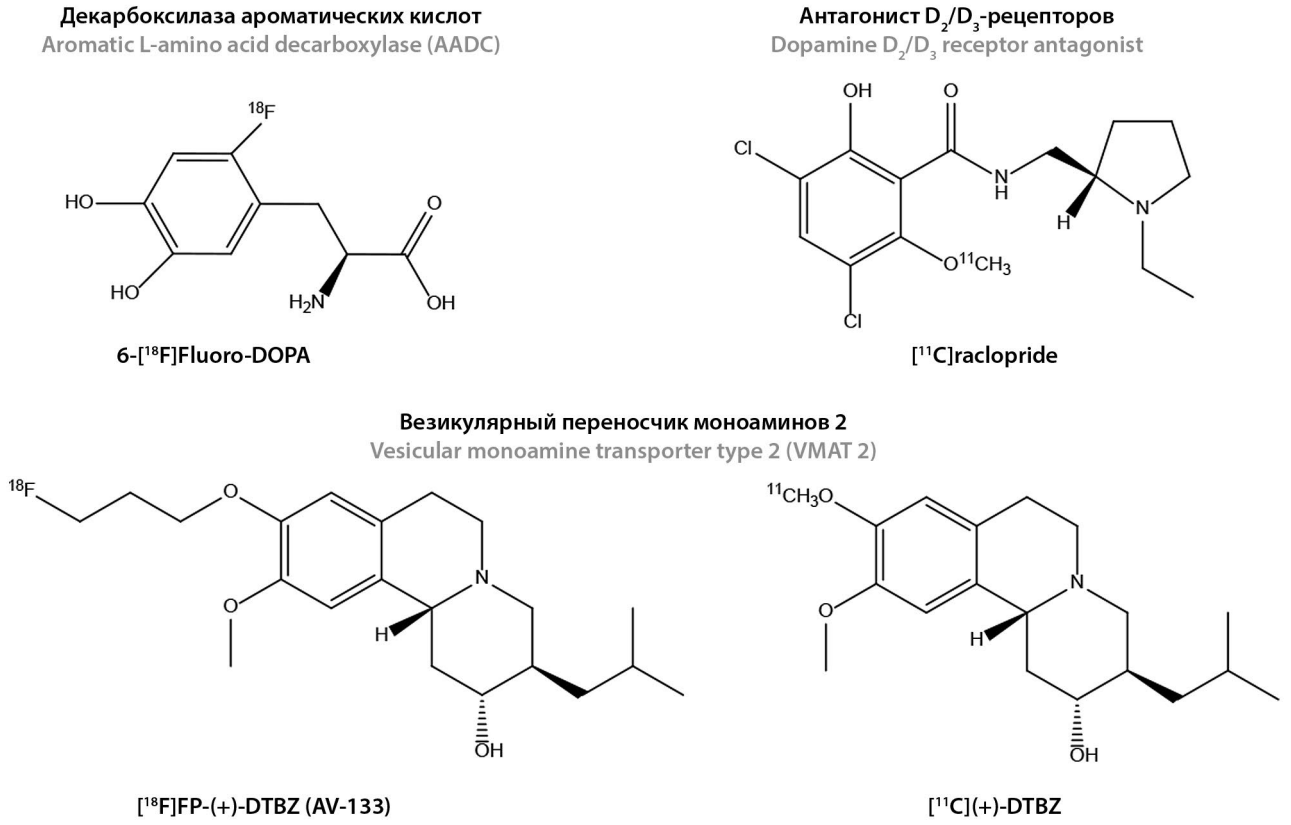


Рисунок 1. Структуры радиофармацевтических препаратов на основе ^{11}C и ^{18}F для диагностики методом ПЭТ

Figure 1. Radiopharmaceuticals with ^{11}C and ^{18}F for PET

(период полураспада 20 мин [34]), появляется необходимость наличия циклотронно-радиохимического комплекса в непосредственной близости к лечебному учреждению, а также наличия квалифицированного персонала, задействованного в синтезе и контроле качества. Таким образом, стоимость производства радионуклидов для ПЭТ и, соответственно, радиофармацевтических препаратов на их основе значительно выше, чем производства радионуклидов для ОФЭКТ [35].

Препараты на основе йода-123 для визуализации транспортеров дофамина с помощью ОФЭКТ

Одним из первых успешных препаратов для визуализации транспортеров дофамина (DAT) методом ОФЭКТ является [^{123}I]-β-CIT ([^{123}I]-2-β-карбометокси-3-β-(4-йодофенил)-тропан) (рисунок 2). [^{123}I]-β-CIT относится к группе производных тропана, которые имеют структуру основной цепи, аналогичную структуре кокаина, и конкурируют за те же сайты связывания транспортеров дофамина [36]. Транспортеры дофамина расположены в пресинаптическом нейроне и необходимы для обратного нейронального захвата дофамина [37]. У пациентов, страдающих болезнью Паркинсона, происходит избирательная потеря дофаминовых нейронов в базальных ганглиях и черной субстанции и соответственно снижение количества транспортеров дофамина, таким образом, наблюдается низкое накопление активности в данных областях головного мозга [38, 39]. Известно, что DAT подавляются у пациентов с болезнью Паркинсона как ранний ответ на снижение концентрации синаптического дофамина [40]. Визуализация транспортеров дофамина может быть более чувствительным индикатором дофаминергической дегенерации, чем визуализация синтеза дофамина с препаратом [^{18}F]-DOPA [41]. На изображениях ОФЭКТ, полученных при использовании [^{123}I]-β-CIT, подтверждается значительное снижение количества транспортеров дофамина в полосатом теле, а также прослеживается корреляция между снижением поглощения β-CIT и тяжестью болезни Паркинсона [42, 43]. Одним из недостатков [^{123}I]-β-CIT является медленное накопление в полосатом теле: максимум достигается через 16 ч после введения препарата с последующим стабильным связыванием через 20 ч [44]. Это стало одним из стимулов разработки препарата [^{123}I]FP-β-CIT (2β-карбометокси-3β-(4-йодофенил)-N-(3-фторпропил)нортропан) с более высокой кинетикой накопления в базальных ганглиях (см. рису-

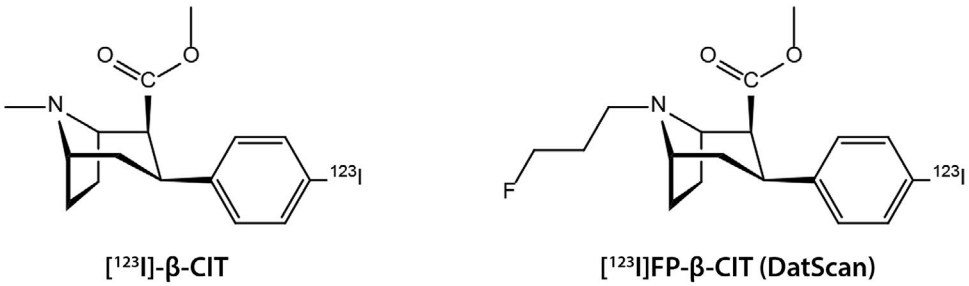


Рисунок 2. РФП на основе ^{123}I для диагностики методом ОФЭКТ

Figure 2. Radiopharmaceuticals with ^{123}I for SPECT

нок 2) [42]. Сканирование пациентов проводится через 3–4 ч после введения [45, 46]. Исследования показали эффективность препарата для визуализации пресинаптических транспортеров дофамина для ранней диагностики болезни Паркинсона [47, 48], а также для дифференциации болезни Паркинсона от других нейродегенеративных заболеваний [49], таких как эссенциальный тремор [50], деменция с тельцами Леви [51], лекарственный паркинсонизм [52]. Препарат [^{123}I]FP-β-CIT (международное непатентованное название Ioflupane, запатентованное название «DatScan») одобрен для клинического применения в Европе с 2000 года[1], в США «DatScan» одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA, Food and Drug Administration) в 2011 году[2]. По состоянию на 2011 год более 300 000 человек в 34 странах были обследованы методом ОФЭКТ с использованием «DatScan»[3]. Однако, так же как и радионуклиды для ПЭТ, ^{123}I производится на специализированных циклотронах [53], что значительно увеличивает стоимость препаратов [^{123}I]-β-CIT и «DatScan» и ограничивает их использование в рутинной клинической практике.

Препараты на основе технеция-99m для визуализации транспортеров дофамина с помощью ОФЭКТ

Более доступными для клинического применения являются препараты на основе ^{99m}Tc благодаря возможности получения ^{99m}Tc из генератора ^{99}Mo/^{99m}Tc непосредственно в медицинском учреждении. При разработке препаратов для визуализации транспортеров дофамина были опробованы различные соединения на основе производных тропана, меченные ^{99m}Tc [54, 55]. Одним из ранее представленных в литературе соединений является технепин ((*RS*)-[*N*-(2-((3′-*N*′-пропил-(1"*R*-3"β-(4-фторфенил)тропан-2"β-карбометокси))(2-меркаптоэтил)амино)-ацетил)-2-аминоэтанэтиолатотехнеция (V) оксид), в котором N_2S_2-лиганд (хелатирующий агент) связан с атомом азота тропанового каркаса (рисунок 3, *1*). Технепин – один из первых успешных комплексов производных тропана с технецием-99m, обладающий достаточной липофильностью для прохождения гематоэнцефалического барьера и способностью накопления в полосатом теле [56]. Для увеличения накопления препарата в целевой области головного мозга была изучена серия производных тропана с N_2S_2-лигандом, связанным со вторым β-атомом углерода и различными заместителями в 3β-положении тропанового каркаса: *napa*-хлор-фенильный радикал, *napa*-фтор-фенильный радикал, *napa*-бром-фенильный радикал (рисунок 3, *2*) [54]. Было показано, что 3β-*napa*-фтор-фенил-производные обладают более низкой липофильностью, чем 3β-*napa*-хлор-фенил-производные, и более низким первичным накоплением в головном мозге. Кроме того, комплекс, содержащий амидную группу в N_2S_2-лиганде (рисунок 3, *4*), несмотря на самую высокую среди представленных соединений липофильность, показал самое низкое накопление в головном мозге. Таким образом, наличие дополнительного атома кислорода в структуре лиганда, как, например, у технепина, может значительно снижать накопление препарата в области интереса. Среди изученных соединений наиболее подходящим для визуализации препаратом оказался [2-[[2-[[[3-(4-хлорфенил)-8-метил-8-азабицикло[3.2.1]окт-2-ил]метил](2-меркапто-этил)амино]этил]-амино]этантиолато-(3-)-*N*2,*N*2′,*S*2,*S*2′]оксо-[1*R*-(экзо-экзо)]-[^{99m}Tc]технеций, или [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 (рисунок 3, *3*), в структуре которого отсутствует амид-

[1] DatSCAN. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/datscan. Accessed: 25.07.2024.

[2] 2022 First Generic Drug Approvals. Available at: https://www.fda.gov/drugs/drug-and-biologic-approval-and-ind-activity-reports/2022-first-generic-drug-approvals. Accessed: 25.07.2024.

[3] DaTSCANTM (Ioflupane I 123 Injection) Now Available to Help Physicians Assess Patients with Suspected Parkinsonian Syndromes. GE HealthCare (United States). Available at: https://www.gehealthcare.com/about/newsroom/press-releases/datscanTM-ioflupane-i-123-injection-now-available-help-physicians-assess-patients. Accessed: 25.07.2024.

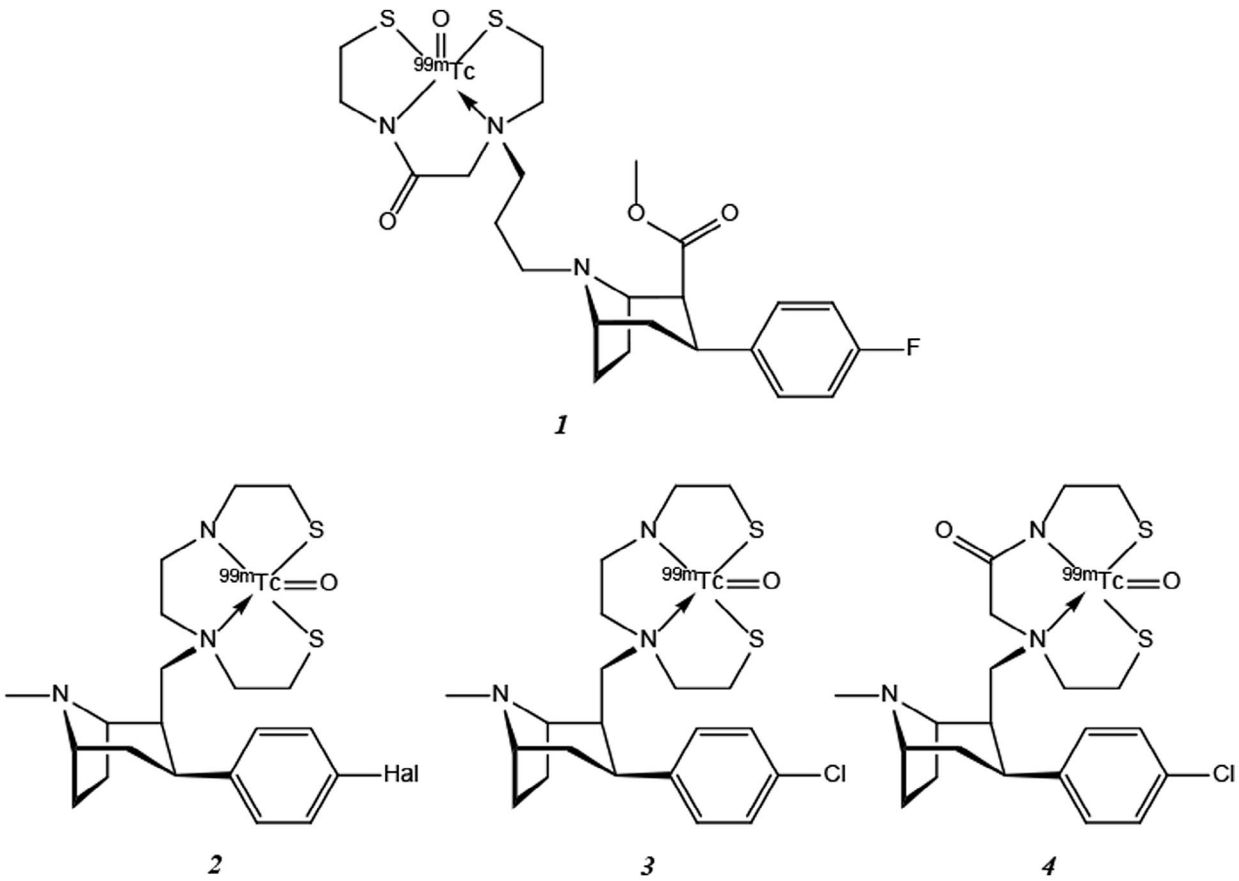


Рисунок 3. РФП на основе ^{99m}Tc для диагностики методом ОФЭКТ:

1 – технепин; 2 – производные [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 (Hal = Cl, Br, F); 3 – [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1; 4 – производное [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1, содержащее амидную группу в структуре лиганда

Figure 3. Radiopharmaceuticals with ^{99m}Tc for SPECT:

1 – technepine; 2 – derivatives of [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 (Hal = Cl, Br, F); 3 – [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1; 4 – derivative of [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 with amide group in the ligand structure

ный кислород, а в 3β-положении тропанового каркаса заместителем является *пара*-хлор-фенильный радикал.

В работе [54] было показано, что [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 лучше других производных накапливается в структурах головного мозга (0,4 % через 2 мин после введения), а коэффициент дифференциального накопления для пары «полосатое тело – мозжечок» (%ID/г в полосатом теле по отношению к %ID/г в мозжечке) спустя час после введения составляет 2,66 и достигает своего максимума 4,07 спустя 4 ч после введения. Доклинические и клинические исследования доказывают эффективность [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 для оценки активности дофаминергической системы [57, 58]. Показана специфичность накопления препарата в полосатом теле с достижением максимальной концентрации в данной области головного мозга спустя 4 ч после введения [59–63]. В присутствии препаратов, применяемых при лечении болезни Паркинсона, в частности L-DOPA, конкурирующих за сайты связывания транспортеров дофамина, связывание TRODAT-1 с DAT снижается на 60 % при введении L-DOPA в дозе 125 мг/кг (633,9 мкмоль/кг) [64]. Однако меньшие дозы L-DOPA – 100 мг/кг (507 мкмоль/кг) – оказывают незначительное влияние: 81 % TRODAT-1 связываются с транспортерами дофамина. Обычно доза препарата L-DOPA не превышает 100 мг/кг, соответственно, отсутствует необходимость прерывания медикаментозной терапии для проведения диагностики методом ОФЭКТ. [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 эффективен для диагностики болезни Паркинсона как на ранних, так и на поздних стадиях заболевания [65], а также дифференциации болезни Паркинсона от других нейродегенеративных заболеваний – эссенциального тремора [66] – и дифференциации болезни Альцгеймера от деменции с тельцами Леви [67]. По результатам второй фазы открытого многоцентрового исследования

[^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 признан безопасным препаратом для клинического применения [68].

Как упоминалось ранее, одним из основных преимуществ [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 перед другими препаратами для диагностики нейродегенеративных заболеваний является возможность получения техеция-99m с помощью элюирования компактных радионуклидных генераторов ^{99}Mo/^{99m}Tc, которые могут быть расположены в отделениях ядерной медицины. Благодаря доступности генератора техеция-99m в медицинском учреждении появляется возможность синтеза препарата непосредственно на месте применения перед введением пациенту. Также на данный момент предложены различные составы готовых наборов реагентов в форме лиофилизатов для приготовления [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 (таблица 1), позволяющие упростить процедуру синтеза препарата. Оба этих факта определяют доступность препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 для рутинного применения в клинической практике. Важным этапом в процессе фармацевтической разработки лиофилизатов для синтеза препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 является оптимизация состава фармацевтической композиции, что позволит обеспечить условия изготовления препарата надлежащего качества.

Оптимизация состава лиофилизатов для приготовления препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1

Восстановители и промежуточные лиганды в составе препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 в форме лиофилизата

Генератор ^{99}Mo/^{99m}Tc элюируют изотоническим раствором хлорида натрия и на выходе получают радионуклид в форме пертехнетата натрия [^{99m}Tc]$NaTcO_4$, в котором технеций-99m находится в своем наиболее стабильном состоянии – Tc(VII) и не способен вступить в реакцию комплексообразования. Для того чтобы встроить ^{99m}Tc в векторную молекулу, необходимо понизить его степень окисления с использованием восстанавливающих агентов. Среди множества соединений наибольшее применение получил хлорид олова (II) ($SnCl_2$) [69], так как он является мягким восстановителем, что позволяет получить высокий выход требуемой формы технеция-99m, пригодной для связывания с бифункциональным хелатирующим агентом в структуре векторной молекулы [70]. Восстановленный ^{99m}Tc(V) обладает высокой реакционной способностью и легко подвергается гидролизу. Для стабилизации восстановленного технеция-99m в реакционную смесь добавляют глюкогептонат натрия, который образует слабый промежуточный комплекс с ^{99m}Tc до его последующего перелигандирования с N_2S_2-содержащим лигандом, подавляя нежелательный гидролиз радионуклида (рисунок 4) [71].

В работе S. R. Choi и M. P. Kung (1999 г.) было показано, что количество $SnCl_2$ и глюкогептоната натрия в реакционной смеси влияет на выход комплекса [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 [72]. Оптимальным количеством $SnCl_2$ для получения препарата в форме лиофилизата с РХЧ более 90 % является 32–64 мкг, а для натрия глюкогептоната – от 5 до 15 мг (10 мкг TRODAT-1, 840 мкг ЭДТА, 740 МБк [^{99m}Tc]пертехнетата, объем препарата 1,5 мл). При этом увеличение количества глюкогептоната натрия до 20 мг приводило к существенному снижению выхода препарата (РХЧ < 45 %). В данной работе также было проведено изучение влияния количества TRODAT-1 на выход реакции комплексообразования. При тех же количествах $SnCl_2$ и глюкогептоната натрия (32 мкг и 10 мг соответственно) стабильный выход более 90 % сохранялся при добавлении от 5 до 200 мкг TRODAT-1. В более ранней работе авторов M. P. Kung и др. (1997 г.) [73], в которой препарат готовили из жидких реагентов, сообщается о получении комплекса [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 с РХЧ, равной 93 %, при использовании намного меньших количеств глюкогептоната натрия – 0,32 мг (200 мкг TRODAT-1, 32 мкг $SnCl_2$, 0,05 мл 0,05 Н ЭДТА, 740–1110 МБк [^{99m}Tc]пертехнетата, объем готового препарата 1,75 мл), тогда как в работе 1999 г. добавление глюкогептоната натрия менее 1 мг приводило к выходу реакции комплексообразования не более 85 %. Данные исследования согласуются с результатами, полученными в работе R. Vatsa и др. [74], где оптимальным соотношением $SnCl_2$ к глюкогептонату натрия было выбрано 1:10 (56 мкг $SnCl_2$, 560 мкг глюкогептоната натрия, 100 мкг TRODAT-1, 259 МБк/мл [^{99m}Tc]пертехнетата) при синтезе препарата из жидких реагентов. Таким образом, на практике оптимальные количества $SnCl_2$ и глюкогептоната натрия при приготовлении препарата из жидких реагентов могут не соответствовать оптимальным количествам данных компонентов для готовых наборов в форме лиофилизата. В результате требуется увеличение количества глюкогептоната натрия в составе лиофилизатов, как было показано в работе A. Shinto и др. [75], где на 32 мкг $SnCl_2$ было добавлено 5 мг глюкогептоната натрия (100 мкг TRODAT-1, 500 мкг ЭДТА, 2220 МБк/мл [^{99m}Tc]пертехнетата). Для проведения клинического исследования A. Korde и др. синтезировали [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 из лиофилизата с РХЧ > 90 %, в составе которого на 100 мкг TRODAT-1 было добавлено 5 мг глюкогептоната натрия и 40 мкг $SnCl_2$ (2220 МБк [^{99m}Tc]пертехнетата, 500 мкг ЭДТА, объем готового препарата 1 мл) [76]. Выход реакции комплексообразования более 90 % сохранялся при использовании TRODAT-1 в количестве не менее 50 мкг. Однако в приведенных работах соотношение $SnCl_2$ и глюкогептоната натрия не соответствует 1:10, и вопрос оптимизации соотношения данных реагентов в составе лиофилизатов остается открытым.

Таблица 1. **Коммерчески доступные наборы лиофилизатов для приготовления [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1**

Table 1. **Commercially available freeze-dried kits for the preparation of the radiopharmaceutical [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1**

Компонент Component	**Вещество** Substance	**Производитель** Manufacturer			
		GMS, Тайвань* [1] GMS, Taiwan* [1]	**RPH Group, Бразилия**** [2] RPH Group, Brasil** [2]	**Pars Isotope, Иран***** [3] Pars Isotope, Iran*** [3]	**Laboratorio TECHI, Уругвай****** [4] Laboratorio TECHI, Uruguay**** [4]
		Количество, мг Quantity, mg			
Действующее вещество (прекурсор) Active ingredient (precursor)	TRODAT-1 · 3 HCl	0,126	0,126	–	–
	TRODAT-1	–	–	0,01	0,06
Восстановитель Reducing agent	$SnCl_2$	0,032	0,032	0,04	0,024
Промежуточный лиганд Coligand	Трицин Tricine	–	–	20	–
	Глюкогептонат натрия Sodium glucoheptonate	0,32	0,32	–	–
	Натрия этилендиамин-тетраацетат безводный (ЭДТА) Disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate	0,93	0,93	–	0,28
Наполнитель Bulking agent	Маннитол Mannitol	20	20	20	6
Буферный агент Buffer agent	Натрия фосфат однозамещенный Sodium phosphate monobasic	0,46	0,46	–	–
	Натрия фосфат двухзамещенный безводный Anhydrous sodium phosphate dibasic	4,1	4,1	–	–
	Фосфатный буфер Phosphate buffer	–	–	20	–

Окончание таблицы 1

Приготовление препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 из набора лиофилизата Preparation of [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 from freeze-dried kit				
Условия изготовления препарата (время инкубирования, температура инкубирования) Conditions for radiopharmaceutical preparation (incubation time, incubation temperature)	30 мин 121 °C 30 min 121 °C	30 мин 121/100 °C 30 min 121/100 °C	30 мин 95 °C 30 min 95 °C	30 мин 100 °C 30 min 100 °C
Объемная активность Activity concentration	222–296 МБк/мл 222–296 MBq/ml	814–1036 МБк/мл 814–1036 MBq/ml	814–1036 МБк/мл 814–1036 MBq/ml	740–925 МБк/мл 740–925 MBq/ml
РХЧ (по спецификации) RCP (according to specification)	>90 %	>90 %	>90 %	>90 %
Срок годности готового препарата Stability of the labeled kit	4 ч (при комнатной температуре) 4 h (with the room temperature)	4 ч (при температуре 15–30 °C) 4 h (with the temperature 15–30 °C)	6 ч (при температуре 15–25 °C) 6 h (with the temperature 15–25 °C)	2 ч (при температуре 10–30 °C) 2 h (with the temperature 10–30 °C)

Примечание. * Технеций Tc-99m TRODAT-1 для внутривенного введения.
** TRODAT-1 (0,126 мг TRODAT-1.3HCl, нерадиоактивный компонент для синтеза ^{99m}Tc-TRODAT-1 для внутривенного введения.
*** TRODAT Pars-YCK-2800 (лиофилизат для синтеза ^{99m}Tc-TRODAT-1для внутривенного введения).
**** TRODAT Techi (набор реагентов для синтеза 99m-Технеция-TRODAT для диагностики).
[1] Trodat-1. Global Medical Solutions. Nuclear Supplies. Available at: https://nuclearsupplies.co.nz/products/trodat-1?_pos=1&_sid=9152bf675&_ss=r. Accessed: 05.06.2024.
[2] TRODAT-1. Grupo RPH. Available at: https://www.gruporph.com.br/en/trodat-1-en/ Accessed: 05.06.2024.
[3] PARS-TRODAT. Kit for the preparation of ^{99m}Tc-TRODAT-1 injection. Available at: https://parsisotope.com/trodat-radiopharmaceutical-kits/ Accessed: 05.06.2024.
[4] Trodat. Laboratorio TECHI. Available at: https://www.labtechi.com/en/trodat-2/ Accessed: 05.06.2024.

Note. * Technetium Tc-99m TRODAT-1 for Injection.
** TRODAT-1 (0.126 mg of TRODAT-1.3HCl non-radioactive component for preparation of injectable ^{99m}Tc-TRODAT-1).
*** TRODAT Pars-YCK-2800 (Kit for the preparation of ^{99m}Tc-TRODAT-1 for injection).
**** TRODAT Techi (Reagent set to prepare 99m-Technetium-TRODAT for diagnostic use).
[1] Trodat-1. Global Medical Solutions. Nuclear Supplies. Available at: https://nuclearsupplies.co.nz/products/trodat-1?_pos=1&_sid=9152bf675&_ss=r. Accessed: 05.06.2024.
[2] TRODAT-1. Grupo RPH. Available at: https://www.gruporph.com.br/en/trodat-1-en/ Accessed: 05.06.2024.
[3] PARS-TRODAT. Kit for the preparation of ^{99m}Tc-TRODAT-1 injection. Available at: https://parsisotope.com/trodat-radiopharmaceutical-kits/ Accessed: 05.06.2024.
[4] Trodat. Laboratorio TECHI. Available at: https://www.labtechi.com/en/trodat-2/ Accessed: 05.06.2024.

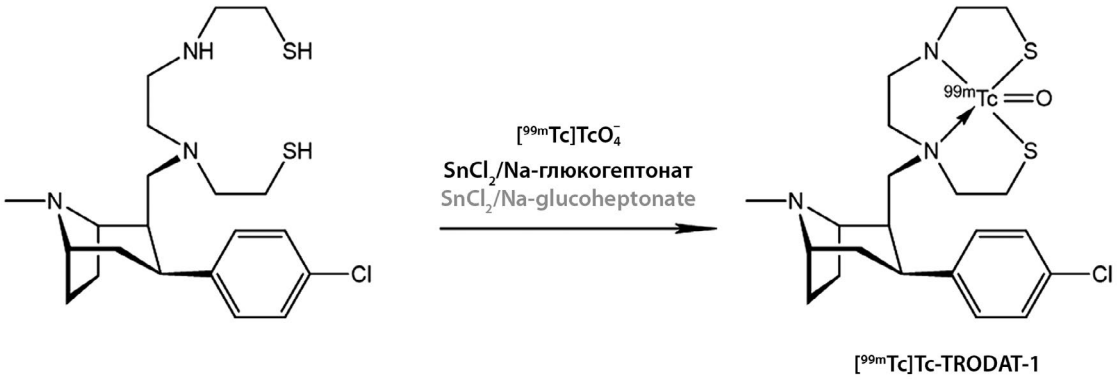


Рисунок 4. **Схема синтеза [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1**

Figure 4. **Synthesis scheme of [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1**

В некоторых композициях как альтернативу глюкогептонату натрия в качестве промежуточного (дополнительного) лиганда для стабилизации технеция-99m в восстановленном состоянии используют трицин [77]. В работе M. Erfani [78] исследовано влияние количества трицина в составе препарата на выход реакции комплексообразования. Показано, что для получения препарата с РХЧ > 95 % содержание трицина в реакционной смеси должно быть от 10 до 30 мг на 10 мкг TRODAT-1. Синтез препарата с РХЧ 98 % возможен при оптимальном количестве трицина 20 мг, при этом увеличение количества трицина до значений, превышающих 30 мг, приводило к снижению выхода целевого комплекса. Необходимое количество $SnCl_2$ для получения препарата с РХЧ более 90 % находится в интервале от 20 до 60 мкг, оптимальным количеством $SnCl_2$ было выбрано 40 мкг (РХЧ > 95 %). Авторы также указывают, что максимальная активность для выбранного состава лиофилизата: 10 мкг TRODAT-1, 20 мг трицина, 40 мкг $SnCl_2$ и 20 мг маннитола, при котором комплексообразование протекает с выходом более 95 %, составляет 1480 МБк/мл (эффективная молярная активность 64,4 МБк/нмоль).

В большинстве предложенных составов лиофилизатов, содержащих глюкогептонат натрия, в качестве дополнительного лиганда используют и ЭДТА, которая также стабилизирует промежуточную форму технеция-99m. Таким образом, в процессе синтеза в реакционной смеси присутствуют формы ^{99m}Tc(V)-глюкогептонат и ^{99m}Tc(V)-ЭДТА, которые затем подвергаются перелигандированию с образованием целевого соединения [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1. В работе M. P. Kung и др. на 10 мг глюкогептоната натрия было добавлено 840 мкг ЭДТА [72], в работе A. Shinto и др. [75] на 5 мг глюкогептоната натрия приходится 500 мкг ЭДТА. В коммерчески доступных лиофилизатах, выпускаемых в Тайване (GMS) и Бразилии (RPH Group) (см. таблицу 1), присутствуют 0,32 мг глюкогептоната натрия и 0,93 мг ЭДТА (таблица 1). В то время как в работе M. Erfani [78] трицин является единственным промежуточным лигандом в составе препарата. В коммерчески выпускаемом в Иране лиофилизате (Pars Isotope) (см. таблица 1), содержащем трицин, ЭДТА отсутствует. Однако в лиофилизате производства Laboratorio TECHI, Уругвай, только ЭДТА выполняет функцию промежуточного лиганда (см. таблицу 1).

Наполнители в составе препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 в форме лиофилизата

В качестве наполнителя для формирования остатка во флаконе после лиофилизации в форме однородной массы (таблетки) в составе препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 присутствует маннитол. Количество глюкогептоната натрия и трицина в фармацевтических композициях может зависеть от количества добавленного маннитола. Так, например, в работе S. R. Choi и M. P. Kung (1999 г.) [72] в состав лиофилизата не был добавлен маннитол, а масса глюкогептоната натрия составляла 10 мг. Это дает возможность предположить, что остаток во флаконе после лиофилизации формируется именно за счет глюкогептоната натрия, тогда как в составе коммерчески доступного лиофилизата, выпускаемого в Тайване (GMS), присутствует 0,32 мг глюкогептоната натрия и 20 мг маннитола, и в данном случае именно маннитол формирует остаток во флаконе после лиофилизации в форме таблетки (см. таблицу 1). В состав лиофилизата, выпускаемого в Иране (Pars Isotope Co) и содержащего трицин, было добавлено 20 мг маннитола на то же количество трицина [77] (см. таблицу 1). Таким образом, при фармацевтической разработке наборов лиофилизатов необходимо подбирать их состав не только для обеспечения условий проведения реакции комплексообразования с высоким выходом, но и учитывать необходимость получения остатка во флаконе после лиофилизации в виде качественной аморфной хорошо сформированной таблетки. Глюкогептонат натрия или трицин могут выступать как в качестве промежуточного лиганда, так и в качестве наполнителя. При этом, как уже было отме-

чено ранее, существует предел по содержанию глюкогептоната натрия и трицина, при превышении которого снижается выход реакции комплексообразования [72, 78]. В этом случае маннитол представляется более удачным наполнителем для создания необходимой массы лиофилизата в форме таблетки, если количества глюкогептоната натрия или трицина для этих целей недостаточно.

Оптимизация диапазона pH при разработке препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 в форме лиофилизата

Важным этапом в разработке препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 является оптимизация диапазона pH, необходимого для комплексообразования ^{99m}Tc с лигандом. Первым этапом синтеза препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 является растворение навески прекурсора в этаноле с добавлением соляной кислоты для перевода свободного основания тропантиола в растворимую форму тригидрохлорида. Для приготовления препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 из жидких реагентов 200 мкг прекурсора растворяли в 100 мкл раствора соляной кислоты в этаноле (100 мкл 2 Н HCl в 2 мл этанола, 200 мкл 2 Н HCl, 50 мкл 0,05 М ЭДТА, 800 мкл $SnCl_2$ / глюкогептонат натрия, 100–200 мкл раствора [^{99m}Tc]пертехнетата, 1500 мкл воды). В готовый раствор препарата требовалось добавление 0,5 мл фосфатного буфера до pH 5,0–6,0, допустимого для внутривенного введения, так как pH препарата после синтеза составил 2,0 [72]. В случае приготовления фармацевтической композиции для последующей лиофилизации 10 мкг TRODAT-1 растворяли в 100 мкл смеси этанола и 0,05 Н HCl (32 мкг $SnCl_2$, 10 мг натрия глюкогептоната). В процессе лиофилизации избыток непрореагировавшей кислоты испаряется и не оказывает влияния на pH получаемого реакционного раствора; конечное значение pH препарата после синтеза составило 4,5–5,0. Авторами было показано, что оптимальное значение pH для получения комплекса [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 с РХЧ более 90 % находится в диапазоне от 4,6 до 4,8 и дополнительного введения кислот в реакционную смесь не требуется. Проведение реакции комплексообразования при более низком значении pH (1,14) РХЧ препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 составила 70 %, при pH реакционной смеси выше 5,9 выход также оказывается ниже 90 % [72]. Отсутствие необходимости добавления кислоты в реакционную смесь имеет дополнительное преимущество: не требуется нейтрализация раствора препарата после синтеза. Интересно отметить, что в работе M. Erfani и др., где в качестве промежуточного лиганда вместо глюкогептоната натрия был использован трицин (10 мкг TRODAT-1, 20 мг трицина, 20 мг маннитола, 40 мкг $SnCl_2$, 1 мл фосфатного буфера для поддержания необходимого значения pH), образование комплекса [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 с наибольшим выходом наблюдается при pH от 6 до 7, при этом РХЧ препарата более 90 % может быть достигнута в диапазоне pH от 4,5 до 7,5 [78]. Таким образом, использование в составе трицина позволяет проводить реакцию комплексообразования в более широком диапазоне pH. Кроме того, в предыдущих работах авторов, где трицин использовался вместе с ЭДТА в качестве дополнительного лиганда, наибольший выход реакции комплексообразования также был получен при нейтральном значении pH [79–81].

Условия синтеза препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 в форме лиофилизата

Еще одним важным аспектом, влияющим на выбор состава лиофилизата, в частности использование трицина или глюкогептоната натрия в качестве промежуточного лиганда, являются условия синтеза [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1, а именно проведение реакции при нагревании или комнатной температуре. Из некоторых опубликованных данных следует, что для получения комплекса ^{99m}Tc с TRODAT-1, когда в качестве промежуточного лиганда используется глюкогептонат натрия, необходимо длительное нагревание при высоких температурах. Для приготовления препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 из лиофилизированного набора реагентов, содержащего 100 мкг TRODAT-1, 5 мг глюкогептоната натрия, 500 мкг Na_2ЭДТА, 40 мкг $SnCl_2$, во флакон был добавлен 1 мл стерильного раствора пертехнетата натрия с объемной активностью 2220 МБк/мл [76]. Было показано, что нагревание препарата на кипящей водяной бане в течение 40 мин необходимо для успешного перелигандирования ^{99m}Tc из комплексов ^{99m}Tc(V)-глюкогептонат или ^{99m}Tc(V)-ЭДТА в комплекс с TRODAT-1 с высоким выходом. Радиохимическая чистота более 90 % достигается при таких условиях синтеза при использовании пертехнетата натрия с объемной активностью 2220–2960 МБк/мл. В работах M. P. Kung и др. [72, 73] сообщается о необходимости автоклавирования реакционной смеси (10 мкг TRODAT-1, 32 мкг $SnCl_2$, 10 мг глюкогептоната натрия, 840 мкг ЭДТА, 1110 МБк, объем реакционной смеси 1,5 мл) при температуре 121 °C в течение 30 мин для достижения выхода комплекса [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 более 90 %. В работе R. Vatsa и др. [74] также было исследовано влияние времени синтеза препарата на выход реакции комплексообразования. Реакционную смесь объемом 1 мл, приготовленную добавлением [^{99m}Tc]пертехнетата с объемной активностью 2590 МБк/мл к лиофилизированному набору реагентов (560 мкг натрия глюкогептоната, 56 мкг $SnCl_2$, 100 мкг TRODAT-1), нагревали на водяной бане при температуре 95 °C в течение 15, 30, 45 и 60 мин. Выход реакции 95 % был достигнут уже за 15 мин синтеза препарата, при этом препарат с максимальной РХЧ 100 % был получен через 60 мин нагревания препарата. В работе M. Erfani [78], где в состав препарата в качестве промежуточного лиганда был добавлен трицин (10 мкг TRODAT-1, 20 мкг трицина, 40 мкг $SnCl_2$, 20 мг маннитола, 1480 МБк/мл), для получения препарата с РХЧ более 95 % было до-

статочно 15 мин инкубирования реакционной смеси на водяной бане при 95 °С. Авторы отмечают, что трицин показал себя более эффективным промежуточным лигандом, чем глюкогептонат натрия, позволяющим сократить время и снизить температуру, необходимые для успешного синтеза препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди радиофармацевтических препаратов для визуализации нейродегенеративных заболеваний, рассмотренных в обзоре, наибольшими преимуществами обладает [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1. Многочисленные исследования доказывают эффективность и пригодность [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 для оценки активности дофаминергической системы [57, 58, 68]. Возможность получения техенция-99m с помощью элюирования мобильных генераторных систем ^{99}Mo/^{99m}Tc и наличие готовых наборов реагентов для синтеза [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 в форме лиофилизатов делает [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 препаратом выбора для применения в рутинной клинической практике за счет снижения затрат на его производство (по сравнению с препаратами для ПЭТ) и упрощения процедуры синтеза.

Многочисленные научные исследования продемонстрировали различные подходы к разработке и оптимизации состава лиофилизатов для синтеза [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1, включая выбор вспомогательных веществ, их количества и соотношения, а также условия синтеза, такие как температурный режим и pH реакционной смеси. В свете представленных данных встает вопрос выбора между глюкогептонатом натрия, трицином и ЭДТА в качестве промежуточного лиганда. Так, например, добавление в состав лиофилизата трицина позволяет проводить синтез препарата в более широком диапазоне pH, а также сокращает время синтеза препарата до 15 мин при более низкой температуре – 95 °С (по сравнению с препаратом, в составе которого присутствует глюкогептонат натрия, – автоклавирование при температуре 121 °С в течение 30 мин) [78]. Здесь важно отметить, что в некоторых случаях трицин присутствует в составе лиофилизата и как единственный промежуточный лиганд, и совместно с ЭДТА, которая, в свою очередь, также может выступать в качестве независимого промежуточного лиганда.

Немаловажным является определение необходимого количества промежуточного лиганда в составе лиофилизата, которое зависит от количеств прекурсора TRODAT-1 и восстановителя $SnCl_2$. При этом на практике оптимальные соотношения данных вспомогательных веществ для лиофилизатов отличаются от соотношения, полученного для препарата, приготовленного из жидких реагентов. Кроме того, в случае каждого промежуточного лиганда существует предел по его содержанию, при превышении которого снижется выход целевого комплекса [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1. Количества добавляемого глюкогептоната натрия и трицина могут также зависеть от количества добавляемого в качестве наполнителя маннитола для формирования необходимой массы лиофилизата в форме таблетки, так как глюкогептонат и трицин сами могут выступать в качестве наполнителя. Соотношение количества прекурсора, промежуточного лиганда и восстановителя варьируется в представленных работах, и вопрос оптимизации соотношения вспомогательных веществ остается открытым.

Следует отметить, что указанные в таблице 1 наборы лиофилизатов для приготовления препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 не доступны на территории Российской Федерации. Также существует ряд сложностей с синтезом самого TRODAT-1 ввиду специфики необходимых прекурсоров в аспекте законодательного регулирования при их обращении. Однако ввиду высокой клинической эффективности [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 разработка и оптимизация состава готовых наборов лиофилизатов для синтеза [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 все еще является актуальной задачей и преследует цель создания в Российской Федерации коммерчески доступного препарата [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 для диагностики болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний методом ОФЭКТ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Armstrong M. J., Okun M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. *JAMA*. 2020;323(6):548–560. DOI: 10.1001/jama.2019.22360.
2. Braak H., Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's Disease. *Journal of Neurology*. 2000;247:II3–II10. DOI: 10.1007/PL00007758.
3. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R. A. I., Jansen Steur E. N. H., Braak E. Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease. *Neurobiology of Aging*. 2003;24(2):197–211. DOI: 10.1016/S0197-4580(02)00065-9.
4. Goetz C. G., Lutge W., Tanner C. M. Autonomic Dysfunction in Parkinson's Disease. *Neurology*. 1986;36(1):73–75. DOI: 10.1212/wnl.36.1.73.
5. Doty R. L. Olfactory Dysfunction in Parkinson Disease. *Nature Reviews Neurology*. 2012;8:329–339. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.80.
6. Pavese N., Metta V., Bose S. K., Chaudhuri K. R., Brooks D. J. Fatigue in Parkinson's Disease Is Linked to Striatal and Limbic Serotonergic Dysfunction. *Brain*. 2010;133(11):3434–3443. DOI: 10.1093/brain/awq268.
7. Miller K. M., Okun M. S., Fernandez H. F., Jacobson C. E., Rodriguez R. L., Bowers D. Depression Symptoms in Movement Disorders: Comparing Parkinson's Disease, Dystonia, and Essential Tremor. *Movement Disorders*. 2007;22:666–672. DOI: 10.1002/mds.21376.
8. O'Sullivan S. S., Wu K., Politis M., Lawrence A. D., Evans A. H., Bose S. K., Djamshidian A., Lees A. J., Piccini P. Cue-Induced Striatal Dopamine Release in Parkinson's Disease-Associated Impulsive-Compulsive Behaviours. *Brain*. 2011;134(4):969–978. DOI: 10.1093/brain/awr003.
9. Nagano-Saito A., Washimi Y., Arahata Y., Iwai K., Kawatsu S., Ito K., Nakamura A., Abe Y., Yamada T., Kato T., Kachi T. Visual Hallucination in Parkinson's Disease with FDG PET. *Movement Disorders*. 2004;19:801–806. DOI: 10.1002/mds.20129.

10. Verbaan D., Marinus J., Visser M., van Rooden S. M., Stiggelbout A. M., Middelkoop H. A. M., van Hilten J. J. Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2007;78(11)1182–1187. DOI: 10.1136/jnnp.2006.112367.
11. Marsili L., Rizzo G., Colosimo C. Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease: From James Parkinson to the Concept of Prodromal Disease. *Frontiers in Neurology*. 2018;9:156. DOI: 10.3389/fneur.2018.00156.
12. Gelb D. J., Oliver E., Gilman S. Diagnostic Criteria for Parkinson Disease. *Archives of Neurology*. 1999;56(1):33–39. DOI: 10.1001/archneur.56.1.33.
13. Lippa C. F., Duda J. E., Grossman M., Hurtig H. I., Aarsland D., Boeve B. F., Brooks D. J., Dickson D. W., Dubois B., Emre M., Fahn S., Farmer J. M., Galasko D., Galvin J. E., Goetz C. G., Growdon J. H., Gwinn-Hardy K. A., Hardy J., Heutink P., Iwatsubo T., Kosaka K., Lee V. M.-Y., Leverenz J. B., Masliah E., McKeith I. G., Nussbaum R. L., Olanow C. W., Ravina B. M., Singleton A. B., Tanner C. M., Trojanowski J. Q., Wszolek Z. K. DLB and PDD Boundary Issues: Diagnosis, Treatment, Molecular Pathology, and Biomarkers. *Neurology*. 2007;68(11):812–819. DOI: 10.1212/01.wnl.0000256715.13907.d3.
14. McKeith I. G., Boeve B. F., Dickson D. W., Halliday G., Taylor J.-P., Weintraub D., Aarsland D., Galvin J., Attems J., Ballard C. G., Bayston A., Beach T. G., Blanc F., Bohnen N., Bonanni L., Bras J., Brundin P., Burn D., Chen-Plotkin A., Duda J. E., El-Agnaf O., Feldman H., Ferman T. J., Ffytche D., Fujishiro H., Galasko D., Goldman J. G., Gomperts S. N., Graff-Radford N. R., Honig L. S., Iranzo A., Kantarci K., Kaufer D., Kukull W., Lee V. M. Y., Leverenz J. B., Lewis S., Lippa C., Lunde A., Masellis M., Masliah E., McLean P., Mollenhauer B., Montine T. J., Moreno E., Mori E., Murray M., O'Brien J. T., Orimo S., Postuma R. B., Ramaswamy S., Ross O. A., Salmon D. P., Singleton A., Taylor A., Thomas A., Tiraboschi P., Toledo J. B., Trojanowski J. Q., Tsuang D., Walker Z., Yamada M., Kosaka K. Diagnosis and Management of Dementia with Lewy Bodies. *Neurology*. 2017;89(1):88–100. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004058.
15. Berg D., Lang A. E., Postuma R. B., Maetzler W., Deuschl G., Gasser T., Siderowf A., Schapira A. H., Oertel W., Obeso J. A., Olanow C. W., Poewe W., Stern M. Changing the Research Criteria for the Diagnosis of Parkinson's Disease: Obstacles and Opportunities. *The Lancet Neurology*. 2013;12(5):514–524. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70047-4.
16. Yao N.-T., Zheng Q., Xu Z.-Q., Yin J.-H., Lu L.-G., Zuo Q., Yang S., Zhang C.-L., Jiao L. Positron Emission Computed Tomography/Single Photon Emission Computed Tomography in Parkinson Disease. *Chinese Medical Journal*. 2020; 133(12):1448–1455. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000836.
17. Jellinger K. A., Attems J. Challenges of Multimorbidity of the Aging Brain: A Critical Update. *Journal of Neural Transmission*. 2015;122:505–521. DOI: 10.1007/s00702-014-1288-x.
18. Rizzo G., Copetti M., Arcuti S., Martino D., Fontana A., Logroscino G. Accuracy of Clinical Diagnosis of Parkinson Disease. *Neurology*. 2016;86(6):566–576. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002350.
19. Caslake R., Moore J. N., Gordon J. C., Harris C. E., Counsell C. Changes in Diagnosis with Follow-up in an Incident Cohort of Patients with Parkinsonism. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2008;79(11):1202–1207. DOI: 10.1136/jnnp.2008.144501.
20. Nodel M. R. Diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Russian Journal of Geriatric Medicine*. 2021;(1):92-96. (In Russ.). DOI: 10.37586/2686-8636-1-2021-92-96.
21. Dickson D. W., Braak H., Duda J. E., Duyckaerts C., Gasser T., Halliday G. M., Hardy J., Leverenz J. B., Del Tredici K., Wszolek Z. K., Litvan I. Neuropathological Assessment of Parkinson's Disease: Refining the Diagnostic Criteria. *The Lancet Neurology*. 2009;8(12):1150–1157. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70238-8.
22. Ametamey S. M., Honer M., Schubiger P. A. Molecular Imaging with PET. *Chemical Reviews*. 2008;108(5):1501–1516. DOI: 10.1021/cr0782426.
23. Saeed U., Lang A. E., Masellis M. Neuroimaging Advances in Parkinson's Disease and Atypical Parkinsonian Syndromes. *Frontiers in Neurology*. 2020;11:572976. DOI: 10.3389/fneur.2020.572976.
24. Bidesi N. S. R., Vang Andersen I., Windhorst A. D., Shalgunov V., Herth M. M. The Role of Neuroimaging in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*. 2021;159:660–689. DOI: 10.1111/jnc.15516.
25. Morrish P. K., Sawle G. V., Brooks D. J. An [^{18}F]dopa–PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain*. 1996;119(2):585–591. DOI: 10.1093/brain/119.2.585.
26. Morrish P. K., Sawle G. V, Brooks D. J. Clinical and [18F] dopa PET findings in early Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1995;59(6):597–600. DOI: 10.1136/jnnp.59.6.597.
27. Martin W. R. W., Wieler M., Stoessl A. J., Schulzer M. Dihydrotetrabenazine Positron Emission Tomography Imaging in Early, Untreated Parkinson's Disease. *Annals of Neurology*. 2008;63:388–394. DOI: 10.1002/ana.21320.
28. Collantes M., Peñuelas I., Álvarez-Erviti L., Blesa J., Martí-Climent J. M., Quincoces G., Delgado M., Ecay M., Martínez A., Arbizu J., Rodríguez-Oroz M. C., Obeso J., Richter J. Á. Use of 11C-(+)-α-Dihydrotetrabenazine for the Assessment of Dopaminergic Innervation in Animal Models of Parkinson's Disease. *Revista Española de Medicina Nuclear (English Edition)*. 2008;27(2):103–111. DOI: 10.1016/S1578-200X(08)70033-0.
29. Hsiao I.-T., Weng Y.-H., Hsieh C.-J., Lin W.-Y., Wey S.-P., Kung M.-P., Yen T.-C., Lu C.-S., Lin K.-J. Correlation of Parkinson Disease Severity and ^{18}F-DTBZ Positron Emission Tomography. *JAMA Neurology*. 2014;71(6):758–766. DOI: 10.1001/jamaneurol.2014.290.
30. Hantraye P., Brownell A.-L., Elmaleh D., Spealman R. D., Wüllner U., Brownell G. L., Madras B. K., Isacson O. Dopamine Fiber Detection by [11C]-CFT and PET in a Primate Model of Parkinsonism. *NeuroReport*. 1992;3(3):265–268. DOI: 10.1097/00001756-199203000-00013.
31. Antonini A., Schwarz J., Oertel W. H., Beer H. F., Madeja U. D., Leenders K. L. [^{11}C]raclopride and positron emission tomography in previously untreated patients with Parkinson's disease. *Neurology*. 1994;44(7):1325. DOI: 10.1212/WNL.44.7.1325.
32. Farde L., Hall H., Ehrin E., Sedvall G. Quantitative Analysis of D2 Dopamine Receptor Binding in the Living Human Brain by PET. *Science*. 1986;231:258–261. DOI: 10.1126/science.2867601.

33. Rahmim A., Zaidi H. PET versus SPECT: Strengths, Limitations and Challenges. *Nuclear Medicine Communications*. 2008;29(3):193–207. DOI: 10.1097/MNM.0b013e3282f3a515.
34. Abbasi Gharibkandi N., Hosseinimehr S. J. Radiotracers for Imaging of Parkinson's Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;166:75–89. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.029.
35. Cerqueira M. D. Cardiac SPECT or PET?: Is There Still a Debate? *Journal of Nuclear Cardiology*. 2022;29(3):901–903. DOI: 10.1007/s12350-022-02982-x.
36. Innis R. B., Seibyl J. P., Scanley B. E., Laruelle M., Abi-Dargham A., Wallace E., Baldwin R. M., Zea-Ponce Y., Zoghbi S., Wang S. Single Photon Emission Computed Tomographic Imaging Demonstrates Loss of Striatal Dopamine Transporters in Parkinson Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(24):11965–11969. DOI: 10.1073/pnas.90.24.11965.
37. Piccini P. P. Dopamine Transporter: Basic Aspects and Neuroimaging. *Movement Disorders*. 2003;18:S3–S8. DOI: 10.1002/mds.10571.
38. Pimoule C., Schoemaker H., Javoy-Agid F., Scatton B., Agid Y., Langer S. Z. Decrease in [^{3}H]cocaine binding to the dopamine transporter in Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology*. 1983;95(1–2):145–146. DOI: 10.1016/0014-2999(83)90281-9.
39. Janowsky A., Vocci F., Berger P., Angel I., Zelnik N., Kleinman J. E., Skolnick P., Paul S. M. [^{3}H]GBR-12935 Binding to the Dopamine Transporter Is Decreased in the Caudate Nucleus in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*. 1987;49:617–621. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1987.tb02908.x.
40. Djang D. S. W., Janssen M. J. R., Bohnen N., Booij J., Henderson T. A., Herholz K., Minoshima S., Rowe C. C., Sabri O., Seibyl J., Van Berckel B. N. M., Wanner M. SNM Practice Guideline for Dopamine Transporter Imaging with ^{123}I-Ioflupane SPECT 1.0. *Journal of Nuclear Medicine*. 2012;53(1):154–163. DOI: 10.2967/jnumed.111.100784.
41. Eshuis S. A., Jager P. L., Maguire R. P., Jonkman S., Dierckx R. A., Leenders K. L. Direct Comparison of FP-CIT SPECT and F-DOPA PET in Patients with Parkinson's Disease and Healthy Controls. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2009;36:454–462. DOI: 10.1007/s00259-008-0989-5.
42. Laruelle M., Wallace E., Seibyl J. P., Baldwin R. M., Zea-Ponce Y., Zoghbi S. S., Neumeyer J. L., Charney D. S., Hoffer P. B., Innis R. B. Graphical, Kinetic, and Equilibrium Analyses of in Vivo [^{123}I]β-CIT Binding to Dopamine Transporters in Healthy Human Subjects. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1994;14:982–994. DOI: 10.1038/jcbfm.1994.131.
43. Asenbaum S., Brücke T., Pirker W., Podreka I., Angelberger P., Wenger S., Wöber C., Müller C., Deecke L. Imaging of Dopamine Transporters with Iodine-123-β-CIT and SPECT in Parkinson's Disease. *Journal of Nuclear Medicine*. 1997;38(1):1–6.
44. Brucke T., Kornhuber J., Angelberger P., Asenbaum S., Frassine H., Podreka I. SPECT Imaging of Dopamine and Serotonin Transporters with [^{123}I]β-CIT. Binding Kinetics in the Human Brain. *Journal of Neural Transmission*. 1993;94:137–146. DOI: 10.1007/BF01245007.
45. Kuikka J. T., Bergström K. A., Ahonen A., Hiltunen J., Haukka J., Länsimiese E., Wang S., Neumeyer J. L. Comparison of iodine-123 labelled 2β-carbomethoxy-3β-(4-iodophenyl)tropane and 2β-carbomethoxy-3β-(4-iodophenyl)-*N*-(3-fluoropropyl)nortropane for imaging of the dopamine transporter in the living human brain. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1995;22:356–360. DOI: 10.1007/BF00941854.
46. Booij J., Tissingh G., Boer G. J., Speelman J. D., Stoof J. C., Janssen A. G., Wolters E. C., van Royen E. A. [^{123}I]FP-CIT SPECT Shows a Pronounced Decline of Striatal Dopamine Transporter Labelling in Early and Advanced Parkinson's Disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1997;62(2):133–140. DOI: 10.1136/jnnp.62.2.133.
47. Jennings D. L., Seibyl J. P., Oakes D., Eberly S., Murphy J., Marek K. (123I) β-CIT and Single-Photon Emission Computed Tomographic Imaging vs Clinical Evaluation in Parkinsonian Syndrome. *Archives of Neurology*. 2004;61(8):1224–1229. DOI: 10.1001/archneur.61.8.1224.
48. Hauser R. A., Grosset D. G. [^{123}I]FP-CIT (DaTscan) SPECT Brain Imaging in Patients with Suspected Parkinsonian Syndromes. *Journal of Neuroimaging*. 2012;22:225–230. DOI: 10.1111/j.1552-6569.2011.00583.x.
49. Gayed I., Joseph U., Fanous M., Wan D., Schiess M., Ondo W., Won K.-S. The Impact of DaTscan in the Diagnosis of Parkinson Disease. *Clinical Nuclear Medicine*. 2015;40(5):390–393. DOI: 10.1097/RLU.0000000000000766.
50. Benamer H. T. S., Patterson J., Grosset D. G., Booij J., de Bruin K., van Royen E., Speelman J. D., Horstink M. H. I. M., Sips H. J. W. A., Dierckx R. A., Versijpt J., Decoo D., Van Der Linden C., Hadley D. M., Doder M., Lees A. J., Costa D. C., Gacinovic S., Oertel W. H., Pogarell O., Hoeffken H., Joseph K., Tatsch K., Schwarz J., Ries V. Accurate Differentiation of Parkinsonism and Essential Tremor Using Visual Assessment of [^{123}I]-FP-CIT SPECT Imaging: The [^{123}I]-FP-CIT Study Group. *Movement Disorders*. 2000;15(3):503–510. DOI: 10.1002/1531-8257(200005)15:3<503::AID-MDS1013>3.0.CO;2-V.
51. Brigo F., Turri G., Tinazzi M. 123I-FP-CIT SPECT in the Differential Diagnosis between Dementia with Lewy Bodies and Other Dementias. *Journal of the Neurological Sciences*. 2015;359(1):161–171. DOI: 10.1016/j.jns.2015.11.004.
52. Diaz-Corrales F. J., Sanz-Viedma S., Garcia-Solis D., Escobar-Delgado T., Mir P. Clinical Features and 123I-FP-CIT SPECT Imaging in Drug-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2010;37:556–564. DOI: 10.1007/s00259-009-1289-4.
53. Hupf H. B., Eldridge J. S., Beaver J. E. Production of Iodine-123 for Medical Applications. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 1968;19(4):345–351. DOI: 10.1016/0020-708x(68)90178-6.
54. Meegalla S. K., Plössl K., Kung M.-P., Chumpradit S., Stevenson D. A., Kushner S. A., McElgin W. T., Mozley P. D., Kung H. F. Synthesis and Characterization of Technetium-99m-Labeled Tropanes as Dopamine Transporter-Imaging Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997;40(1):9–17. DOI: 10.1021/jm960532j.
55. Meegalla S., Plössl K., Kung M.-P., Chumpradit S., Stevenson D. A., Frederick D., Kung H. F. Tc-99m-Labeled Tropanes as Dopamine Transporter Imaging Agents. *Bioconjugate Chemistry*. 1996;7(4):421–429. DOI: 10.1021/bc960029l.
56. Madras B. K., Jones A. G., Mahmood A., Zimmerman R. E., Garada B., Holman B. L., Davison A., Blundell P., Meltzer P. C. Technepine: A High-Affinity99mtechnetium Probe to Label the Dopamine Transporter in Brain by SPECT Imaging. *Synapse*. 1996;22:239–246. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2396(199603)22:3<239::AID-SYN6>3.0.CO;2-D.
57. Chen Y.-K., Liu R.-S., Huang W.-S., Wey S.-P., Ting G., Liu J.-C., Shen Y.-Y., Wan F.-J. The Role of Dopamine Transporter Imaging Agent [^{99m}Tc]TRODAT-1 in Hemi-Parkinsonism

Rat Brain. *Nuclear Medicine and Biology*. 2001;28(8):923–928. DOI: 10.1016/S0969-8051(01)00255-4.
58. Fang P., Wu C.-Y., Liu Z.-G., Wan W.-X., Wang T.-S., Chen S.-D., Chen Z.-P., Zhou X. The Preclinical Pharmacologic Study of Dopamine Transporter Imaging Agent [^{99m}Tc]TRODAT-1. *Nuclear Medicine and Biology*. 2000;27(1):69–75. DOI: 10.1016/s0969-8051(99)00090-6.
59. Tzen K. Y., Lu C. S., Yen T. C., Wey S. P., Ting G. Differential Diagnosis of Parkinson's Disease and Vascular Parkinsonism by (99m)Tc-TRODAT-1. *Journal of Nuclear Medicine*. 2001;42(3):408–413.
60. Kung H. F., Kim H-J., Kung M.-P., Meegalla S. K., Plössl K., Lee H.-K. Imaging of Dopamine Transporters in Humans with Technetium-99m TRODAT 1. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1996;23:1527–1530. DOI: 10.1007/BF01254479.
61. Bao S.-Y., Wu J.-C., Luo W.-F., Fang P., Liu Z.-l., Tang J. Imaging of Dopamine Transporters with Technetium-99m TRODAT-1 and Single Photon Emission Computed Tomography. *Journal of Neuroimaging*. 2000;10:200–203. DOI: 10.1111/jon2000104200.
62. Huang W. S., Lin S. Z., Lin J. C., Wey S. P., Ting G., Liu R. S. Evaluation of Early-Stage Parkinson's Disease with 99mTc-TRODAT-1 Imaging. *Journal of Nuclear Medicine*. 2001;42(9):1303–1308.
63. Mozley P. D., Schneider J. S., Acton P. D., Plössl K., Stem M. B., Siderowf A., Leopold N. A., Li P. Y., Alavi A., Kung H. F. Binding of [99mTc]TRODAT-1 to Dopamine Transporters in Patients with Parkinson's Disease and in Healthy Volunteers. *Journal of Nuclear Medicine*. 2000;41(4):584–589.
64. Dresel S. H. J., Kung M.-P., Plössl K., Meegalla S. K., Kung H. F. Pharmacological Effects of Dopaminergic Drugs on in Vivo Binding of [^{99m}Tc]TRODAT-1 to the Central Dopamine Transporters in Rats. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 1998;25:31–39. DOI: 10.1007/s002590050191.
65. Sasannezhad P., Juibary A. G., Sadri K., Sadeghi R., Sabour M., Kakhki V. R. D., Alizadeh H. ^{99m}Tc-TRODAT-1 SPECT Imaging in Early and Late Onset Parkinson's Disease. *Asia Oceania Journal of Nuclear Medicine and Biology*. 2017;5(2):114–119. DOI: 10.22038/aojnmb.2017.8844.
66. Fallahi B., Esmaeili A., Beiki D., Oveisgharan S., Noorollahi-Moghaddam H., Erfani M., Tafakhori A., Rohani M., Fard-Esfahani A., Emami-Ardekani A., Geramifar P., Eftekhari M. Evaluation of 99mTc-TRODAT-1 SPECT in the Diagnosis of Parkinson's Disease versus Other Progressive Movement Disorders. *Annals of Nuclear Medicine*. 2016;30:153–162. DOI: 10.1007/s12149-015-1042-y.
67. Baseri F., Aghamollaii V., Salehi Y., Farzanehfar S., Hosseini A., Tafakhori A., Abbasi M. [^{99m}Tc]Tc-TRODAT-1 Scan Diagnostic Accuracy for Differentiation of Dementia of Lewy Body from Alzheimer's Disease. *Iranian Journal of Nuclear Medicine*. 2024;32(1):40–44. DOI: 10.22034/IRJNM.2023.129231.1556.
68. Sun Y., Liu C., Chen Z., Li B., Lv Z., Wang J., Lou J., Tang J., Wang Y., Zhang G., Liu X. A Phase 2, Open-Label, Multi-Center Study to Evaluate the Efficacy and Safety of 99mTc-TRODAT-1 SPECT to Detect Parkinson's Disease. *Annals of Nuclear Medicine*. 2020;34:31–37. DOI: 10.1007/s12149-019-01412-2.
69. Spies H., Pietzsch H.-J. Stannous Chloride in the Preparation of ^{99m}Tc Pharmaceuticals. In: Zolle I., editor. Technetium-99m Pharmaceuticals. Heidelberg: Springer; 2007. P. 59–66.
70. Steigman J., Meinken G., Richards P. The Reduction of Pertechnetate-99 by Stannous Chloride-II. The Stoichiometry of the Reaction in Aqueous Solutions of Several Phosphorus(V) Compounds. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 1978;29(11):653–660. DOI: 10.1016/0020-708X(78)90102-3.
71. De Kieviet W. Technetium Radiopharmaceuticals: Chemical Characterization and Tissue Distribution of Tc-Glucoheptonate Using Tc-99m and Carrier Tc-99. *Journal of Nuclear Medicine*. 1981;22(8):703–709.
72. Choi S. R., Kung M.-P., Plössl K., Meegalla S., Kung H. F. An Improved Kit Formulation of a Dopamine Transporter Imaging Agent: [Tc-99m]TRODAT-1. *Nuclear Medicine and Biology*. 1999;26(4):461–466. DOI: 10.1016/S0969-8051(99)00010-4.
73. Kung M.-P., Stevenson D. A., Plössl K., Meegalla S. K., Beckwith A., Essman W. D., Mu M., Lucki I., Kung H. F. [^{99m}Tc]TRODAT-1: A Novel Technetium-99m Complex as a Dopamine Transporter Imaging Agent. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 1997;24:372–380. DOI: 10.1007/s002590050065.
74. Vatsa R., Shukla J., Mittal B. R., Sood A., Joshi R. K., Palarwal K., Bhusari P., Modi M. In-House Preparation and Quality Control of Tc99m TRODAT 1 for Diagnostic Single-Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography Imaging in Parkinson's Disease. *Indian Journal of Nuclear Medicine*. 2017;32(4):266–270. DOI: 10.4103/ijnm.IJNM_111_17.
75. Shinto A., Antony J., Kamaleshwaran K., Vijayan K., Selvan A., Korde A., Kameshwaran M., Samuel G. Correlative ^{99m}Tc-Labeled Tropane Derivative Single Photon Emission Computer Tomography and Clinical Assessment in the Staging of Parkinson Disease. *World Journal of Nuclear Medicine*. 2014;13(03):178–183. DOI: 10.4103/1450-1147.144818.
76. Korde A., Kameswaran M., Satpati D., Dev Sarma H., Banerjee S., Shinto A., Kamaleshwaran K. K., Samuel G. Single Vial Freeze-Dried TRODAT-1 Kit: Preparation and Demonstration of Clinical Efficacy of [^{99m}Tc]TRODAT-1 in Indian Scenario. *Applied Radiation and Isotopes*. 2015;96:57–62. DOI: 10.1016/j.apradiso.2014.10.017.
77. Erfani M., Shafiei M., Charkhlooie G., Goudarzi M. Development of a Freeze-Dried Radiopharmaceutical Kit for Dopamine Transporters Imaging. *Iranian Journal of Nuclear Medicine*. 2015;23(1):15–20.
78. Erfani M., Shafiei M. Preparation of 99mTc-TRODAT-1 with High Labeling Yield in Boiling Water Bath: A New Formulation. *Nuclear Medicine and Biology*. 2014;41(4):317–321. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2014.01.003.
79. Gandomkar M., Najafi R., Shafiei M., Mazidi M., Sadat Ebrahimi S. E. Preclinical Evaluation of [^{99m}Tc/EDDA/Tricine/HYNIC^{0}, 1-Nal^{3}, Thr^{8}]-Octreotide as a New Analogue in the Detection of Somatostatin-Receptor-Positive Tumors. *Nuclear Medicine and Biology*. 2007;34(6):651–657. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2007.06.006.
80. Erfani M., Shafiei M., Mazidi M., Goudarzi M. Preparation and Biological Evaluation of [^{99m}Tc/EDDA/Tricine/HYNIC^{0}, BzThi^{3}]-Octreotide for Somatostatin Receptor-Positive Tumor Imaging. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2013;28(3):240–247. DOI: 10.1089/cbr.2012.1270.
81. Shirmardi S. P., Gandomkar M., Maragheh M. G., Shamsaei M. Preclinical Evaluation of a New Bombesin Analog for Imaging of Gastrin-Releasing Peptide Receptors. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2011;26(3):309–316. DOI: 10.1089/cbr.2010.0912.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.014.2; 615.453

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1935

Check for updates

CC BY 4.0

Оценка влияния поливинилпирролидон-винилацетата на свойства кверцетина в составе бинарной твердой дисперсии, полученной методом экструзии горячего расплава

А. А. Данилова[1]✉, К. А. Гусев[1], Н. О. Архипова[1], Л. Г. Данилов[2], Е. В. Вишняков[1], Д. Н. Маймистов[1], Е. В. Флисюк[1]

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

[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), кафедра генетики и биотехнологий. 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

✉ **Контактное лицо:** Данилова Александра Артёмовна. **E-mail:** shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

ORCID: А. А. Данилова – https://orcid.org/0000-0002-0191-7342;
К. А. Гусев – https://orcid.org/0000-0003-1922-3282;
Н. О. Архипова – https://orcid.org/0009-0008-7730-9221;
Л. Г. Данилов – https://orcid.org/0000-0002-4479-3095;
Е. В. Вишняков – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866;
Д. Н. Маймистов – https://orcid.org/0000-0001-8070-1699;
Е. В. Флисюк – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462.

Статья поступила: 20.09.2024 **Статья принята в печать:** 12.12.2024 **Статья опубликована:** 13.12.2024

Резюме

Введение. Несмотря на выраженный терапевтический потенциал, флавоноиды ограниченно используются в медицинской практике в качестве активных фармацевтических субстанций (АФС) ввиду комплекса неудовлетворительных физико-химических свойств. Для изучения данной проблемы в качестве модельного объекта выбрана субстанция кверцетина, обладающая крайне низкой растворимостью в воде и средах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). В связи с этим возникает интерес к исследованию возможности и перспектив применения подхода по улучшению физико-химических свойств флавоноидов на примере кверцетина с использованием технологии экструзии горячего расплава (ЭГР) для создания твердых дисперсных систем (ТДС) на основе гидрофильного полимера-носителя (поливинилпирролидон-винилацетата). Для улучшения свойств растворимости и растворения активного вещества обозначается необходимость подбора эффективного соотношения кверцетина и полимера в составе твердой дисперсии.

Цель. Оценка влияния поливинилпирролидон-винилацетата на свойства водной растворимости кверцетина в составе бинарной твтрдой дисперсии, полученной методом экструзии горячего расплава.

Материалы и методы. Объекты исследования: субстанция кверцетина (субстанция-порошок, содержание 98 %, Molekula Limited, Великобритания) и полимер-носитель в виде сополимера поливинилпирролидона с винилацетатом в соотношении 60 : 40 (ПВПВА) марки VIVAPHARM® PVP/VA 64 (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия). Получение ТДС кверцетина осуществляли с помощью двухшнекового лабораторного экструдера HAAKE™ MiniCTW (Thermo Fisher Scientific, Германия). Образцы исследовали методами фазово-контрастной микроскопии, ИК-Фурье-спектроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии. Количественное содержание кверцетина в составе твердой дисперсной системы определяли методом УФ-спектрофотометрии.

Результаты и обсуждение. Независимо от концентрации ПВПВА в ТДС для всех составов отмечено улучшение свойств растворимости и скорости растворения кверцетина по сравнению с чистой субстанцией. Обнаружено, что по мере уменьшения содержания кверцетина увеличивается вклад полимера-носителя в ТДС, наблюдается частичная или даже полная аморфизация кверцетина в составах с 1%-м и 5%-м содержанием активного вещества, в результате чего улучшаются свойства водной растворимости, повышается стабильность растворов и скорость растворения образцов в средах желудочно-кишечного тракта. Водная растворимость кверцетина в составе 1%-й ТДС относительно исходной АФС увеличена в 353 раза. При этом в средах, моделирующих отделы ЖКТ, наблюдалось полное высвобождение кверцетина из 1%-й ТДС за 40 минут (для среды хлористоводородной кислоты и цитратного буфера) и растворение 90 % вещества в течение 60 минут в среде фосфатного буфера.

© Данилова А. А., Гусев К. А., Архипова Н. О., Данилов Л. Г., Вишняков Е. В., Маймистов Д. Н., Флисюк Е. В., 2025
© Danilova A. A., Gusev K. A., Arkhipova N. O., Danilov L. G., Vishnyakov E. V., Maimistov D. N., Flisyuk E. V., 2025

Заключение. На основании проведенного исследования твердая дисперсия, содержащая 1 % кверцетина, на основе поливинилпирролидон-винилацетата является наиболее перспективной для дальнейшей разработки готовых лекарственных форм.

Ключевые слова: кверцетин, твердые дисперсии, экструзия горячего расплава, антипластификация, растворимость, растворение

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

Вклад авторов. А. А. Данилова, К. А. Гусев, Е. В. Флисюк, Д. Н. Маймистов – постановка задачи, составление плана экспериментальных работ. А. А. Данилова, Н. О. Архипова – реализация экструзии горячего расплава, проведение тестов растворения и растворимости. Л. Г. Данилов – пробоподготовка и микроскопия твердых дисперсий. А. А. Данилова – расчеты термических свойств твердых дисперсий. Е. В. Вишняков – снятие ИК-Фурье-спектров твердых дисперсий. Е. В. Вишняков, А. А. Данилова – интерпретация данных ИК-фурье-спектроскопии. А. А. Данилова, Л. Г. Данилов – статистическая обработка и визуализация данных по растворимости и кинетике растворения. А. А. Данилова, К. А. Гусев, Е. В. Флисюк, Д. Н. Маймистов – обсуждение результатов, написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования (ЦКП) «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России».

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании JRS Pharma (ООО «Реттенмайер РУС») за предоставленные образцы полимера.

Для цитирования: Данилова А. А., Гусев К. А., Архипова Н. О., Данилов Л. Г., Вишняков Е. В., Маймистов Д. Н., Флисюк Е. В. Оценка влияния поливинилпирролидон-винилацетата на свойства кверцетина в составе бинарной твердой дисперсии, полученной методом экструзии горячего расплава. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):127–137. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1935

Assessment of polyvinylpyrrolidone vinyl acetate effect on quercetin properties in binary solid dispersion prepared by hot melt extrusion

Alexandra A. Danilova[1]✉, Konstantin A. Gusev[1], Nadezhda O. Arkhipova[1], Lavrentii G. Danilov[2], Evgeniy V. Vishnyakov[1], Denis N. Maimistov[1], Elena V. Flisyuk[1]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] St Petersburg University, Saint Petersburg State University (SPbU), Department of Genetics and Biotechnology. 7–9, Universitetskaya Embankment, Saint-Petersburg, 199034, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexandra A. Danilova. **E-mail:** shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

ORCID: Alexandra A. Danilova – https://orcid.org/0000-0002-0191-7342;
Konstantin A. Gusev – https://orcid.org/0000-0003-1922-3282;
Nadezhda O. Arkhipova – https://orcid.org/0009-0008-7730-9221;
Lavrentii G. Danilov – https://orcid.org/0000-0002-4479-3095;
Evgeniy V. Vishnyakov – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866;
Denis N. Maimistov – https://orcid.org/0000-0001-8070-1699;
Elena V. Flisyuk – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462.

Received: 20.09.2024 **Accepted:** 12.12.2024 **Published:** 13.12.2024

Abstract

Introduction. Flavonoids, despite their pronounced therapeutic benefits, are limitedly used in medicine as active pharmaceutical ingredients (API) owing to a complex of unsatisfactory physicochemical properties. In order to study the mentioned problem, we decided to use quercetin as model compound with extremely low water solubility and dissolution in gastrointestinal (GI) tract media. Therefore, the main idea appears to study the possibility and prospects of hot melt extrusion (HME) application for enhancement the solubility properties of quercetin in the composition of solid dispersion system (SDS) based on hydrophilic polymeric carrier (polyvinylpyrrolidone vinyl acetate, PVP/VA). Consequently, there is a necessity to select effective drug-to-polymer ratio in solid dispersion for providing better solubility and dissolution properties.

Aim. Assessment of PVP/VA effect on quercetin solubility properties in binary solid dispersion prepared by HME.

Materials and methods. Quercetin substance with purity 98 % was purchased from Molekula Limited, United Kingdom. PVP/VA (copolymer of polyvinylpyrrolidone with vinyl acetate in the ratio of 60 : 40, VIVAPHARM® PVP/VA 64) as carrier was procured from JRS PHARMA (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Germany). Quercetin SDS were prepared using micro-conical twin screw compounder HAAKE™ MiniCTW (Thermo Fisher Scientific, Germany). The obtained samples were analyzed by phase-contrast microscopy, FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry (DSC). Quercetin quantitative content in SDS were determined by UV-spectrophotometry.

Results and discussion. The improvement of water solubility and dissolution rates of quercetin SDS in comparison with pure substance was observed for all solid dispersion compositions irrespective to drug-to-polymer ratio. Notably, with reduction of quercetin content in SDS compositions the PVP/VA contribution was increased. We found partial or even complete amorphization of API in formulations with 1 % and 5 % quercetin content, resulting in the improvement of water solubility properties, stability of solutions and increased dissolution rates in GI tract media. Water solubility of 1 % SDS relative to pure substance was enhanced by 353-fold. At the same time, the complete release of quercetin from 1 % SDS was achieved in 40 minutes in the hydrochloric acid and citrate buffer, and also quercetin dissolution of 90 % in 60 minute was observed in phosphate buffer.
Conclusion. 1 % quercetin SDS based on PVP/VA appears to be the most promising for solid dosage forms development.

Keywords: quercetin, solid dispersions, hot melt extrusion, antiplasticization, solubility, dissolution

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

Contribution of the authors. Alexandra A. Danilova, Konstantin A. Gusev, Denis N. Maimistov, Elena V. Flisyuk were conceived and developed the experimental plans. Alexandra A. Danilova and Nadezhda O. Arkhipova prepared experimental samples of quercetin solid dispersions by hot melt extrusion, carried out solubility and dissolution tests. Lavrentii G. Danilov conducted the microscopy assays. Alexandra A. Danilova performed the theoretically calculation of obtained solid dispersions' thermic properties. Evgeniy V. Vishnyakov characterized experimental samples with FTIR spectroscopy. Alexandra A. Danilova and Evgeniy V. Vishnyakov performed analysis and visualization of spectral data. Alexandra A. Danilova and Lavrentii G. Danilov carried out the statistical processing and visualization of solubility and release kinetic data. Alexandra A. Danilova, Konstantin A. Gusev, Denis N. Maimistov and Elena V. Flisyuk were participated in results interpretation and wrote the manuscript.

Funding. The results of the work were obtained with equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University".

Acknowledgment. The authors are grateful to JRS Pharma (Rettenmaier Russia LCC) for providing the polymer samples.

For citation: Danilova A. A., Gusev K. A., Arkhipova N. O., Danilov L. G., Vishnyakov E. V., Maimistov D. N., Flisyuk E. V. Assessment of polyvinylpyrrolidone vinyl acetate effect on quercetin properties in binary solid dispersion prepared by hot melt extrussion. *Drug development & registration*. 2025;14(1):127–137. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1935

ВВЕДЕНИЕ

Выраженные антиоксидантные и противовоспалительные свойства флавоноидов [1–3] обусловливают их ценность и значимость как потенциальных кандидатов для разработки лекарственных средств (ЛС). Возможность использования флавоноидов в виде активных фармацевтических субстанций (АФС) опосредована выраженным сродством (иначе говоря – метаболитной близостью) к организму человека, низкой токсичностью и меньшим каскадом побочных реакций. Благодаря перечисленным свойствам появляется возможность применения ЛС на основе флавоноидов в том числе у пациентов с коморбидностью [4].

На российском фармацевтическом рынке лекарственные препараты (ЛП) флавоноидов представлены преимущественно ангиопротекторными средствами: на основе очищенных микронизированных флавоноидных фракций (Детралекс®, Венарус®, Детравенол® и пр.), рутозида (Аскорутин®) и троксерутина (Троксевазин®)[1]. Принципиальным недостатком рассматриваемых препаратов является достаточно большая дозировка действующего вещества (ДВ), как правило свыше 500 мг [5], для обеспечения необходимого терапевтического эффекта.

Проблема низкой биодоступности данного класса биологически активных соединений (БАС) связана со свойствами растворимости. Плохая растворимость в большинстве случаев приводит к снижению терапевтической эффективности АФС [6]. Характерной особенностью флавоноидов является преобладание субстанций-кандидатов, относящихся ко II (плохая растворимость, высокая проницаемость) и IV (плохая растворимость и низкая проницаемость)

[1] Безопасность лекарственных препаратов. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru. Ссылка активна на 10.06.2024.

классам по биофармацевтической классификационной системе (БКС) [7, 8]. Другими словами, флавоноиды обладают крайне неудовлетворительными физико-химическими и фармакокинетическими свойствами, что ограничивает возможности использования их терапевтического потенциала в технологии ЛС.

Для решения проблемы низкой растворимости флавоноидов в настоящее время предложены нано- и липосомальные технологии, подходы по созданию комплексов с поверхностно-активными веществами, циклодекстринами и хелатирующими соединениями, а также технологии твердых дисперсных систем (ТДС) [7]. Из перечисленных стратегических решений наиболее востребованной и пригодной для крупномасштабного внедрения с учетом требований надлежащей производственной практики является технология создания ТДС методом экструзии горячего расплава (ЭГР). Применение ЭГР в фармации уже зарекомендовало себя в качестве эффективного способа повышения растворимости плохо растворимых и нерастворимых веществ [8–11], маскировки неприятных органолептических показателей субстанций [12], модификации высвобождения ДВ и создания таргетных систем доставки [13].

Использование технологии ЭГР для создания твердых дисперсий флавоноидов предполагает диспергирование активного вещества в гидрофильной матрице (как правило, полимере-носителе) с последующим сплавлением [7]. Полученные филаменты (экструдаты) в дальнейшем измельчаются и могут быть использованы в качестве гранулята для создания пероральных систем доставки. Такой подход позволяет добиться аморфизации ДВ (снижения степени кристалличности) и повышения его водной растворимости и растворения в средах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), что в перспективе может способствовать улучшению биодоступности и снижению дозировки активного вещества с сохранением терапевтической эффективности.

В рамках отмеченной проблематики интерес для рассмотрения представляет кверцетин (3,3′,4′,5,7-пентагидроксифлавон) как характерный модельный объект. Данная молекула является агликоном и отличается сравнительно простой химической структурой (отсутствием гликозидных частей) по сравнению с другими представителями флавоноидов. Кверцетин относится к IV классу по БКС, обладает неудовлетворительными технологическими свойствами, является фоточувствительной субстанцией с горьким вкусом [12, 14, 15]. Таким образом, обозначается проблемное поле для изучения ТДС кверцетина, что в перспективе может быть использовано в разработке твердых лекарственных форм (ЛФ) для перорального применения.

Наряду с этим возникает вопрос подбора эффективного соотношения ДВ и полимера-носителя для обеспечения надлежащих физико-химических, фармакокинетических и технологических свойств. Поэтому целью данного исследования является оценка влияния поливинилпирролидон-винилацетата на свойства кверцетина в составе бинарной твердой дисперсии, полученной методом экструзии горячего расплава.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использованы: субстанция кверцетина (субстанция-порошок, содержание 98 %, Molekula Limited, Великобритания) и полимер-носитель в виде сополимера поливинилпирролидона с винилацетатом в соотношении 60:40 (ПВПВА) марки VIVAPHARM® PVP/VA 64 (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия). Выбор полимера-носителя обусловлен его относительно небольшой температурой стеклования (105 °C) и возможностью проведения процесса ЭГР в диапазоне температур до 180 °C [10]. Учитывая специфику химической структуры ПВПВА, необходимо обратить внимание на винилацетатный компонент, который снижает гидрофильность и температуру стеклования по сравнению с гомополимерами повидона аналогичной молекулярной массы [16].

Предварительно подготовленные механические смеси кверцетина и ПВПВА в различных соотношениях загружали в питательный бункер двухшнекового лабораторного экструдера HAAKE™ MiniCTW (Thermo Fisher Scientific, Германия) и проводили процесс экструзии при 160 °C и скорости вращения шнеков 20 об/мин.

Диаметр получаемых филаментов фиксировался в диапазоне 1,0 ± 0,5 мм. Визуальную оценку ТДС осуществляли методом фазово-контрастной микроскопии с использованием прямого флуоресцентного микроскопа Leica DM4000 (Leica Microsystems, Германия).

Термические свойства ТДС изучали с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на установке термического анализа Thermal Analysis System DSC 3+ (METTLER TOLEDO, Швейцария) в соответствии с описанной ранее методикой [9, 10]. Эффект антипластификации оценивали по результатам второго нагрева образцов.

Согласно литературным данным [17–20], для предсказания температур стеклования ($T_{g\,(calc)}$) полученных филаментов используется расчетный метод с применением уравнения Гордона – Тейлора [21]:

$$T_{g(calc)} = \frac{T_{g1}w_1 + Kw_2T_{g2}}{w_1 + Kw_2}, \quad (1)$$

где $T_{g\,(calc)}$ – теоретическая температура стеклования ТДС, полученной методом экструзии горячего расплава, °C; T_{g1}, T_{g2} – температуры стеклования/плавления чистых веществ, °C; w_1, w_2 – массовые доли компонентов в составе ТДС, % масс.; K – поправочный коэффициент, рассчитанный по формуле (2):

$$K = \frac{T_{g1}\rho_1}{T_{g2}\rho_2}, \quad (2)$$

где ρ_1, ρ_2 – плотности чистых веществ, г/см^3.

Структурные характеристики полученных образцов изучали с помощью ИК-Фурье-спектроскопии на спектрометре Spectrum 3 (PerkinElmer, США) с использованием приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в диапазоне длин волн от 400 см$^{-1}$ до 4000 см$^{-1}$.

Количественное определение кверцетина в составе ТДС осуществляли методом УФ-спектрофотометрии на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия). Предварительно готовили рабочий стандартный образец (РСО) кверцетина: точную навеску субстанции (степень чистоты 98 %) 0,025 г помещали в мерную колбу объемом 100 мл, добавляли 80%-й спирт этиловый в количестве 50 мл. Колбу помещали на водяную баню (t < 70 °С) и проводили растворение АФС. После доводили раствор до метки 80%-м спиртом этиловым. Отбирали пробу объемом 10 мл, помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили раствор до метки водой очищенной. Полученный РСО кверцетина (концентрация 0,025 мг/мл) фильтровали с помощью полиэфирсульфонового (ПЭС) фильтра 0,45 мкм PES Agilent (Agilent Technologies, Inc., США). Затем снимали оптическую плотность раствора кверцетина в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм при аналитической длине волны 375 ± 2 нм, соответствующей максимуму поглощения вещества. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную. Дополнительно строили калибровочный график кверцетина, в соответствии с которым в дальнейшем определяли концентрацию ДВ в ТДС. Все испытания осуществлялись в трехкратной повторности.

Стабильность растворов ТДС оценивали по следующей методике: навеску филаментов с рассчитанным предварительно содержанием кверцетина помещали в конические колбы объемом 100 мл и заливали водой очищенной. В ходе эксперимента фиксировали время полного растворения ТДС по отсутствию видимых частиц и время выпадения осадка ДВ.

Для изучения водной растворимости ТДС кверцетина в растворах предварительно осуществляли измельчение экструдатов с помощью конической мельницы-калибратора ZLJ-125 (Shanghai Unique Machinery Technology Co., Ltd., Китай) при скорости вращения роторного ножа 600 об/мин. Для получения фракций размером менее 710 мкм использовали сито с диаметром ячеек 1,00 мм. Затем навески измельченных ТДС помещали в стеклянные флаконы (15 мл), добавляли соответствующее количество воды до концентрации кверцетина в полученном растворе 1 мг/мл. Растворимость измельченных экструдатов оценивали в условиях постоянного перемешивания на шейкере PST-60HL-4 (BioSan, Латвия) со скоростью 200 об/мин в течение 48 часов при комнатной температуре 22,0 ± 0,5 °С. Отбор проб (5 мл) осуществляли в контрольные временные точки 1, 4, 8, 24 и 48 часов соответственно с помощью автоматической пипетки-дозатора, восполняя объем среды соответствующим количеством растворителя. Отобранные аликвоты подвергали механической фильтрации с помощью шприцевого ПЭС-фильтра 0,45 мкм PES Agilent (Agilent Technologies, Inc., США). Перед анализом окрашенных растворов осуществляли необходимое разведение. Количество кверцетина оценивали методом УФ-спектрофотометрии при 375 ± 2 нм по величине оптической плотности раствора с последующим пересчетом на концентрацию ДВ. Испытания проводили в трехкратной повторности. Для проверки достоверности полученных значений рассчитывали величину относительного стандартного отклонения (RSD). Приемлемыми считали результаты, для которых выполнялось условие RSD < 20 % [22].

Изучение кинетики высвобождения кверцетина из филаментов осуществляли на тестере растворения ERWEKA DT 626/1000 (ERWEKA GmbH, Германия) в соответствии с требованиями Фармакопеи ЕАЭС[1]. Филаменты фиксированной длины (20 ± 2) мм помещались в соответствующую среду растворения (объем 1000 мл) при температуре 37 ± 0,5 °С. Предварительно производили необходимые расчеты содержания кверцетина в каждом составе таким образом, чтобы количество активного вещества было одинаковым в отобранных для эксперимента образцах. Исследование проводили с использованием трех сред растворения: 0,01 М HCl (pH = 2), ацетатного (pH = 4,5) и фосфатного буфера (pH = 6,8), моделирующих отделы ЖКТ, с учетом рекомендаций EMA[2] и FDA[3]. Время растворения образцов составило 60 минут. Отбор проб (10 мл) осуществляли с периодичностью 10 минут. При этом восполняли объем среды необходимым количеством соответствующей среды растворения. Отобранные пробы фильтровали с помощью шприцевого ПЭС-фильтра Agilent (Agilent Technologies, Inc., США) с диаметром пор 0,45 мкм. Методом УФ-спектрофотометрии определяли количественное содержание ДВ при выбранной аналитической дли-

[1] Фармакопея ЕАЭС. Доступно по: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. Ссылка активна на 10.06.2024.

[2] European Medicines Agency (EMA). ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-5_en.pdf. Accessed: 10.06.2024.

[3] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Available at: https://www.fda.gov/media/70936/download. Accessed: 10.06.2024.

не волны. В качестве растворов сравнения использовали соответствующую среду растворения.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли с помощью программного обеспечения R-Studio (R Foundation for Statistical Computing, Австрия) в соответствии с требованиями Фармакопеи ЕАЭС[1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния соотношения полимера-носителя и кверцетина получены модельные составы ТДС методом ЭГР (таблица 1).

Таблица 1. Составы ТДС кверцетина на основе ПВПВА

Table 1. SDS composition of quercetin and PVPVA

Состав Composition	Q1	Q2	Q3	Q4
Соотношение кверцетина и ПВПВА Quercetin to PVPVA ratio	1 %	5 %	10 %	20 %

В зависимости от содержания кверцетина образцы отличались по степени прозрачности и цветности: составы Q1 и Q2 представляли собой прозрачные желтые нити, в то время как составы Q3 и Q4 не обладали прозрачностью и имели пшеничный оттенок, интенсивность которого увеличивалась пропорционально повышению концентрации кверцетина в ТДС. Прозрачность составов Q1 и Q2 объясняется тем, что основной вклад в твердую дисперсию вносит ПВПВА.

Методом фазово-контрастной микроскопии обнаружено закономерное увеличение визуально детектируемой кристаллической фазы кверцетина и нерастворенных в полимере примесей по мере повышения концентрации субстанции в составе ТДС (рисунок 1).

Исходя из этого, можно выдвинуть предположение касательно частичной или даже полной аморфизации кверцетина в образцах с низкими концентрациями ДВ – Q1 и Q2.

Как известно, мерой оценки взаимодействия полимера-носителя и ДВ в составе ТДС является температура стеклования (T_g) [23]. При изменении экспериментального значения $T_{g\,(exp)}$ по сравнению с теоретическим $T_{g\,(calc)}$ могут наблюдаться как положительные, так и отрицательные отклонения вследствие характера взаимодействий компонентов ТДС. В случае положительного отклонения ($T_{g\,(exp)} > T_{g\,(calc)}$) снижается свободный объем полимера и его подвижность, в случае отрицательного ($T_{g\,(exp)} < T_{g\,(calc)}$) свободный объем полимера в фазе ТДС значительно превышает объем в идеальной смеси [21]. В связи с чем в рамках настоящего исследования при изучении термических свойств ТДС кверцетина одним из элементов анализа стало сравнение теоретических значений $T_{g\,(calc)}$, рассчитанных по уравнению (1), с экспериментальными значениями $T_{g\,(exp)}$, полученными методом ДСК (рисунок 2). Результаты расчетов представлены в таблице 2.

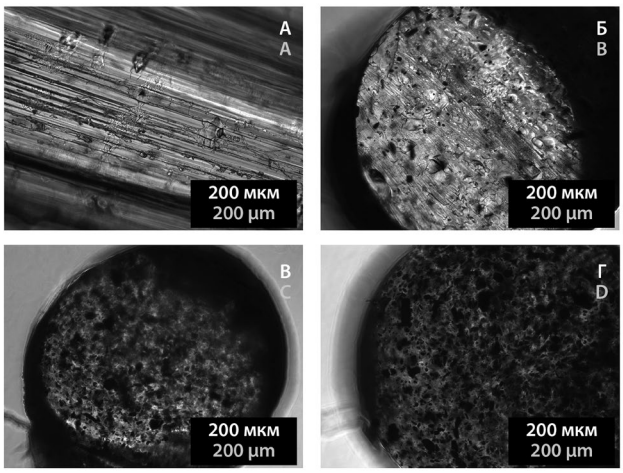


Рисунок 1. Микроскопия ТДС кверцетина:
А – в концентрации 1 %; Б – 5 %; В – 10 %; Г – 20 %

Figure 1. Microphotographs of quercetin SDS in concentration:
A – 1 %; B – 5 %; C – 10 %; D – 20 %

Таблица 2. Параметры термического анализа кверцетина, полимера-носителя и составов ТДС кверцетина

Table 2. Thermal analysis parameters of quercetin, carrier and quercetin SDS

Компонент / состав Component / composition	ΔC_p, Дж/г ΔC_p, J/g	$T_{g\,(calc)}$, °C	$T_{g\,(exp)}$, °C	Изменения Deviation
Кверцетин Quercetin	–159,09	–	327,05	–
ПВПВА PVPVA	0,399	–	105,65	–
Q1	0,393	109,43	109,11	отсутствуют none
Q2	0,406	113,67	112,66	+
Q3	0,423	119,24	115,25	+
Q4	0,446	131,37	121,84	+

Теоретические значения температуры стеклования оказались близки к экспериментальным данным. Для составов Q2, Q3 и Q4 наблюдались положительные отклонения, что является подтверждением факта снижения свободного объема полимера в ТДС. С другой стороны, состав Q1 характеризовался отсутствием статистически значимых различий между экспериментальным и расчетным значениями (p-value > 0,05) температуры стеклования, что свидетельствует об образовании однородной системы.

[1] Фармакопея ЕАЭС. Доступно по: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. Ссылка активна на 10.06.2024.

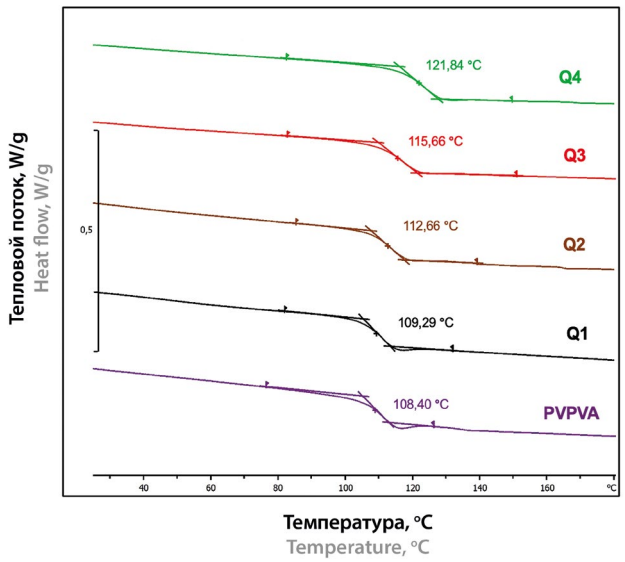


Рисунок 2. Результаты ДСК для составов ТДС кверцетина

Figure 2. DSC-curves of quercetin SDS compositions

Кроме того, увеличение содержания кверцетина в составах ТДС приводило к повышению температуры стеклования системы и удельной теплоемкости (ΔC_p), то есть наблюдался эффект антипластификации. Данное явление может быть обусловлено более выраженным взаимодействием между кверцетином и ПВПВА в составе ТДС, что, предположительно, оказывает влияние на свойства растворимости образцов.

С целью уточнения характера взаимодействий между кверцетином и ПВПВА в составах ТДС проведено исследование структурных характеристик методом ИК-Фурье-спектроскопии (рисунок 3). Субстанция кверцетина имеет характеристические интенсивные полосы поглощения δ(C-OH) при 1162 см$^{-1}$, ν(Ar—OH) пиронового ядра при 1235 см$^{-1}$, ν(C=C) ароматического кольца при 1504 см$^{-1}$, ν(C=O) при 1660 см$^{-1}$, ν(OH) при 3100–3500 см$^{-1}$ [12]. Согласно полученным данным, на спектрах поглощения ТДС не наблюдается новых пиков, свидетельствующих об изменении молекулярной структуры кверцетина. Также обнаружено исчезновение полосы поглощения гидроксильных групп при взаимодействии с ПВПВА из-за возможного образования водородных связей.

Кроме того, для составов с низким содержанием кверцетина (Q1 и Q2) наблюдалось сглаживание ($\nu(C{=}C)_{Ar}$ при 1504 см$^{-1}$) и незначительная девиация некоторых полос поглощения в пределах 4–7 см$^{-1}$ (например, ν(C=O) при 1667 см$^{-1}$ и δ(C—OH) при 1166 см$^{-1}$). Данный факт объясняется возможным возникновением водородных связей между полярными группами ДВ и полимера-носителя. С другой стороны, уширение полосы поглощения при 1666 см$^{-1}$ может происходить из-за существенного экранирующего эффекта ПВПВА, который в данной точке имеет интенсивный характеристический пик карбонильной группы в мотиве винилпирролидона [24, 25].

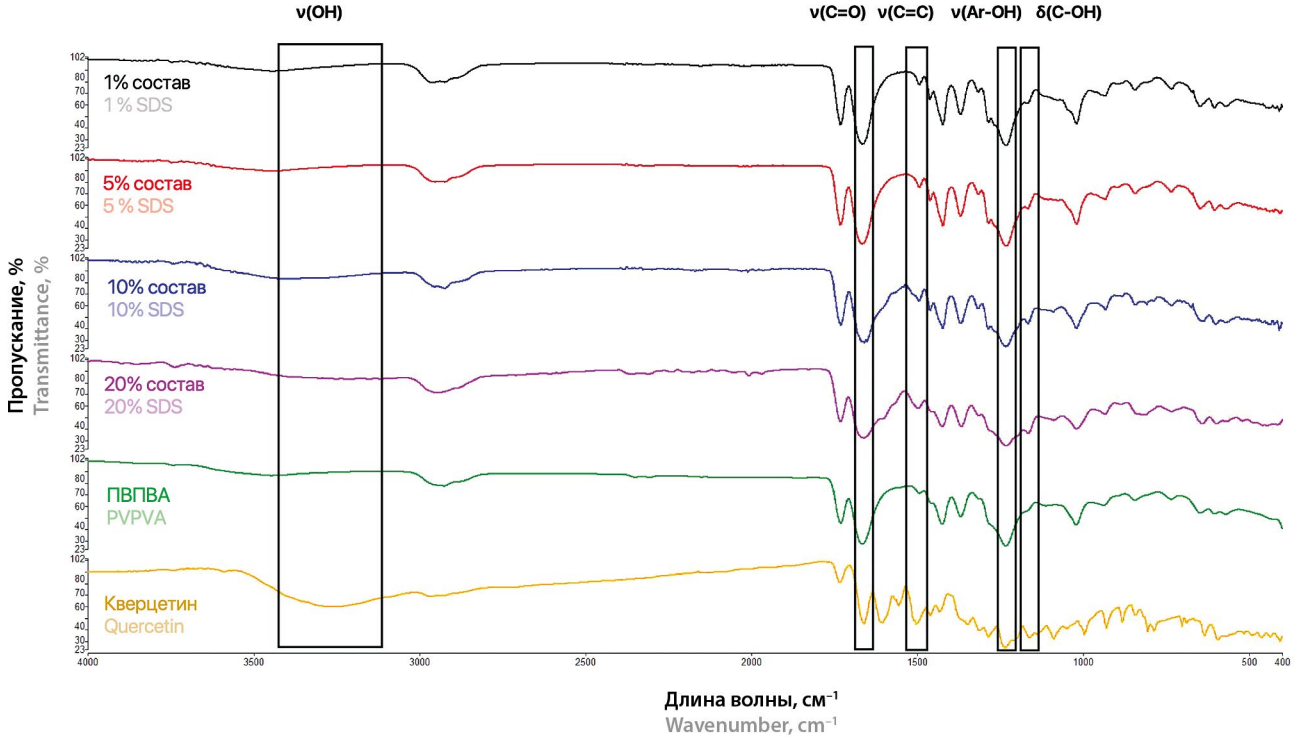


Рисунок 3. ИК-Фурье-спектры ТДС, субстанции кверцетина и ПВПВА

Figure 3. FT-IR-spectrum of quercetin SDS, pure quercetin and PVPVA

По этой причине для составов Q1 и Q2 наблюдалось практически полное совпадение спектра поглощения со спектром ПВПВА (корреляция R^2 (Q1) = 0,9955, R^2 (Q2) = 0,9886 соответственно).

Следующим этапом эксперимента стала оценка стабильности водных растворов ТДС кверцетина (таблица 3). Необходимо обратить внимание, что экструдаты состава Q4 полностью не растворились в водной среде, визуально большая часть образца ТДС представляла собой вязкую массу на дне колбы. При этом высвободившаяся в раствор часть кверцетина выпадала в осадок в виде игольчатых кристаллов через 2 часа после завершения процесса перемешивания.

Таблица 3. Результаты определения стабильности ТДС кверцетина в водных растворах

Table 3. Stability determination of quercetin SDS in water

№	Состав Composition	Время растворения, ч Dissolution period, h	Время выпадения осадка, ч Sedimentation time, h	Количественное содержание, мг/мл Content of quercetin, mg/mL
1	Q1	0,50	72	0,9984 ± 0,0012
2	Q2	1,17	12	0,6427 ± 0,0009
3	Q3	2,00	8	0,2539 ± 0,0011
4	Q4	–	2	0,1152 ± 0,0013

Составы Q2 и Q3 в ходе растворения обнаружили склонность к образованию взвесей, которые сохранялись при постоянном перемешивании. В целом стабильность растворов увеличивалась по мере снижения концентрации ДВ в ТДС: оптимальные результаты получены для состава Q1 (72 часа).

Для обоснования возможности использования составов с низкими концентрациями ДВ в технологии готовых ЛС проведена количественная оценка водной растворимости (рисунок 4). В качестве референтного состава использована чистая субстанция. Кверцетин является практически нерастворимым в воде веществом: за 48 часов при непрерывном перемешивании растворимость составила $2{,}8 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, что согласуется с данными других работ [23].

Как видно из полученных данных, увеличение концентрации ДВ в ТДС способствовало ухудшению свойств растворимости. Состав Q4 к концу эксперимента представлял собой вязкий желтый осадок. Напротив, наилучшая растворимость (0,9878 мг/мл, RSD = 1,46 %) отмечена для состава Q1, следовательно, данное соотношение кверцетина и ПВПВА можно рассматривать как эффективное.

Помимо этого, проведено изучение профилей высвобождения кверцетина из ТДС в виде филаментов в трех средах растворения, моделирующих pH отделов ЖКТ (рисунок 5, A–C).

Во всех случаях наибольшей скоростью растворения характеризовался состав Q1. Так, например, в среде хлористоводородной кислоты и цитратном буфере 100%-е растворение кверцетина наблюдалось в контрольной точке 40 минут, в среде фосфатного буфера за 60 минут достигалось 90%-е высвобождение. Состав Q2 показал удовлетворительные результаты кинетики высвобождения (за 60 минут в кислотной среде растворилось 65 % кверцетина, в цитратном буфере – 60%, в фосфатном буфере – 55 % соответственно). Для состава Q3 отмечена низкая скорость растворения, высвобождение ДВ из ТДС в средах с pH 2,0 и 4,5 не превышало 50 %. В то же время состав Q4 практически не растворялся во всех вариантах сред.

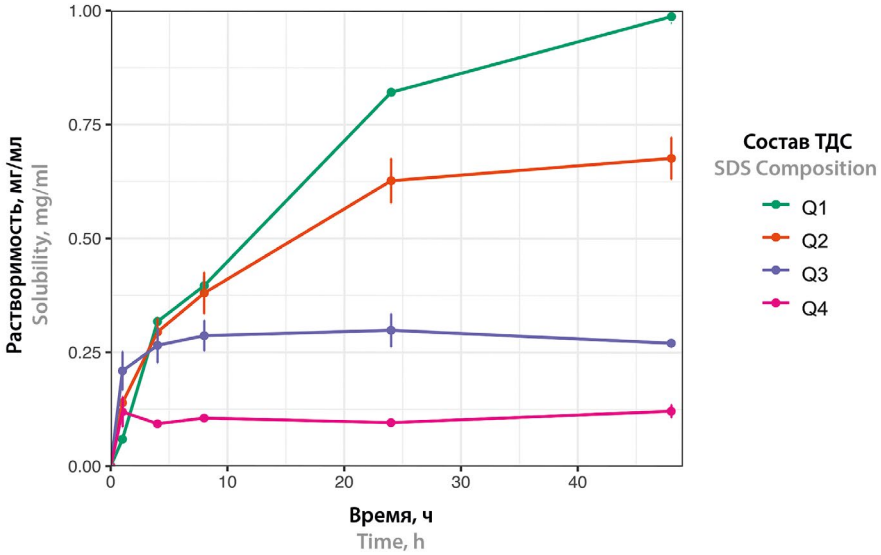


Рисунок 4. Изменение растворимости кверцетина в зависимости от соотношения с ПВПВА в составе ТДС

Figure 4. Solubility properties of quercetin according to ratio with PVPVA in SDS composition

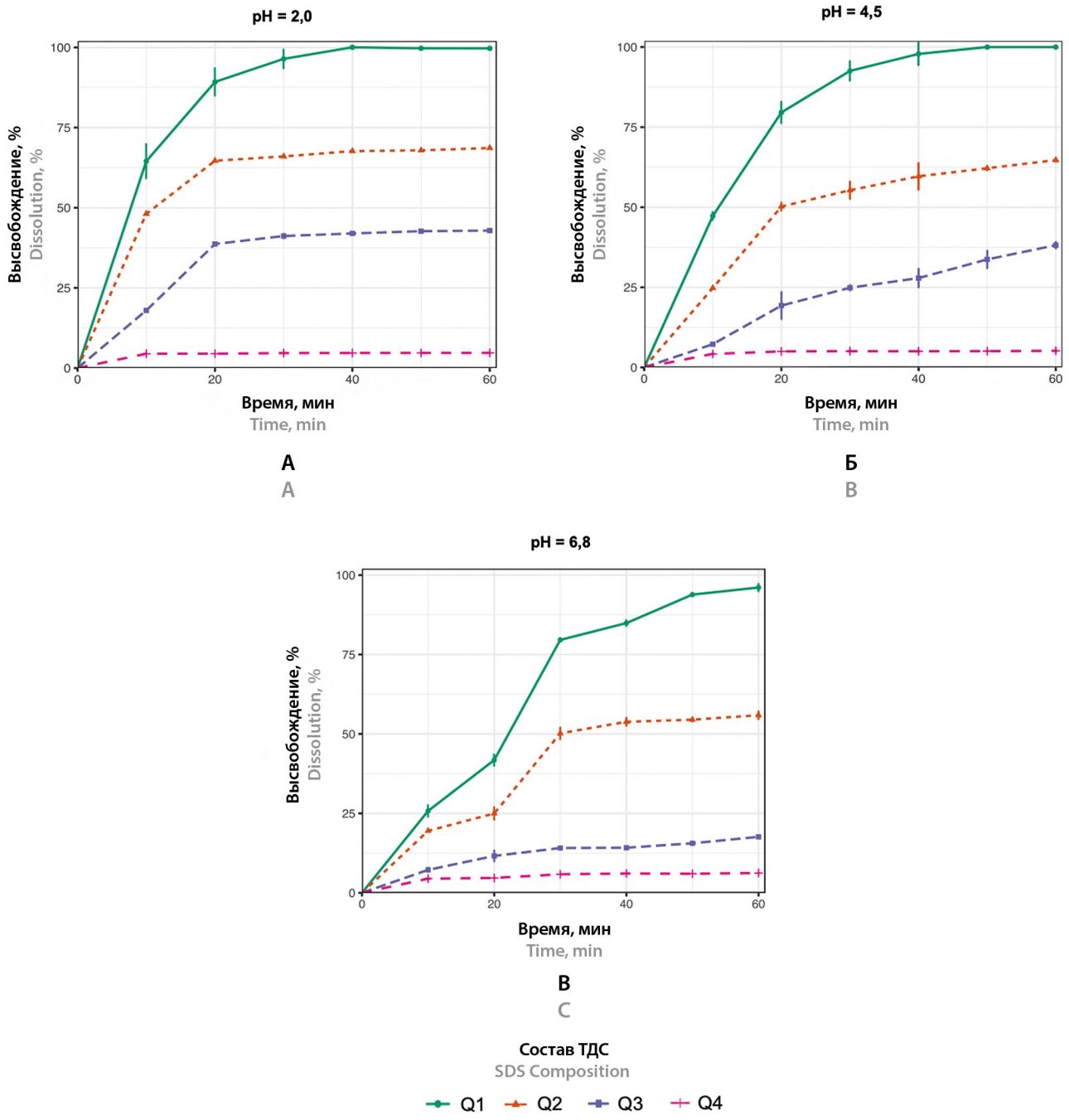


Рисунок 5. Кинетика высвобождения ТДС кверцетина в средах, моделирующих pH ЖКТ

Figure 5. Kinetic of quercetin dissolution in media modelling GI tract

Таким образом, наиболее перспективным составом ТДС кверцетина является Q1, который демонстрирует улучшенные свойства водной растворимости и растворения в средах ЖКТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для составов с концентрациями 1 и 5 % можно предположить частичную или полную аморфизацию кверцетина, что косвенно подтверждается результатами ДСК и ИК-Фурье-спектроскопии. Кроме того, расчет теоретических температур стеклования ТДС и сравнение с экспериментальными данными позволяют сделать вывод о получении однородной системы в составе с 1%-м содержанием активного вещества. Независимо от концентрации ПВПВА в ТДС для всех составов отмечено улучшение свойств растворимости и скорости растворения кверцетина по сравнению с чистой субстанцией. Наилучшая скорость и полнота высвобождения в средах с pH, характерным для разных отделов ЖКТ, отмечалась для 1%-го состава.

Таким образом, растворимость кверцетина в составе 1%-й ТДС относительно исходной АФС увеличена в 353 раза.

На основании проведенного исследования твердая дисперсия, содержащая 1 % кверцетина, на основе поливинилпирролидон-винилацетата является наиболее перспективной для дальнейшей разработки готовых лекарственных форм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lv H.-W., Wang Q.-L., Luo M., Zhu M.-D., Liang H.-M., Li W.-J., Cai H., Zhou Z.-B., Wang H., Tong S.-Q., Li X.-N. Phytochemistry and pharmacology of natural prenylated flavonoids. *Archives of Pharmacal Research*. 2023;46(4):207–272. DOI: 10.1007/s12272-023-01443-4.
2. Wang X., Ma Y., Xu Q., Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., Flisyuk E. V., Liu M., Li H., Vargas-Murga L., Duez P. Flavonoids and saponins: What have we got or missed? *Phytomedicine*. 2023;109:154580. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154580.
3. Russo C., Maugeri A., Musumeci L., De Sarro G., Cirmi S., Navarra M. Inflammation and Obesity: The Pharmacological Role of Flavonoids in the Zebrafish Model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(3):2899. DOI: 10.3390/ijms24032899.
4. Pawar A., Russo M., Rani I., Goswami K., Russo G. L., Pal A. A critical evaluation of risk to reward ratio of quercetin supplementation for COVID-19 and associated comorbid conditions. *Phytotherapy Research*. 2022;36(6):2394–2415. DOI: 10.1002/ptr.7461.
5. Степанова Э. Ф., Ремезова И. П., Шевченко А. М., Морозов А. В., Мальцева В. К. Флебопротекторы на базе флавоноидов: лекарственные формы, биофармацевтическая характеристика, технологические особенности. *Фармация и фармакология*. 2020;8(6):405–415. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-6-405-415.
6. Liu X., Zhao L., Wu B., Chen F. Improving solubility of poorly water-soluble drugs by protein-based strategy: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023;634:122704. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122704.
7. Данилова А. А., Гусев К. А., Маймистов Д. Н., Флисюк Е. В. Технология экструзии горячего расплава как современная стратегия улучшения биодоступности флавоноидов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2024;58(2):26–35. DOI 10.30906/0023-1134-2024-58-2-26-35.
8. Berga M., Logviss K., Lauberte L., Paulausks A., Mohylyuk V. Flavonoids in the Spotlight: Bridging the Gap between Physicochemical Properties and Formulation Strategies. *Pharmaceuticals*. 2023;16(10):1407. DOI: 10.3390/ph16101407.
9. Гусев К. А., Маймистов Д. Н., Павловский В. И., Алиев А. Р., Павловский А. В., Иванова О. В., Цыренов Д. О., Флисюк Е. В. Разработка состава и технологии получения твердой дисперсной системы методом экструзии горячего расплава для повышения биодоступности действующего вещества. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):108–115. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-108-115.
10. Гусев К. А., Алиев А. Р., Генералова Ю. Э., Аксенова Н. А., Речкалов Г. В., Маймистов Д. Н., Алексеева Г. М., Флисюк Е. В. Разработка состава и технологии получения аморфной твердой дисперсной системы эбастина методом экструзии горячего расплава для увеличения скорости растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):126–135. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1577.
11. Tong M., Wu X., Zhang S., Hua D., Li S., Yu X., Wang J., Zhang Z. Application of TPGS as an efflux inhibitor and a plasticizer in baicalein solid dispersion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;168:106071. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.106071.
12. Khor C. M., Ng W. K., Kanaujia P., Chan K. P., Dong Y. Hot-melt extrusion microencapsulation of quercetin for taste-masking. *Journal of Microencapsulation*. 2017;34(1):29–37. DOI: 10.1080/02652048.2017.1280095.
13. Ishimoto K., Shimada Y., Ohno A., Otani S., Ago Y., Maeda S., Lin B., Nunomura K., Hino N., Suzuki M., Nakagawa S. Physicochemical and biochemical evaluation of amorphous solid dispersion of naringenin prepared using hot-melt extrusion. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9:850103. DOI: 10.3389/fnut.2022.850103.
14. Truzzi F., Tibaldi C., Zhang Y., Dinelli G., D'Amen E. An overview on dietary polyphenols and their biopharmaceutical classification system (BCS). *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):5514. DOI: 10.3390/ijms22115514.
15. Golonka I., Wilk S., Musiał W. The influence of UV radiation on the degradation of pharmaceutical formulations containing quercetin. *Molecules*. 2020;25(22):5454. DOI: 10.3390/molecules25225454.
16. Mathers A., Pechar M., Hassouna F., Fulem M. API solubility in semi-crystalline polymer: Kinetic and thermodynamic phase behavior of PVA-based solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;623:121855. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.121855.
17. Rosiak N., Wdowiak K., Tykarska E., Cielecka-Piontek J. Amorphous solid dispersion of hesperidin with polymer excipients for enhanced apparent solubility as a more effective approach to the treatment of civilization diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(23):15198. DOI: 10.3390/ijms232315198.
18. Dengale S. J., Hussen S. S., Krishna B. S. M., Musmade P. B., Gautham Shenoy G., Bhat K. Fabrication, solid state characterization and bioavailability assessment of stable binary amorphous phases of Ritonavir with Quercetin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;89:329–338. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.12.025.
19. Garbiec E., Rosiak N., Zalewski P., Tajber L., Cielecka-Piontek J. Genistein co-amorphous systems with amino acids: An investigation into enhanced solubility and biological activity. *Pharmaceutics*. 2023;15(12):2653. DOI: 10.3390/pharmaceutics15122653.
20. Wdowiak K., Tajber L., Miklaszewski A., Cielecka-Piontek J. Sweeteners Show a Plasticizing Effect on PVP K30—A Solution for the Hot-Melt Extrusion of Fixed-Dose Amorphous Curcumin-Hesperetin Solid Dispersions. *Pharmaceutics*. 2024;16(5):659. DOI: 10.3390/pharmaceutics16050659.
21. Gordon M., Taylor J. S. Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. i. non-crystalline copolymers. *Journal of Applied Chemistry*. 1952;493–500. DOI: 10.1002/jctb.5010020901.
22. Letinski D. J., Redman A. D., Birch H., Mayer P. Inter-laboratory comparison of water solubility methods applied to difficult-to-test substances. *BMC Chemistry*. 2021;15:52. DOI: 10.1186/s13065-021-00778-7.
23. Kapourani A., Vardaka E., Katopodis K., Kachrimanis K., Barmpalexis P. Crystallization tendency of APIs possessing different thermal and glass related properties in amorphous solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;579:119149. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119149.
24. Browne E., Worku Z. A., Healy A. M. Physicochemical properties of poly-vinyl polymers and their influence on ketoprofen amorphous solid dispersion performan-

ce: a polymer selection case study. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):433. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050433.
25. Kandemir K., Tomas M., McClements D. J., Capanoglu E. Recent advances on the improvement of quercetin bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*. 2022;119:192–200. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.11.032.

REFERENCES

1. Lv H.-W., Wang Q.-L., Luo M., Zhu M.-D., Liang H.-M., Li W.-J., Cai H., Zhou Z.-B., Wang H., Tong S.-Q., Li X.-N. Phytochemistry and pharmacology of natural prenylated flavonoids. *Archives of Pharmacal Research*. 2023;46(4):207–272. DOI: 10.1007/s12272-023-01443-4.
2. Wang X., Ma Y., Xu Q., Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., Flisyuk E. V., Liu M., Li H., Vargas-Murga L., Duez P. Flavonoids and saponins: What have we got or missed? *Phytomedicine*. 2023;109:154580. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154580.
3. Russo C., Maugeri A., Musumeci L., De Sarro G., Cirmi S., Navarra M. Inflammation and Obesity: The Pharmacological Role of Flavonoids in the Zebrafish Model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(3):2899. DOI: 10.3390/ijms24032899.
4. Pawar A., Russo M., Rani I., Goswami K., Russo G. L., Pal A. A critical evaluation of risk to reward ratio of quercetin supplementation for COVID-19 and associated comorbid conditions. *Phytotherapy Research*. 2022;36(6):2394–2415. DOI: 10.1002/ptr.7461.
5. Stepanova E. F., Remezova I. P., Shevchenko A. M., Morozov A. V., Maltseva V. K. Phleboprotectors based on flavonoids: dosage forms, biopharmaceutical characteristics, technological features. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(6):405–415. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-6-405-415.
6. Liu X., Zhao L., Wu B., Chen F. Improving solubility of poorly water-soluble drugs by protein-based strategy: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023;634:122704. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122704.
7. Danilova A. A., Gusev K. A., Maimistov D. N., Flisyuk E. V. Hot Melt Extrusion Technology as a Modern Strategy for Improving the Bioavailability of Flavonoids. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2024;58(2):26–35. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2024-58-2-26-35
8. Berga M., Logviss K., Lauberte L., Paulausks A., Mohylyuk V. Flavonoids in the Spotlight: Bridging the Gap between Physicochemical Properties and Formulation Strategies. *Pharmaceuticals*. 2023;16(10):1407. DOI: 10.3390/ph16101407.
9. Gusev K. A., Maimistov D. N., Pavlovsky V. I., Aliev A. R., Pavlovsky A. V., Ivanova O. V., Tsyrenov D. O., Flisyuk E. V. Development of the Composition and Technology for Production a Solid Dispersion System by Hot Melt Extrusion to Increase the Bioavailability of the Active Substance. *Drug development & registration*. 2022;11(4):108–115. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-108-115.
10. Gusev K. A., Aliev A. R., Generalova Yu. E., Aksenova N. A., Rechkalov G. V., Maimistov D. N., Alekseeva G. M., Flisyuk E. V. Composition and Technology Development for Obtaining Amorphous Solid Dispersion of Ebastine by Hot Melt Extrusion to Increase Dissolution Rate. *Drug development & registration*. 2023;12(4):126–135. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1577.
11. Tong M., Wu X., Zhang S., Hua D., Li S., Yu X., Wang J., Zhang Z. Application of TPGS as an efflux inhibitor and a plasticizer in baicalein solid dispersion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;168:106071. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.106071.
12. Khor C. M., Ng W. K., Kanaujia P., Chan K. P., Dong Y. Hot-melt extrusion microencapsulation of quercetin for taste-masking. *Journal of Microencapsulation*. 2017;34(1):29–37. DOI: 10.1080/02652048.2017.1280095.
13. Ishimoto K., Shimada Y., Ohno A., Otani S., Ago Y., Maeda S., Lin B., Nunomura K., Hino N., Suzuki M., Nakagawa S. Physicochemical and biochemical evaluation of amorphous solid dispersion of naringenin prepared using hot-melt extrusion. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9:850103. DOI: 10.3389/fnut.2022.850103.
14. Truzzi F., Tibaldi C., Zhang Y., Dinelli G., D'Amen E. An overview on dietary polyphenols and their biopharmaceutical classification system (BCS). *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):5514. DOI: 10.3390/ijms22115514.
15. Golonka I., Wilk S., Musiał W. The influence of UV radiation on the degradation of pharmaceutical formulations containing quercetin. *Molecules*. 2020;25(22):5454. DOI: 10.3390/molecules25225454.
16. Mathers A., Pechar M., Hassouna F., Fulem M. API solubility in semi-crystalline polymer: Kinetic and thermodynamic phase behavior of PVA-based solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;623:121855. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.121855.
17. Rosiak N., Wdowiak K., Tykarska E., Cielecka-Piontek J. Amorphous solid dispersion of hesperidin with polymer excipients for enhanced apparent solubility as a more effective approach to the treatment of civilization diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(23):15198. DOI: 10.3390/ijms232315198.
18. Dengale S. J., Hussen S. S., Krishna B. S. M., Musmade P. B., Gautham Shenoy G., Bhat K. Fabrication, solid state characterization and bioavailability assessment of stable binary amorphous phases of Ritonavir with Quercetin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;89:329–338. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.12.025.
19. Garbiec E., Rosiak N., Zalewski P., Tajber L., Cielecka-Piontek J. Genistein co-amorphous systems with amino acids: An investigation into enhanced solubility and biological activity. *Pharmaceutics*. 2023;15(12):2653. DOI: 10.3390/pharmaceutics15122653.
20. Wdowiak K., Tajber L., Miklaszewski A., Cielecka-Piontek J. Sweeteners Show a Plasticizing Effect on PVP K30—A Solution for the Hot-Melt Extrusion of Fixed-Dose Amorphous Curcumin-Hesperetin Solid Dispersions. *Pharmaceutics*. 2024;16(5):659. DOI: 10.3390/pharmaceutics16050659.
21. Gordon M., Taylor J. S. Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. i. non-crystalline copolymers. *Journal of Applied Chemistry*. 1952;493–500. DOI: 10.1002/jctb.5010020901.
22. Letinski D. J., Redman A. D., Birch H., Mayer P. Inter-laboratory comparison of water solubility methods applied to difficult-to-test substances. *BMC Chemistry*. 2021;15:52. DOI: 10.1186/s13065-021-00778-7.
23. Kapourani A., Vardaka E., Katopodis K., Kachrimanis K., Barmpalexis P. Crystallization tendency of APIs possessing different thermal and glass related properties in amorphous solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;579:119149. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119149.
24. Browne E., Worku Z. A., Healy A. M. Physicochemical properties of poly-vinyl polymers and their influence on ketoprofen amorphous solid dispersion performance: a polymer selection case study. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):433. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050433.
25. Kandemir K., Tomas M., McClements D. J., Capanoglu E. Recent advances on the improvement of quercetin bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*. 2022;119:192–200. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.11.032.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.453.6; 615.014.21; 615.225.2

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1883

Check for updates

CC BY 4.0

Технологические подходы к повышению биодоступности труднорастворимой субстанции кандесартана цилексетила в мини-таблетках

К. М. Церковная✉, Е. С. Сурбеева, К. А. Гусев, Е. В. Вишняков, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич

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

✉ **Контактное лицо:** Церковная Ксения Михайловна. **E-mail:** ksenia.kirillova@spcpu.ru

ORCID: К. М. Церковная – https://orcid.org/0000-0001-5047-0295;
Е. С. Сурбеева – https://orcid.org/0000-0002-7005-2477;
К. А. Гусев – https://orcid.org/0000-0003-1922-3282;
Е. В. Вишняков – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866;
Е. В. Флисюк – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462;
И. А. Наркевич – https://orcid.org/0000-0002-5483-6626.

Статья поступила: 26.07.2024 **Статья принята в печать:** 16.12.2024 **Статья опубликована:** 20.12.2024

Резюме

Введение. В ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России проводится разработка полипилла в виде твердой желатиновой капсулы, содержащей мини-таблетки оригинальной антигипертензивной комбинации. Одним из компонентов полипилла выступает кандесартан, обладающий высокой антигипертензивной активностью и выраженными органопротективными свойствами. Учитывая, что активная фармацевтическая субстанция (АФС) кандесартана цилексетила характеризуется низкой растворимостью в воде и средах желудочно-кишечного тракта, увеличение растворимости данной субстанции способно привести к существенному повышению ее биодоступности.

Цель. Сравнительный анализ технологических подходов к повышению биодоступности труднорастворимой АФС кандесартана цилексетила в лекарственной форме мини-таблетки.

Материалы и методы. Для проведения исследования использовали АФС кандесартана цилексетила, β-циклодекстрин (β-ЦД), сополимер поливинилпирролидона и винилацетата, а также вспомогательные вещества для получения мини-таблеток, выполняющие функции наполнителей, связующего вещества, дезинтегранта, опудривающего компонента. Оценку профилей высвобождения кандесартана цилексетила из разработанных мини-таблеток проводили в сравнении с оригинальным препаратом Атаканд®, таблетки, 8 мг. Комплекс кандесартана цилексетила с β-ЦД в соотношении 1:1 получали тремя методами: сухого смешения, методом пасты и лиофилизацией. Твердую дисперсную систему (ТДС) кандесартана получали методом экструзии горячего расплава. Полученные комплексы АФС с β-ЦД и ТДС характеризовали методами ИК-Фурье-спектрометрии и дифференциальной сканирующей калориметрии. Таблеточные смеси получали методом сухого смешения и технологией влажного гранулирования. Мини-таблетки прессовали на лабораторном автоматическом однопуансонном таблеточном прессе. Контроль качества полученных мини-таблеток осуществляли по методикам Государственной фармакопеи РФ XV издания и Американской фармакопеи.

Результаты и обсуждение. В ходе сравнительного анализа технологических подходов к повышению биодоступности кандесартана цилексетила установлено, что создание комплекса включения АФС с β-ЦД в соотношении 1:1 методом пасты с последующим применением технологии влажного гранулирования позволило получить мини-таблетки с улучшенным высвобождением труднорастворимой АФС по сравнению с оригинальным препаратом. Напротив, применение ТДС в технологии мини-таблеток привело к замедлению высвобождения АФС в сравнении с оригинальным препаратом. Разработанные мини-таблетки кандесартана состава № 7 по всем показателям качества соответствовали фармакопейным требованиям.

Заключение. Создание комплекса включения АФС с β-ЦД методом пасты с последующим применением технологии влажного гранулирования является оптимальным технологическим подходом к повышению биодоступности труднорастворимой АФС кандесартана цилексетила в мини-таблетках.

Ключевые слова: кандесартана цилексетил, биодоступность, циклодекстрины, твердая дисперсная система, мини-таблетки, полипилл, артериальная гипертензия

© Церковная К. М., Сурбеева Е. С., Гусев К. А., Вишняков Е. В., Флисюк Е. В., Наркевич И. А., 2025
© Tserkovnaya K. M., Surbeeva E. S., Gusev K. A., Vishnyakov E. V., Flisyuk E. V., Narkevich I. A., 2025

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

Вклад авторов. К. М. Церковная, Е. В. Флисюк и И. А. Наркевич спланировали эксперимент. К. М. Церковная выполнила технологическую часть экспериментальных работ. К. А. Гусев получил твердую дисперсную систему методом экструзии горячего расплава. Е. С. Сурбеева провела ВЭЖХ-анализ мини-таблеток. Е. В. Вишняков провел анализ полученных комплексов методом ИК-спектроскопии. К. М. Церковная, Е. С. Сурбеева, К. А. Гусев, Е. В. Вишняков участвовали в обработке данных и написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования (ЦКП) «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России».

Для цитирования: Церковная К. М., Сурбеева Е. С., Гусев К. А., Вишняков Е. В., Флисюк Е. В., Наркевич И. А. Технологические подходы к повышению биодоступности труднорастворимой субстанции кандесартана цилексетила в мини-таблетках. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):138–149. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1883

Technological approaches to improve the bioavailability of the poor soluble substance Candesartan Cilexetil in mini-tablets

Ksenia M. Tserkovnaya✉, Elizaveta S. Surbeeva, Konstantin A. Gusev, Evgeniy V. Vishnyakov, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narkevich

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

✉ **Corresponding author:** Ksenia M. Tserkovnaya. **E-mail:** ksenia.kirillova@spcpu.ru

ORCID: Ksenia M. Tserkovnaya – https://orcid.org/0000-0001-5047-0295;
Elizaveta S. Surbeeva – https://orcid.org/0000-0002-7005-2477;
Konstantin A. Gusev – https://orcid.org/0000-0003-1922-3282;
Evgeniy V. Vishnyakov – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866;
Elena V. Flisyuk – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462;
Igor A. Narkevich – https://orcid.org/0000-0002-5483-6626.

Received: 26.07.2024 **Accepted:** 16.12.2024 **Published:** 20.12.2024

Abstract

Introduction. The polypill in the form of a hard gelatin capsule containing mini-tablets of the original antihypertensive combination is being developed at the Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. One of the components of the polypill is Candesartan, which has high antihypertensive activity and organoprotective properties. The active pharmaceutical ingredient (API) of Candesartan Cilexetil is characterized by low solubility in water and gastrointestinal tract media, therefore increasing the solubility of this substance can lead to a significant improving the bioavailability.

Aim. Comparative analysis of technological approaches to increasing the bioavailability of the poor soluble API Candesartan Cilexetil in a mini-tablet dosage form.

Materials and methods. API Candesartan Cilexetil, β-cyclodextrin (β-CD), copolymer of polyvinylpyrrolidone and vinyl acetate and excipients for the production of mini-tablets, such as diluents, binders, disintegrant, dusting components were used. The release profiles of Candesartan Cilexetil from the developed mini-tablets were assessed in comparison with the original drug Atacand®, 8 mg tablets. The complex of candesartan cilexetil with β-CD in a 1:1 ratio was prepared by three methods: dry mixing, paste method and lyophilization. A solid dispersion (SD) of candesartan was obtained by hot melt extrusion. The API complexes with β-CD and SD were characterized by FTIR-spectroscopy and differential scanning calorimetry. Tablet mixtures were produced by dry mixing and wet granulation technology. Mini-tablets were obtained on a laboratory automatic single-punch tablet press. Quality control of the mini-tablets was conducted by the methods of State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV ed. and United State Pharmacopeia methods.

Results and discussion. Comparative analysis of technological approaches to increasing the bioavailability of Candesartan Cilexetil showed, that preparation of a complex including API with β-CD in a 1:1 ratio using the paste method with further using of wet granulation technology allowed to obtain mini-tablets with improved release of poor soluble API compared to the original drug. On the contrary, the use of TDS in mini-tablet technology led to a slower release of API compared to the original drug. The developed mini-tablets of Candesartan composition № 7 met pharmacopoeial requirements by all acceptance criteria.

Conclusion. The creation of complex of Candesartan Cilexetil with β-CD by the paste method with further using of wet granulation technology is the optimal technological approach to increasing the bioavailability of the poor soluble API Candesartan Cilexetil in mini-tablets.

Keywords: Candesartan Cilexetil, bioavailability, cyclodextrins, solid dispersion, mini-tablets, polypill, arterial hypertension

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

Contribution of the authors. Ksenia M. Tserkovnaya, Elena V. Flisyuk and Igor A. Narkevich developed the experiment. Ksenia M. Tserkovnaya carried out the technological part of the experiment. Konstantin A. Gusev produced solid dispersion by hot melt extrusion. Elizaveta S. Surbeeva performed the HPLC analysis of mini-tablets. Evgeniy V. Vishnyakov performed the FTIR-spectroscopy of complexes. Ksenia M. Tserkovnaya, Elizaveta S. Surbeeva, Konstantin A. Gusev and Evgeniy V. Vishnyakov participated in data processing and in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The work was carried out on the basis of the Center for Collective Use (CCU) "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University".

For citation: Tserkovnaya K. M., Surbeeva E. S., Gusev K. A., Vishnyakov E. V., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Technological approaches to improve the bioavailability of the poor soluble substance Candesartan Cilexetil in mini-tablets. *Drug development & registration*. 2025;14(1):138–149. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1883

ВВЕДЕНИЕ

Важным вопросом фармацевтической технологии является повышение растворимости активных фармацевтических субстанций (АФС), поскольку их биодоступность и эффективность в значительной степени определяется их способностью к растворению. Данное утверждение особенно актуально для субстанций, относящихся ко II классу по биофармацевтической классификационной системе (БКС), так как они обладают низкой растворимостью, но высокой мембранной проницаемостью [1, 2]. Для улучшения растворимости таких АФС применяются различные химические, физические, физико-химические методы и базирующиеся на них технологические приемы [1–4].

Одним из широко используемых и представляющих научный и практический интерес способов повышения биодоступности труднорастворимых веществ является комплексообразование с циклодекстринами (ЦД) [5–7]. ЦД, как нативные, так и модифицированные, обладают способностью образовывать комплексы включения с различными органическими молекулами путем молекулярной инкапсуляции, что приводит к повышению растворимости и стабильности АФС [5, 8].

Другим актуальным технологическим приемом, направленным на повышение растворимости АФС, выступает создание твердых дисперсных систем (ТДС). ТДС – это система, в которой субстанция либо растворяется в расплавленном носителе, образуя твердый раствор за счет нагрева до температуры, близкой к температуре плавления и энергии механического сдвига, либо равномерно диспергируется с носителем, при этом разупорядочение кристаллических фаз способствует ускорению процесса растворения [4, 9, 10].

В ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России проводится разработка полипилла в виде твердой желатиновой капсулы, содержащей мини-таблетки оригинальной антигипертензивной комбинации [11]. Одним из компонентов полипилла выступает кандесартан – представитель класса блокаторов рецепторов ангиотензина II, обладающий доказанным антигипертензивным действием и уменьшающий выраженность поражения органов-мишеней при артериальной гипертензии, таких как гипертрофия миокарда левого желудочка и нефропатия [12–14]. Следует отметить, что АФС кандесартана цилексетила относится ко II классу по БКС, а значит, увеличение растворимости данной субстанции способно привести к существенному повышению ее биодоступности.

Целью данного исследования стало проведение сравнительного анализа технологических подходов к повышению биодоступности труднорастворимой АФС кандесартана цилексетила в лекарственной форме (ЛФ) мини-таблетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Для проведения исследования использовали АФС кандесартана цилексетила (Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd., Китай); β-циклодекстрин (β-ЦД) марки KLEPTOSE® DC (ROQUETTE, Франция); сополимер поливинилпирролидона (ПВП) и винилацетата в соотношении 60:40 марки VIVAPHARM® PVP/VA 64 (далее – PVP/VA 64) (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия); лактозы моногидрат марок Tablettose® 80 (MEGGLE AG, Германия) и Pharmatose® 200M (DFE Pharma, Германия); микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) марок VIVAPUR® 102 и VIVAPUR® 200 (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия); кальция гидрофосфат безводный марки Fujicalin® (Fuji Chemical Industries Co., Ltd., Япония); ПВП К-30 марки Bovidone K30 (Huangshan Bonsun Pharmaceuticals Co., Ltd., Китай); кармеллозу кальция марки Swellcal® (Patel Chem Specialities Pvt. Ltd., Индия); магния стеарат (ООО «ХИМСТАБ», Россия).

Оценку профилей высвобождения кандесартана цилексетила из разработанных мини-таблеток проводили в сравнении с оригинальным препаратом

Атаканд®, таблетки, 8 мг (AstraZeneca AB, Швеция, серия NBCZ).

На момент проведения исследования все материалы обладали неистекшим сроком годности.

Методы

Методики получения комплекса с β-ЦД. Комплекс кандесартана цилексетила с β-ЦД в соотношении 1:1 получали тремя методами: сухого смешения, замешивания пастообразной смеси (метод пасты) и лиофилизацией.

Сухое смешение β-ЦД и АФС проводили в лабораторном смесителе типа «пьяная бочка» многофункциональной лабораторной установки DGN-II (Shanghai Unique Machinery Technology Co., Ltd., Китай) в течение 20 мин при скорости вращения 45 об/мин.

Для получения комплекса методом пасты в ступку отвешивали 1 часть β-ЦД, по каплям добавляли 0,5 части воды очищенной с целью частичного растворения β-ЦД и образования пасты, далее вводили 1 часть субстанции кандесартана цилексетила и тщательно перемешивали в течение 20–30 мин. Полученную пасту высушивали в сушильном шкафу с принудительной конвекцией OF-12G (JEIO TECH, Корея) при температуре 60 °С до остаточной влажности (2,5 ± 0,5) %.

Для получения комплекса методом лиофильной сушки проводили следующие технологические операции. β-ЦД растворяли в воде очищенной, нагретой до температуры 50–60 °С, в соотношении 1:20. Одновременно с получением истинного водного раствора β-ЦД получали водную суспензию кандесартана цилексетила в соотношении 1:30. Далее к полученной суспензии кандесартана по частям вводили водный раствор β-ЦД, гомогенизировали. Полученную суспензию подвергали лиофилизации в лиофильной сушилке FreeZone 4.5 L –50 °С (Labconco, США). Процесс включал 3 этапа:

- замораживание суспензии при температуре –50 °С в течение суток;
- первичную сушку (сублимация в вакууме) с целью удаления свободной воды;
- вторичную сушку (вакуумная десорбция) с целью удаления связанной воды.

Далее полученный лиофилизат просеивали через сито с диаметром отверстий 0,5 мм.

Методика получения ТДС. Для получения 30%-й ТДС кандесартана цилексетила АФС и полимер-носитель (PVP/VA 64), взятые в соотношении 3:7, смешивали в лабораторном смесителе типа «пьяная бочка» при скорости вращения 45 об/мин в течение 20 мин, далее проводили экструзию горячего расплава в двухшнековом лабораторном экструдере с сонаправленным вращением шнеков HAAKE™ MiniCTW (Thermo Fisher Scientific, Германия) при температуре 135 °С, согласно методике, описанной в статье К. А. Гусева и соавторов [15].

Полученные комплексы АФС с β-ЦД и ТДС характеризовали с помощью ИК-Фурье-спектрометра с НПВО-приставкой Spectrum 3 (PerkinElmer, США) и дифференциального сканирующего калориметра DSC 3+ (METTLER TOLEDO, Швейцария).

Получение мини-таблеток. Таблеточные смеси получали методом сухого смешения и технологией влажного гранулирования. Сухое смешение компонентов таблеточных смесей (комплекс с β-ЦД / ТДС / АФС и вспомогательные вещества) осуществляли в лабораторном смесителе типа «пьяная бочка» в течение 20 мин при скорости вращения 45 об/мин. Далее проводили опудривание магния стеаратом в течение 5 мин при той же скорости вращения смесителя.

Гранулирование проводили в миксере-грануляторе с высоким усилием сдвига SMG3-6-1 (Chongqing Jinggong Pharmaceutical Machinery Co., Ltd., Китай) при скорости основной мешалки 120 об/мин и скорости чоппера 700 об/мин путем увлажнения водой очищенной в объеме 15–16 % от массы сухой смеси.

Влажный гранулят протирали через сито с диаметром отверстий 1,0 мм и подвергали высушиванию в сушильном шкафу с принудительной конвекцией при температуре 70 °С до остаточной влажности (1,5 ± 0,5) %. Сухой гранулят просеивали через сито с диаметром отверстий 1,0 мм и подвергали опудриванию дезинтегрантом кармеллозой кальция в количестве 1⁄2 от его массы и магния стеаратом в смесителе типа «пьяная бочка» в течение 5 мин при скорости вращения 45 об/мин. Решение применить комбинированный способ введения дезинтегранта (одну часть ввести в состав гранулята, а вторую вынести на стадию опудривания) было принято в связи с важностью улучшения высвобождения АФС в среду растворения [16].

Оценку сыпучести и насыпной плотности таблеточных смесей проводили на тестере сыпучести гранулированного материала ERWEKA GT и тестере насыпной плотности SVM 221 (ERWEKA GmbH, Германия) согласно методикам, описанным в Государственной фармакопее РФ XV издания[1].

Мини-таблетки кандесартана получали на лабораторном автоматическом однопуансонном таблеточном прессе C&C 600 Series, модель A (Beijing C&C Cambcavi Co., Ltd., Китай).

Контроль качества мини-таблеток осуществляли по соответствующим методикам Государственной фармакопеи РФ XV издания[2] с использованием следующего оборудования: весов аналитических с точностью 0,1 мг «Сартогосм» CE224-C (ООО «САРТОГОСМ», Россия); тестера твердости таблеток ERWEKA TBH 125 TDP (ERWEKA GmbH, Германия); тестера

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Доступно по: https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/10/gosudarstvennaya-farmakopeya-rossiyskoy-federatsii-xv-izdaniya. Дата обращения: 25.06.2024.

[2] Там же.

Таблица 1. Составы мини-таблеток кандесартана

Table 1. Composition of Candesartan mini-tablets

№ состава / Mixture number Вещество, мг / Ingredient, mg	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Кандесартана цилексетил Candesartan Cilexetil	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
β-ЦД β-CD	8,0	8,0	8,0	–	8,0	–	8,0	–	–	–	–
PVP/VA 64	–	–	–	–	–	–	–	18,7	18,7	18,7	18,7
Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	16,7	16,7	16,7	19,4	36,0	40,0	28,0	13,2	3,3	–	–
МКЦ MCC	16,7	16,7	16,7	19,4	10,8	14,8	9,4	13,2	13,2	13,3	11,8
Кальция гидрофосфат безводный Calcium hydrogen phosphate, anhydrous	16,9	16,9	16,9	19,5	–	–	–	13,2	13,2	13,4	11,9
Повидон К-30 Povidone K30	–	–	–	–	3,5	3,5	3,0	–	–	–	–
Кармеллоза кальция Carmellose Calcium	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	6,0	9,0
Магния стеарат Magnesium stearate	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6
Итого Total	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0	60,0	70,0	60,0	60,0	60,0

контроля истираемости таблеток ERWEKA TAR 220 (ERWEKA GmbH, Германия); тестера контроля распадаемости таблеток ERWEKA ZT 221 (ERWEKA GmbH, Германия); тестера растворения таблеток ERWEKA DT 626 (ERWEKA GmbH, Германия).

Проведение испытаний «Растворение» и «Количественное определение» для мини-таблеток кандесартана осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии согласно методикам, приведенным в статье «Candesartan Cilexetil Tablets» Американской фармакопеи[1], с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа с диодно-матричным детектором Shimadzu LC-20 (Shimadzu, Япония).

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи пакета Microsoft Office Excel (версия 16.42).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе разработки состава и технологии мини-таблеток кандесартана было проведено сравнение двух технологических подходов к повышению биодоступности АФС: образования комплекса включения с β-ЦД и получения ТДС методом экструзии горячего расплава.

Анализ современных научных публикаций и патентный поиск показали, что β-ЦД способны повышать биодоступность кандесартана цилексетила [17, 18]. Однако до настоящего времени не проводилось сравнения различных методов получения комплекса включения кандесартана с β-ЦД. Описаны ТДС кандесартана со следующими полимерами-носителями: полиэтиленгликолем-4000 (ПЭГ-4000), ПЭГ-6000, ПЭГ-8000 и ПВП К-30, ПВП К-90 [17, 18]. Благодаря способности значительно повышать растворимость различных АФС и относительно невысокой температуре плавления перспективным полимером-носителем для создания ТДС является сополимер ПВП и винилацетата [15]. Учитывая вышесказанное, получение ТДС кандесартана на основе сополимера ПВП и винилацетата и изучение ее свойств представляет научный интерес. Следует также отметить, что для кандесартана описаны технологии получения таблеток традиционных размеров, однако в литературе отсутствуют данные о технологических подходах к повышению биодоступности данной АФС в ЛФ мини-таблетки.

В ходе исследования был проведен сравнительный анализ 11 составов мини-таблеток кандесартана (таблица 1). Мини-таблетки составов № 1–4 получали технологией прямого прессования, при этом составы № 1–3 отличались методом получения комплекса включения АФС с β-ЦД в соотношении 1:1: состав № 1 – сухое смешение, состав № 2 – метод пасты, состав № 3 – лиофилизация. Мини-таблетки составов

[1] United State Pharmacopeia 46 – NF 41. Available at: https://www.webofpharma.com/2023/05/usp-2023-pdf-united-state-pharmacopeia.html. Accessed: 25.06.2024.

№ 5–7 получали технологией влажного гранулирования. Составы № 5 и № 7 содержали комплекс кандесартана с β-ЦД в соотношении 1:1, полученный методом пасты, но отличались массой мини-таблеток. Составы № 8–11 содержали ТДС кандесартана и PVP/VA 64 в соотношении 3:7, отличались содержанием дезинтегранта кармеллозы кальция и массой мини-таблеток. Для получения мини-таблеток на основе ТДС использовали технологию прямого прессования, так как таблеточные смеси обладали высокой сыпучестью и насыпной плотностью. Составы № 4 и № 6 не содержали β-ЦД и ТДС и использовались в качестве составов сравнения для анализа влияния технологических подходов на характер высвобождения АФС.

На первом этапе исследования важными задачами являлись: выбор оптимального метода получения комплекса включения с β-ЦД и изучение возможности применения технологии прямого прессования.

Комплексы включения АФС с β-ЦД в соотношении 1:1 смешивали со вспомогательными веществами и подвергали прямому прессованию. Изучение профилей высвобождения кандесартана из полученных мини-таблеток составов № 1–4 показало, что наилучшее высвобождение АФС показали мини-таблетки, содержащие комплекс включения с β-ЦД, полученный методом пасты (рисунок 1).

Однако, учитывая отсутствие сыпучести таблеточных смесей, что обозначено прочерком в таблице 2, и недостаточный процент высвобождения кандесартана из мини-таблеток, установлено, что метод прямого прессования не является рациональным, и необходим переход к технологии влажного гранулирования.

Таблица 2. Результаты изучения технологических свойств таблеточных смесей

Table 2. Results of the determination of technological characteristics of tablet mixtures

Показатель Characteristic name / № состава Mixture number	Сыпучесть при отсутствии перемешивания, с/100 г Flowability without mixing, s/100 g	Насыпная плотность, г/мл Bulk density, g/ml
1	–	0,321 ± 0,024
2	–	0,310 ± 0,035
3	–	0,337 ± 0,019
4	–	0,356 ± 0,027
5	2,8 ± 0,2	0,568 ± 0,042
6	2,3 ± 0,1	0,420 ± 0,034
7	3,1 ± 0,2	0,553 ± 0,038
8	0,5 ± 0,1	0,541 ± 0,029
9	0,4 ± 0,1	0,614 ± 0,045
10	0,6 ± 0,1	0,518 ± 0,036
11	0,7 ± 0,1	0,522 ± 0,039

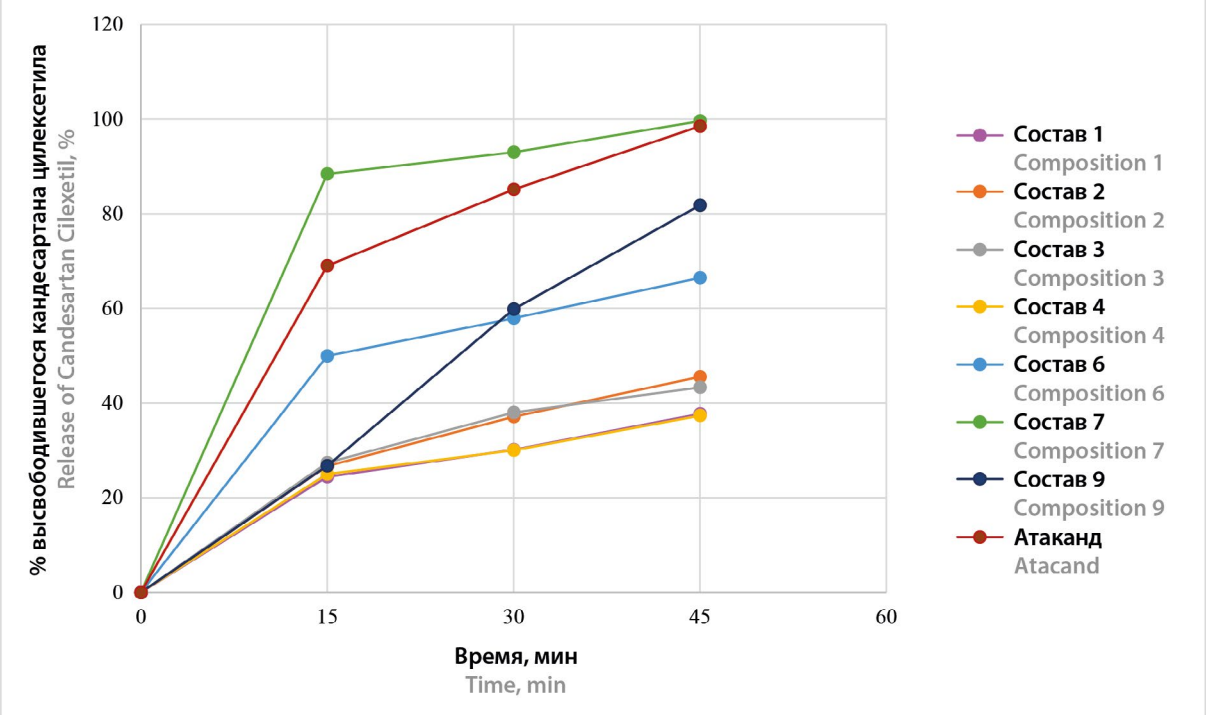


Рисунок 1. Профили высвобождения кандесартана цилексетила

Figure 1. Candesartan Cilexetil release profiles

С целью доказательства образования комплекса включения был охарактеризован ИК-Фурье-спектр комплекса, полученного методом пасты, в сравнении с АФС, β-ЦД и их механической смесью (рисунок 2). На ИК-спектре пасты исчезли характерные для кандесартана полосы при 1575 $см^{-1}$ (валентные колебания C═N, —N═N— и деформационные колебания NH), 1270 $см^{-1}$ (колебания C—O—C сложноэфирной группы) и 1118 $см^{-1}$ (валентные колебания C—O—C простой эфирной связи). Кроме того, наблюдается смещение сигнала при 1032 $см^{-1}$ и значительное уменьшение интенсивности сигнала при 989 $см^{-1}$ (ароматический фрагмент ═C—O—C—), а также снижение интенсивности в области менее 700 $см^{-1}$ (деформационные колебания C—H). Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод пасты позволяет получить комплекс включения кандесартана с β-ЦД за счет частичного включения во внутреннюю полость β-ЦД таких фрагментов молекулы АФС, как тетразол, бензодиазол и эфирные связи.

Комплекс включения с β-ЦД, полученный методом пасты, подвергали влажному гранулированию. По-лученный гранулят высушивали, просеивали, опудривали с получением таблеточной смеси состава № 5 (см. таблица 1). Для сравнения гранулированию подвергался состав, не содержащий β-ЦД (состав № 6, таблица 1). Таблеточные смеси анализировали по показателям сыпучести и насыпной плотности (см. таблица 2). Составы обладали удовлетворительными технологическими свойствами и могли быть использованы на следующей стадии технологического процесса – таблетировании.

Полученные при усилии прессования, равном 0,8–1,5 кН, мини-таблетки состава № 5 имели высоту (3,15 ± 0,02) мм, что превышало целевой диапазон значений, равный 2,70–3,00 мм. При этом прочность мини-таблеток составляла (135,2 ± 4,6) Н, следовательно, увеличение усилия прессования с целью уменьшения высоты мини-таблеток не являлось рациональной стратегией. В связи с чем было принято решение изменить массу мини-таблеток, содержащих комплекс включения с β-ЦД, с 70,0 мг до 60,0 мг путем уменьшения количества наполнителя лактозы моногидрата (состав № 7, таблица 1). Следует отметить, что усилие прессования для получения мини-таблеток массой 60,0 мг составляло 0,4–0,5 кН, что вдвое меньше усилия прессования, необходимого для получения мини-таблеток массой 70,0 мг, что в дальнейшем будет способствовать снижению вероятности износа пресс-инструмента. Установлено, что уменьшение массы мини-таблеток позволило достичь целевой высоты – (2,93 ± 0,01) мм, снизить прочность на раздавливание до (76,6 ± 5,8) Н при сохранении низкого процента истираемости – 0,03 %.

Анализ профилей высвобождения кандесартана (рисунок 1) показал, что создание комплекса включения с β-ЦД и использование технологии влажного гранулирования (состав № 7) позволяют повысить высвобождение АФС из мини-таблеток почти на 20 %

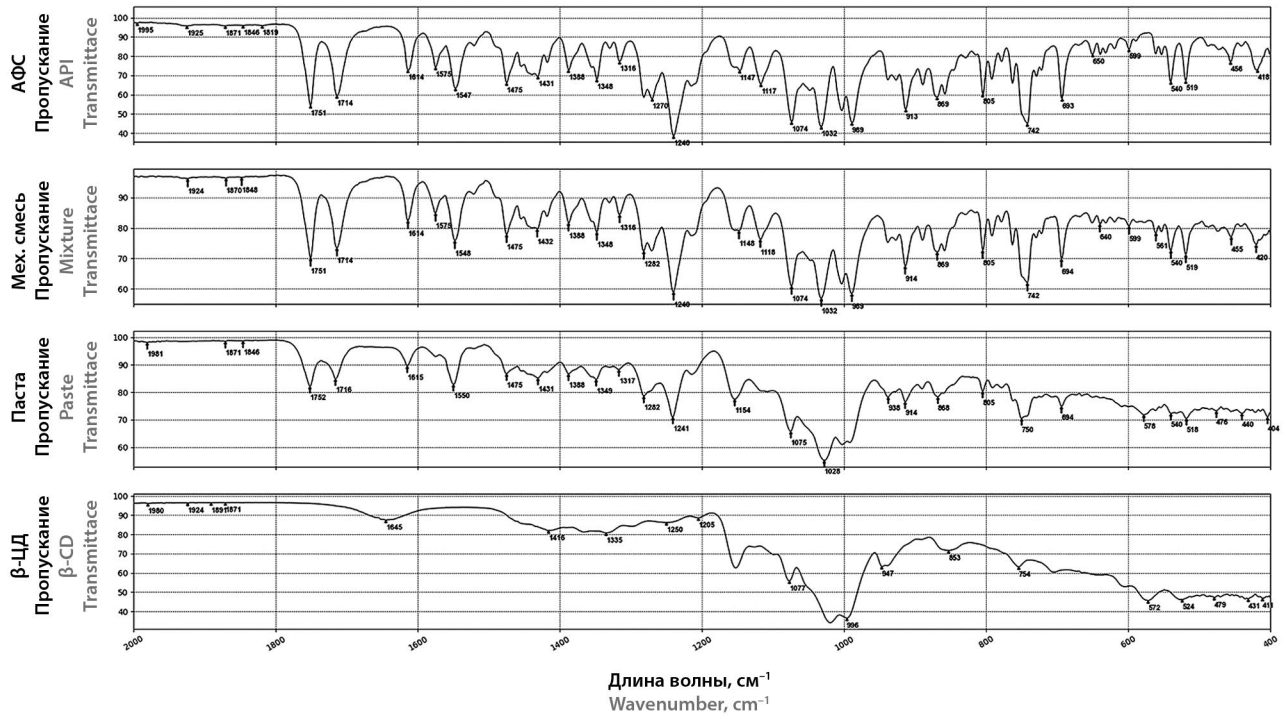


Рисунок 2. ИК-Фурье-спектры кандесартана цилексетила; механической смеси АФС и β-ЦД; комплекса, полученного методом пасты; β-ЦД

Figure 2. FTIR-spectra of Candesartan Cilexetil; mixture of API and β-CD; paste-complex; β-CD

в первой временной точке по сравнению с оригинальным препаратом. Установлено, что влажное гранулирование состава № 7, содержащего комплекс включения с β-ЦД, приводит к значительному улучшению высвобождения кандесартана по сравнению с составом № 6, полученным аналогичной технологией, но не содержащим β-ЦД.

Кроме того, в результате анализа профилей высвобождения доказано, что присутствие воды способствует комплексообразованию с β-ЦД. Так, процент высвобождения кандесартана через 45 мин из мини-таблеток состава № 2, полученных технологией прямого прессования, вдвое меньше, чем из мини-таблеток состава № 7, полученных технологией влажного гранулирования, несмотря на то, что оба состава содержали комплекс включения с β-ЦД, образованный методом пасты. Данное явление можно объяснить тем, что во время влажной грануляции продолжался процесс включения молекул АФС во внутреннюю полость молекулы β-ЦД благодаря подаче воды очищенной.

Для оценки возможности применения экструзии горячего расплава для создания ТДС с целью улучшения биодоступности кандесартана цилексетила были изучены термические свойства кандесартана методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (рисунок 3). Согласно полученным результатам, АФС плавится при температуре 172,45 °С с последующим разложением. Начало эффекта плавления происходит при температуре 165,12 °С. Следовательно, рекомендуемая температура процесса экструзии не должна превышать 160 °С.

АФС и полимер-носитель смешивали и методом экструзии горячего расплава при температуре 135 °С получали 30 % ТДС, которую анализировали методами ДСК и ИК-Фурье-спектроскопии.

Согласно результатам ДСК (см. рисунок 3) в твердой дисперсии кандесартана наблюдается два термических эффекта: при температуре 71,44 °С происходит стеклование твердой дисперсии, при последующем нагреве до температуры 141,42 °С происходит плавление ТДС.

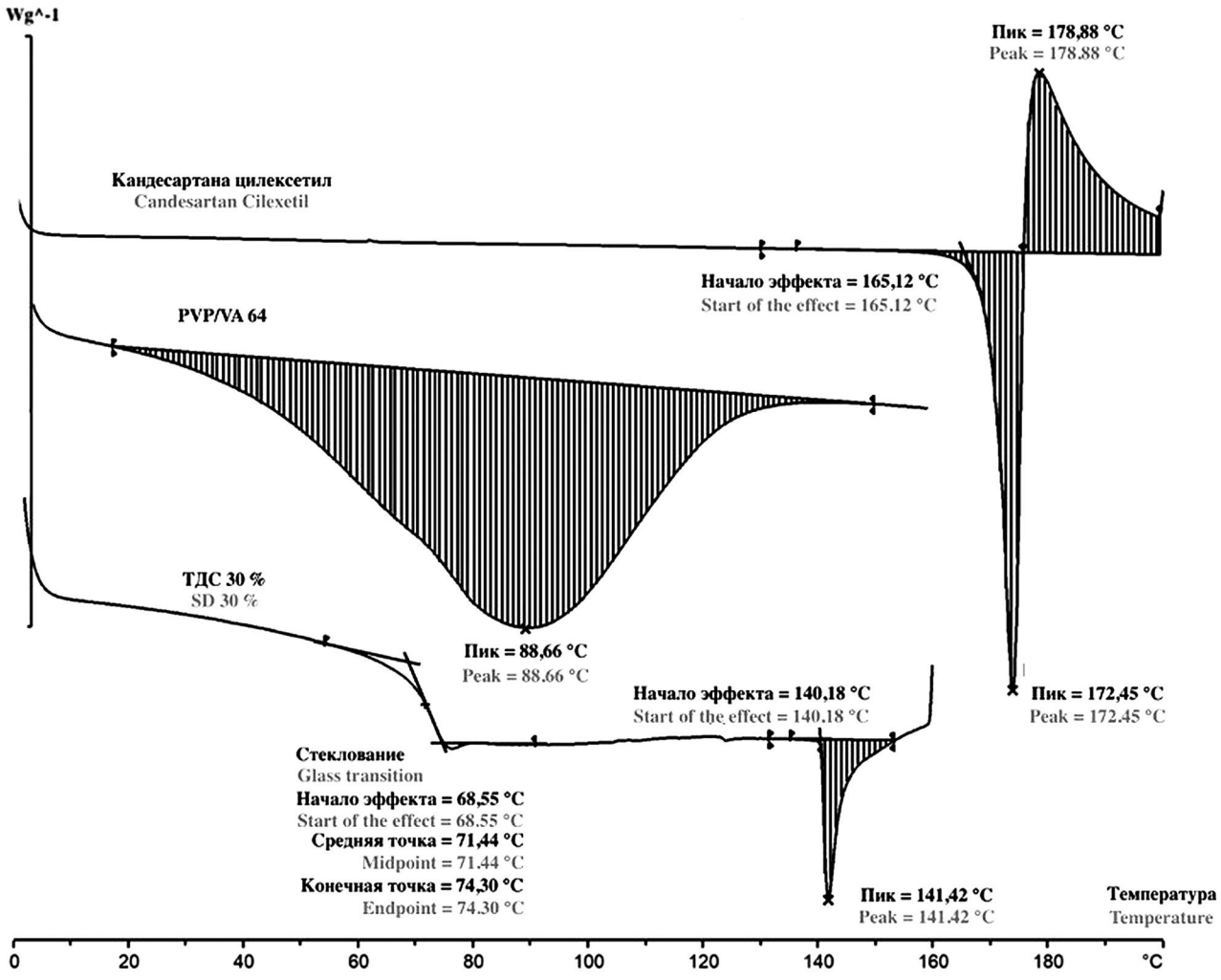


Рисунок 3. Результаты ДСК кандесартана цилексетила, PVP/VA 64 и ТДС

Figure 3. Results of DSC Candesartan Cilexetil, PVP/VA 64 and SD

Анализ ИК-Фурье-спектроскопии показал, что на спектре ТДС отсутствует подавляющее большинство характерных для кандесартана сигналов, которые наблюдаются на спектре механической смеси аналогичного состава. При этом не появляется новых сигналов, которые бы не соответствовали исходному полимеру-носителю (рисунок 4).

Описанные результаты свидетельствуют об образовании устойчивого комплекса между PVP/VA 64 и кандесартана цилексетилом, что приводит к значительному изменению свойств полимера-носителя и АФС.

Полученный экструдат (ТДС) измельчали до целевого размера фракции (90–500 мкм), смешивали со вспомогательными веществами и получали мини-таблетки состава № 8 (см. таблица 1) методом прямого прессования, так как таблеточная смесь обладала высокой сыпучестью и насыпной плотностью (см. таблица 2). Однако усилие прессования составило 7,2–7,5 кН, что свидетельствует о неудовлетворительной прессуемости таблеточной смеси и большой вероятности износа пресс-инструмента. Кроме того, несмотря на высокое усилие прессования, не удалось добиться целевой высоты мини-таблеток. Образцы также не прошли испытание на распадаемость, которая составила (20,0 ± 0,5) мин. Данное явление изначально было связано с избыточным усилием прессования.

Для оценки возможности снижения усилия прессования и получения мини-таблеток с целевыми параметрами было принято решение изменить массу мини-таблеток с 70,0 мг до 60,0 мг путем уменьшения количества наполнителя лактозы моногидрата, так как лактоза, в отличие от МКЦ и кальция гидрофосфата безводного, обладает наименьшей прессуемостью. Кроме того, с целью изучения влияния количества дезинтегранта на распадаемость мини-таблеток, содержащих ТДС кандесартана, в составы № 9, 10 и 11 вводили кармеллозу кальция в количестве 5, 10 и 15 % от массы таблеточной смеси соответственно (см. таблица 1).

При получении мини-таблеток составов № 9–11, как и предполагалось, удалось снизить усилие прессования до 1,8–3,0 кН и добиться при этом целевой высоты мини-таблеток (состав № 9 – (2,84 ± 0,04) мм; состав № 10 – (2,92 ± 0,06) мм; состав № 11 – (2,93 ± 0,03) мм). Однако значения распадаемости мини-таблеток не соответствовали фармакопейным требованиям (состав № 9 – (17,5 ± 0,5) мин; состав № 10 – (15,9 ± 0,9) мин; состав № 11 – (15,3 ± 0,8) мин). По-видимому, данное явление может быть связано с тем, что в процессе прессования таблеточных смесей, содержащих высокую массовую долю ТДС, происходит частичное подплавление полимера PVP/VA 64, приводящее к «склеивающему» эффекту, что, в свою очередь, препятствует распадаемости мини-таблеток. При этом увеличение количества дезинтегранта в составах № 9–11 не приводит к значительному улучшению распадаемости.

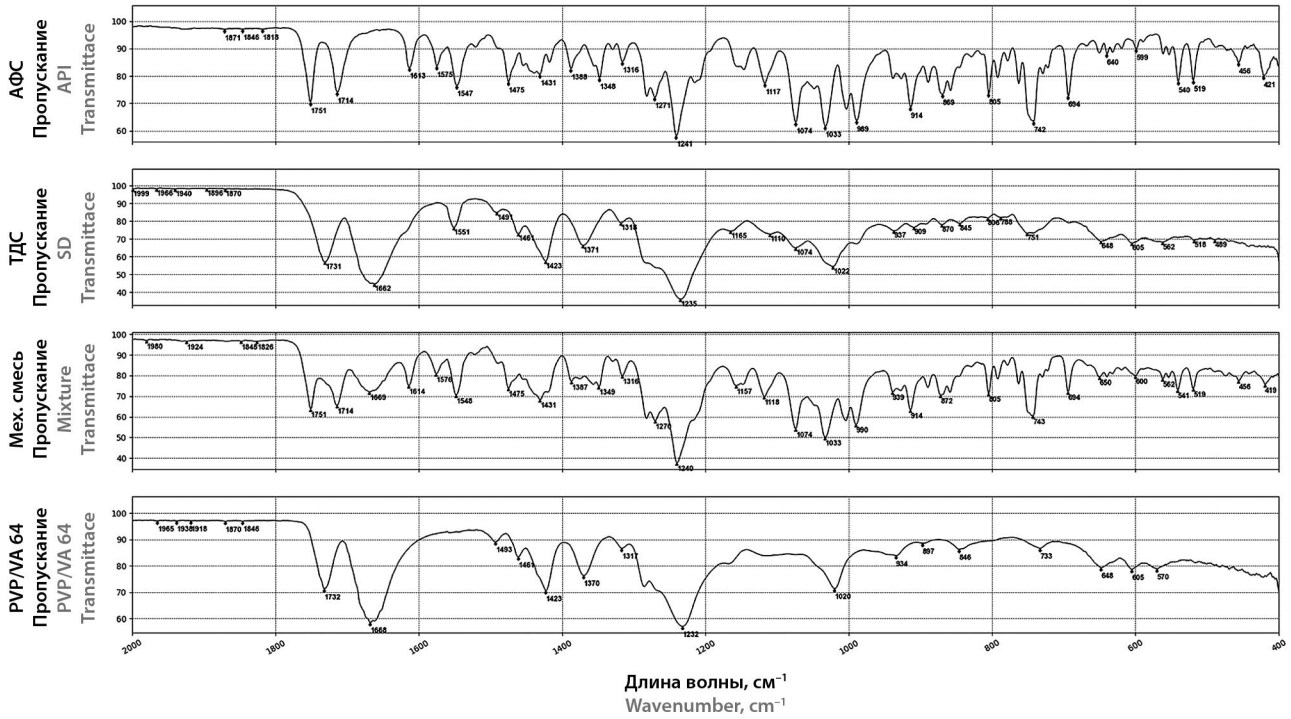


Рисунок 4. ИК-Фурье-спектры кандесартана цилексетила; механической смеси АФС и PVP/VA 64; ТДС 30 %; PVP/VA 64

Figure 4. FTIR-spectra of Candesartan Cilexetil; mixture of API and PVP/VA 64; SD 30 %; PVP/VA 64

Таблица 3. Результаты контроля качества мини-таблеток кандесартана (состав № 7)

Table 3. Results of quality control of Candesartan mini-tablets (composition № 7)

Показатель качества Level of quality	**Результат** Result	**Критерий** Criteria
Внешний вид Appearance	Круглые двояковыпуклые мини-таблетки белого цвета White round biconvex mini-tablets	Круглые двояковыпуклые мини-таблетки белого цвета White round biconvex mini-tablets
Однородность массы, мг Weight variation, mg	61,2 ± 0,2	60,0 ± 6,0 (± 10 %)
Прочность, Н Hardness, N	76,6 ± 5,8	Не менее 30 Н Not less than 30 N
Истираемость, % Friability, %	0,03	Менее 3 % Less than 3 %
Распадаемость, мин Disintegration, min	5,3 ± 0,3	Не более 15 мин Not more than 15 min
Количественное определение, мг Drug content, mg	7,90 ± 0,06	8,0 ± 0,8
Растворение, % Dissolution, %	99,60 ± 0,65	Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 80 % At least 80 % for 45 min

Для оценки влияния образования ТДС на профиль высвобождения АФС проводилось изучение кинетики растворения кандесартана из мини-таблеток состава № 9 в сравнении с оригинальным препаратом кандесартана Атаканд®, таблетки, 8 мг (см. рисунок 1). Для проведения испытания был выбран состав № 9, так как содержание в нем дезинтегранта сопоставимо с составом оригинального препарата (5 и 4,3 % соответственно).

Мини-таблетки, содержащие ТДС кандесартана, прошли испытание «Растворение». Согласно требованиям Американской фармакопеи, в раствор через 45 мин должно перейти не менее 80 % кандесартана цилексетила.

Однако в профилях высвобождения кандесартана из мини-таблеток, содержащих ТДС, и из оригинального препарата наблюдаются существенные различия. Мини-таблетки, содержащие ТДС, демонстрируют линейную зависимость степени растворения АФС от времени. Напротив, кинетика растворения АФС из оригинального препарата не может быть описана линейной зависимостью.

Также следует отметить, что для мини-таблеток, содержащих ТДС, наблюдается «отставание» высвобождения кандесартана в среду растворения примерно на 15 мин в сравнении с оригинальным препаратом. Данное явление может быть связано с разницей во времени распадаемости мини-таблеток, содержащих ТДС, – (17,5 ± 0,5) мин – в сравнении с таблетками оригинального препарата – (6,2 ± 0,7) мин. По-видимому, «склеивающий» эффект, приводящий к замедлению распадаемости мини-таблеток, содержащих ТДС, также определяет низкий процент растворения АФС в первой временной точке и дальнейшее замедление высвобождения кандесартана.

Разработанные мини-таблетки кандесартана состава № 7, содержащие комплекс включения с β-ЦД и показавшие наилучшее высвобождение АФС, оценивали по показателям: внешнему виду, однородности массы, истираемости, прочности на раздавливание, распадаемости, количественному определению, растворению (таблица 3). По всем показателям качества мини-таблетки соответствовали фармакопейным требованиям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ технологических подходов к повышению биодоступности труднорастворимой АФС кандесартана цилексетила в ЛФ мини-таблетки показал, что:

- создание комплекса включения кандесартана с β-ЦД в соотношении 1:1 методом пасты с последующим применением технологии влажного гранулирования позволяет получить мини-таблетки с улучшенным высвобождением труднорастворимой АФС по сравнению с оригинальным препаратом;
- применение ТДС в технологии мини-таблеток с целью улучшения биодоступности кандесартана затруднено из-за высокой массовой доли ТДС в составе таблеточной смеси, приводящей к «склеивающему» эффекту в процессе прессования и, как следствие, к замедлению высвобождения АФС по сравнению с оригинальным препаратом.

Таким образом, образование комплекса включения кандесартана цилексетила с β-ЦД методом пасты с последующим применением технологии влажного гранулирования выступает оптимальным технологическим подходом к повышению биодоступности труднорастворимой АФС в мини-таблетках. На основании

анализа профилей высвобождения кандесартана цилексетила и результатов контроля качества оптимальным составом мини-таблеток кандесартана выбран состав № 7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bhalani D. V., Nutan B., Kumar A., Singh Chandel A. K. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*. 2022;10(9):2055. DOI: 10.3390/biomedicines10092055.
2. 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.
3. 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.
4. Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Дмитриева М. В., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Орлова О. Л., Полозкова А. П., Лаврухин Н. И., Бунятян Н. Д. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(2):52–59.
5. Kim D.-H., Lee S.-E., Pyo Y.-C., Tran P., Park J.-S. Solubility enhancement and application of cyclodextrins in local drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2020;50:17–27. DOI: 10.1007/s40005-019-00434-2.
6. Carneiro S. B., Costa Duarte F. I., Heimfarth L., de Souza Siqueira Quintans J., Quintans-Júnior L. J., da Veiga Júnior V. F., de Lima Á. A. N. Cyclodextrin-Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):642. DOI: 10.3390/ijms20030642.
7. Кедик С. А., Панов А. В., Тюкова В. С., Золотарева М. С. Циклодекстрины и их применение в фармацевтической промышленности (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(3):68–75.
8. Савельева Е. И. Современные технологии модифицированного высвобождения биологически активных веществ в фармацевтической разработке (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):56–66. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-56-66.
9. Гусев К. А., Маймистов Д. Н., Павловский В. И., Алиев А. Р., Павловский А. В., Иванова О. В., Цыренов Д. О., Флисюк Е. В. Разработка состава и технологии получения твердой дисперсной системы методом экструзии горячего расплава для повышения биодоступности действующего вещества. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):108–115. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-108-115.
10. Schittny A., Huwyler J., Puchkov M. Mechanisms of increased bioavailability through amorphous solid dispersions: a review. *Drug Delivery*. 2020;27(1):110–127. DOI: 10.1080/10717544.2019.1704940.
11. Церковная К. М., Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Смехова И. Е., Ивкин Д. Ю., Филимонова Н. В. Разработка мини-таблеток амлодипина как компонента полипилла для персонализированной терапии артериальной гипертензии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):155–164. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1523.
12. Messerli F. H., Bangalore S., Rimoldi S. F., Gąsowski J., Nussberger J. Are ACE inhibitors acceptable ingredients in polypills? *The Lancet*. 2017;390(10089):26. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31468-X.
13. Задионченко В. С., Щикота А. М., Ялымов А. А., Шехян Г. Г., Тимофеева Н. Ю., Оганезова Л. Г., Терпигорев С. А., Кабанова Т. Г., Никишенков А. М. Алгоритм выбора препарата для лечения артериальной гипертонии. *Русский медицинский журнал*. 2017;4:296–301.
14. Карпов Ю. А., Мелехов А. В. Кандесартан: выход за пределы сердечно-сосудистого континуума. *Атмосфера. Новости кардиологии*. 2019;2:31–40.
15. Гусев К. А., Алиев А. Р., Генералова Ю. Э., Аксенова Н. А., Речкалов Г. В., Маймистов Д. Н., Алексеева Г. М., Флисюк Е. В. Разработка состава и технологии получения аморфной твердой дисперсной системы эбастина методом экструзии горячего расплава для увеличения скорости растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):126–135. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1577.
16. Смехова И. Е., Вайнштейн В. А., Ладутько Ю. М., Дружининская О. В., Турецкова Н. Н. Дезинтегранты и их влияние на растворение субстанций разных классов по биофармацевтической классификационной системе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(4):62–72.
17. Aly U. F., Sarhan H. A., Ali T. F. S., Sharkawy H. A. E. Applying Different Techniques to Improve the Bioavailability of Candesartan Cilexetil Antihypertensive Drug. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020;14:1851–1865. DOI: 10.2147/DDDT.S248511.
18. Salih O. S., Hamoddi Z. M., Taher S. S. Development and Characterization of Controlled Release Tablets of Candesartan Cilexetil/ β-Cyclodextrin Inclusion Complex. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 2020;10(2):273–283. DOI: 10.25258/ijddt.10.2.15.

REFERENCES

1. Bhalani D. V., Nutan B., Kumar A., Singh Chandel A. K. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*. 2022;10(9):2055. DOI: 10.3390/biomedicines10092055.
2. 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.
3. 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.
4. Gulyakin I. D., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Dmitrieva M. V., Lantsova A. V., Sanarova E. V., Orlova O. L., Polozkova A. P., Lavrukhin H. I., Bunyatyan N. D. Common methods increasing the solubility of poorly soluble hydrophobic substances. *Drug development & registration*. 2016;(2):52–59. (In Russ.)
5. Kim D.-H., Lee S.-E., Pyo Y.-C., Tran P., Park J.-S. Solubility enhancement and application of cyclodextrins in local drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2020;50:17–27. DOI: 10.1007/s40005-019-00434-2.

6. Carneiro S. B., Costa Duarte F. I., Heimfarth L., de Souza Siqueira Quintans J., Quintans-Júnior L. J., da Veiga Júnior V. F., de Lima Á. A. N. Cyclodextrin-Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):642. DOI: 10.3390/ijms20030642.
7. Kedik S. A., Panov A. V., Tyukova V. S., Zolotareva M. S. Cyclodextrins and their application in pharmaceutical industry (review). *Drug development & registration*. 2016;(3):68–75. (In Russ.)
8. Savelieva E. I. Modern Technologies of Controlled Release of Biologically Active Substances in Pharmaceutical Research and Development (Review). *Drug development & registration*. 2020;9(2):56–66. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-56-66.
9. Gusev K. A., Maimistov D. N., Pavlovsky V. I., Aliev A. R., Pavlovsky A. V., Ivanova O. V., Tsyrenov D. O., Flisyuk E. V. Development of the Composition and Technology for Production a Solid Dispersion System by Hot Melt Extrusion to Increase the Bioavailability of the Active Substance. *Drug development & registration*. 2022;11(4):108–115. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-108-115.
10. Schittny A., Huwyler J., Puchkov M. Mechanisms of increased bioavailability through amorphous solid dispersions: a review. *Drug Delivery*. 2020;27(1):110–127. DOI: 10.1080/10717544.2019.1704940.
11. Tserkovnaya K. M., Flisyuk E. V., Kotsur J. M., Narkevich I. A., Smekhova I. E., Ivkin D. Yu., Filimonova N. V. Development of Amlodipine Mini-tablets as a Polypill-component for the Personalized Therapy of Arterial Hypertension. *Drug development & registration*. 2023;12(4):155–164. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1523.
12. Messerli F. H., Bangalore S., Rimoldi S. F., Gąsowski J., Nussberger J. Are ACE inhibitors acceptable ingredients in polypills? *The Lancet*. 2017;390(10089):26. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31468-X.
13. Zadionchenko V. S., Schikota A. M., Yalymov A. A., Shehyan G. G., Timofeeva N. Y., Oganezova L. G., Terpigorev S. A., Kabanova T. G., Nikishenkov A. M. The algorithm of selection of the drug for the treatment of hypertension. *Russian Medical Journal*. 2017;4:296–301. (In Russ.)
14. Karpov Yu. A., Melekhov A. V. Candesartan: going beyond the cardiovascular continuum. *Atmosphere. Cardiology News*. 2019;2:31–40. (In Russ.)
15. Gusev K. A., Aliev A. R., Generalova Yu. E., Aksenova N. A., Rechkalov G. V., Maimistov D. N., Alekseeva G. M., Flisyuk E. V. Composition and Technology Development for Obtaining Amorphous Solid Dispersion of Ebastine by Hot Melt Extrusion to Increase Dissolution Rate. *Drug development & registration*. 2023;12(4):126–135. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1577.
16. Smekhova I. E., Vainshtein V. A., Ladutko Y. M., Druzhininskaya O. V., Tureckova N. N. Disintegrants and their influence on the dissolution of substances of Biopharmaceutical classification system classes. *Drug development & registration*. 2018;(4):62–72. (In Russ.)
17. Aly U. F., Sarhan H. A., Ali T. F. S., Sharkawy H. A. E. Applying Different Techniques to Improve the Bioavailability of Candesartan Cilexetil Antihypertensive Drug. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020;14:1851–1865. DOI: 10.2147/DDDT.S248511.
18. Salih O. S., Hamoddi Z. M., Taher S. S. Development and Characterization of Controlled Release Tablets of Candesartan Cilexetil/ β-Cyclodextrin Inclusion Complex. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 2020;10(2):273–283. DOI: 10.25258/ijddt.10.2.15.

13–14 МАЯ 2025
Отель «Коринтия Санкт-Петербург»

ФАРМА

32-Й РОССИЙСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ ИМЕНИ Н. А. СЕМАШКО

Традиционное место встречи ТОП-менеджеров международных и российских фармацевтических компаний, представителей регуляторных органов, профессиональных ассоциаций, научных организаций, пациентских сообществ и экспертов отрасли.

100+
ТОПОВЫХ СПИКЕРОВ

400+
УЧАСТНИКОВ ФОРУМА

20+
ТЕМАТИЧЕСКИХ ПОТОКОВ

ОБЗОР РЫНКА НА 360 ГРАДУСОВ

МАКСИМУМ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ДЛЯ ОБЩЕНИЯ

ФОКУС НА ТРЕНДОВЫХ ТЕМАХ

ПОДРОБНОСТИ НА САЙТЕ

РЕГИСТРАЦИЯ НА ФОРУМ

Р..Конф
КОНТАКТЫ. ИНФОРМАЦИЯ. РЕШЕНИЯ

https://russian.pharma-conf.ru

Реклама. 18+

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.322; 615.014.21

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1971

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка твердой дисперсионной системы сухого экстракта расторопши методом удаления растворителя

Б. А. Перес, И. Е. Каухова✉, И. И. Тернинко, О. Н. Абросимова, Е. В. Вишняков, Н. С. Пивоварова

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

✉ **Контактное лицо:** Каухова Ирина Евгеньевна. **E-mail:** irina.kaukhova@pharminnotech.com

ORCID: Б. А. Перес – https://orcid.org/0000-0001-9917-9538;
И. Е. Каухова – https://orcid.org/0000-0002-0896-6956;
И. И. Тернинко – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015;
О. Н. Абросимова – https://orcid.org/0000-0002-0274-0139;
Е. В. Вишняков – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866;
Н. С. Пивоварова – https://orcid.org/0000-0003-3020-8526.

Статья поступила: 13.11.2024 **Статья принята в печать:** 18.12.2024 **Статья опубликована:** 20.12.2024

Резюме

Введение. Одним из используемых растительных компонентов в препаратах гепатотропной терапии является силимарин. Силимарин содержится в сухом экстракте семян и плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L. Gaertn.), однако он имеет плохую биодоступность. Последнее обусловлено, в частности, кристаллическим состоянием и низкой растворимостью в воде флаволигнанов силимарина при комнатной температуре, а также их плохой абсорбцией. Одним из методов повышения биодоступности лекарственных веществ является введение их в твердые дисперсные системы (ТДС). Наиболее подходящим методом получения ТДС с экстрактами является метод удаления растворителя, поскольку не требует применения высокого температурного режима в процессе получения ТДС.

Цель. Разработка технологии твердой дисперсионной системы сухого экстракта расторопши методом удаления растворителя для повышения биодоступности данной фитосубстанции.

Материал и методы. Получение твердой дисперсионной системы сухого экстракта расторопши методом удаления растворителя с полимерами поливинилпирролидоном (ПВП К-29/32), поливинилпирролидон-винилацетатом 6:4 (ПВПВА 64), гидроксипропилметилцеллюлозой (ГПМЦ), желатином и лаурилсульфатом натрия (SDS). Исследование показателей качества ТДС: распределения размера частиц, насыпной плотности, остаточной влажности, гигроскопичности – проведены согласно методикам, приведенным в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XV издания. Количественное определение биологически активных веществ (БАВ) проводили в соответствии с ГФ РФ XV изд. по сумме флаволигнанов в пересчете на силибин.

Результаты и обсуждение. При разработке твердой дисперсионной системы методом удаления растворителя были исследованы образцы ТДС сухого экстракта расторопши (СЭР) с различными полимерами. В результате изучения распределения частиц по размерам был отобран ряд образцов ТДС. Исследования проводили в сравнении с образцом СЭР. Проведение теста «Растворение» показало, что микромизация СЭР в форме ТДС, содержащей в составе поливинилпирролидон-винилацетат – ПВПВА 64, методом удаления растворителя является наилучшим вариантом для увеличения степени высвобождения силибина из экстракта и повышения его биодоступности. По содержанию суммы флаволигнанов в пересчете на силибин отобранный образец ТДС соответствует требованиям НД к сухому экстракту расторопши. Кроме того, условия разработки ТДС не влияют значительно на количественное содержание силибина по сравнению с содержанием его в контрольном образце СЭР. Исследованы технологические показатели ТДС и установлено их качественное улучшение по сравнению с образцом СЭР. Проведена оценка взаимодействия полимера-носителя с сухим экстрактом расторопши методом ИК-Фурье-спектроскопии.

Заключение. Разработана ТДС сухого экстракта расторопши методом удаления растворителя. Для разработанной ТДС были определены такие показатели качества, как содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин, остаточная влажность, насыпная плотность, распределение размера частиц, гигроскопичность. ТДС сухого экстракта расторопши проанализирована с помощью ИК-Фурье-спектроскопии. Показана физико-химическая совместимость между СЭР и

© Перес Б. А., Каухова И. Е., Тернинко И. И., Абросимова О. Н., Вишняков Е. В., Пивоварова Н. С., 2025
© Perez B. A., Kauhova I. E., Terninko I. I., Abrosimova O. N., Vishnyakov E. V., Pivovarova N. S., 2025

полимером-носителем поливинилпирролидон-винилацетатом. Создание ТДС сухого экстракта расторопши значительно повысило биодоступность фитосубстанции за счет увеличения степени высвобождения силибина из ТДС экстракта – в 3 раза по сравнению с контрольным образцом СЭР.

Ключевые слова: экстракт расторопши сухой, твердая дисперсионная система, полимеры, метод удаления растворителя

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

Вклад авторов. И. Е. Каухова осуществила постановку задачи. Б. А. Перес выполнил эксперимент, обработку полученных данных. Е. В. Вишняков провел оценку взаимодействия полимера-носителя с сухим экстрактом расторопши методом ИК-Фурье-спектроскопии. Б. А. Перес, И. Е. Каухова, И. И. Тернинко, О. Н. Абросимова, Е. В. Вишняков, Н. С. Пивоварова участвовали в планировании и обсуждении результатов исследования, интерпретации полученных данных и написании текста статьи.

Для цитирования: Перес Б. А., Каухова И. Е., Тернинко И. И., Абросимова О. Н., Вишняков Е. В., Пивоварова Н. С. Разработка твердой дисперсионной системы сухого экстракта расторопши методом удаления растворителя. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):151–159. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1971

Development of solid dispersion system from milk thistle dry extract by solvent method

Bajron A. Perez, Irina E. Kauhova✉, Inna I. Terninko, Olesya N. Abrosimova, Evgeniy V. Vishnyakov, Nadezhda S. Pivovarova

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

✉ **Corresponding author:** Irina E. Kauhova. **E-mail:** irina.kaukhova@pharminnotech.com

ORCID: Bajron A. Perez – https://orcid.org/0000-0001-9917-9538;
Irina E. Kauhova – https://orcid.org/0000-0002-0896-6956;
Inna I. Terninko – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015;
Olesya N., Abrosimova – https://orcid.org/0000-0002-0274-0139;
Evgeniy V. Vishnyakov – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866;
Nadezhda S. Pivovarova – https://orcid.org/0000-0003-3020-8526.

Received: 13.11.2024 **Accepted:** 18.12.2024 **Published:** 20.12.2024

Abstract

Introduction. Silymarin is one of the main components used in preparations for hepatotropic therapy. Silymarin is contained in the dry extract of seeds and fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), however it has poor bioavailability due to the crystalline state and low solubility of silymarin flavolignans in water at room temperature, as well as their poor absorption. One of the methods for increasing the bioavailability of medicinal substances consists in their introducing into solid dispersion systems (SDS). The most suitable method for obtaining SDS with extracts is the solvent method, since it does not require the use of a high temperature regime during the obtaining process of SDS.

Aim. To develop the technology for solid dispersion system from milk thistle dry extract by solvent method to increase the bioavailability of this phytosubstance.

Material and methods. The obtaining of the solid dispersion systems from milk thistle dry extract by solvent method was carried out with polyvinylpyrrolidone (PVP K-29/32), polyvinylpyrrolidone vinyl acetate 6:4 (PVPVA 64), hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), gelatin and sodium lauryl sulfate (SLS). The quality indicators of the SDS: particle size distribution, bulk density, residual humidity and hygroscopicity were carried out according to the methods of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (GP RF) XV edition. The quantitative determination of biologically active substances (BAS) was carried out in accordance with the GP RF XV ed. by the amount of flavolignans in terms of silybin.

Results and discussion. During the development of solid dispersion systems by solvent method, SDS samples from milk thistle dry extract (MTDE) with different polymers were studied. As a result of studying the particle size distribution, several SDS samples were selected. The SDS samples were compared with the MTDE sample. The "Dissolution" test showed that the micronization of MTDE in form of SDS by solvent method, containing polyvinylpyrrolidone vinyl acetate – PVP VA 64 is the best alternative for increasing the silybin releasing-degree from the extract and increasing its bioavailability. According to the content of the sum of flavolignans in terms of silybin, the selected SDS sample meets the requirements of the normative documentation for milk thistle dry extract. In addition, the conditions for the development of SDS do not significantly affect the quantitative content of silybin compared with the content of the control sample of MTDE. The technological characteristics of SDS have been investigated and their qualitative improvement compared to the MTDE sample has been established. The interaction between the polymer carrier and the milk thistle extract was evaluated by the IR-fourier spectroscopy method.

Conclusion. The SDS from milk thistle dry extract was developed by solvent method. For the developed SDS, quality indicators such as the content of the sum of flavolignans in terms of silybin, residual humidity, bulk density, particle size distribution and hygroscopicity were determined. The solid dispersion system from milk thistle extract was analyzed by IR-fourier

spectroscopy. The physico-chemical compatibility between the milk thistle extract and the polymer-carrier polyvinylpyrrolidone vinyl acetate is shown. The development of the SDS from milk thistle dry extract significantly increased the bioavailability of the phytosubstance by increasing the silybin releasing-degree of the SDS by 3 times compared with the control sample of MTDE.

Keywords: milk thistle dry extract, solid dispersion system, polymers, solvent method

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. Irina E. Kaukhova carried out the task statement. Bajron A. Perez performed the experiment and processed the data obtained. Evgeniy V. Vishnyakov evaluated the interaction between the polymer carrier and the milk thistle extract, by IR-fourier spectroscopy. Bajron A. Perez, Irina E. Kaukhova, Inna I. Terniko, Olesya N. Abrosimova, Evgeniy V. Vishnyakov and Nadezhda S. Pivovarova participated in the planning and discussion of the results, the data interpretation and the writing of this paper.

For citation: Perez B. A., Kauhova I. E., Terninko I. I., Abrosimova O. N., Vishnyakov E. V., Pivovarova N. S. Development of solid dispersion system from milk thistle dry extract by solvent method. *Drug development & registration*. 2025;14(1):151–159. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1971

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания печени ежегодно становятся причиной двух миллионов смертей и являются причиной 4 % всех смертей (1 из каждых 25 смертей в мире) [1]. Актуальной задачей является поиск новых лекарственных средств для лечения и профилактики развития жирового гепатоза. Одним из путей разработки лекарственных средств является изучение биологически активных веществ растений для создания фитопрепаратов [2].

Действующие вещества (ДВ) растительного происхождения широко используются в гепатотерапии. Одним из самых изучаемых ДВ является силимарин, который представляет собой экстракт из высушенных семян и плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L. Gaertn.). Экстракт расторопши сухой содержит сложную смесь соединений растительного происхождения, идентифицированных в основном как флаволигнаны, флавоноиды и полифенольные молекулы. Силимарин имеет четыре основных изомера флаволигнана: силибин, изосилибин, силихристин и силидианин. Основной биологической активностью обладает силибин, который составляет около 50–60 % комплекса силимарина. Остальные изомеры флаволигнана составляют около 35 %: силихристин – ~20 %, силидианин – ~10 % и изосилибин – ~5 % [3].

Клиническое применение и терапевтическая эффективность флаволигнанов силимарина ограничены из-за их плохой биодоступности. Последнее обусловлено, в частности, кристаллическим состоянием и низкой растворимостью в воде флаволигнанов силимарина при комнатной температуре, а также их плохой постоянной абсорбцией [4]. В соответствии с системой классификации биофармацевтических систем (Biopharmaceutics Classification System, BCS) силимарин относится к IV классу активных фармацевтических субстанций (АФС) [5]. Для повышения растворимости АФС существует ряд подходов: микронизация субстанции, создание липосомальных форм, добавление поверхностно-активных веществ и полимеров, абсорбция на мезопористых носителях [6].

Одним из методов повышения биодоступности лекарственных веществ является его введение в твердые дисперсные системы (ТДС). В технологию получения ТДС входят: метод удаления растворителя, метод расплавления, метод сверхкритических жидкостей, метод совместного осаждения и другие [7]. Выбор носителей – полимеров играет важную роль в получении, растворимости, всасывании и стабильности готовой твердой дисперсии (ТД). Вспомогательные вещества ТДС (полмеры-носители) обычно подразделяются на гидрофобные, гидрофильные и амфифильные, или суфрактанты. Гидрофобные обычно имеют кристаллическое строение (сахариды и др.), гидрофильные – аморфное (поливинилполивидон (ПВП) и др.), амфифильные (суфрактанты) – полукристаллическое (полоксамер и др.) [8].

Как и выбор полимеров, выбор технологии является критическим шагом при разработке ТДС. Наиболее подходящим методом получения ТДС с экстрактами является метод удаления растворителя, поскольку не требует применения высокотемпературного режима в процессе получения ТДС, в этом методе АФС и полимеры-носители растворяются в летучем органическом растворителе, который затем удаляется выпариванием, вакуумуной, распылитель-

ной или сублимационной сушкой [9, 10]. Полимер и сополимеры поливинилпирролидона (ПВП), как и полимеры на основе гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), являются подходящими кандидатами для приготовления ТДС методом удаления растворителя, поскольку эти полимеры по своей структуре приводят к образованию дисперсий с аморфным, полукристаллическим состоянием или комбинаций между ними [11–13] в зависимости от природы используемого ДВ. Однако использование амфифильных полимеров в ТДС способствует образованию нанодисперсий в виде наносфер [10].

В связи с вышеизложенным **целью данного исследования** являлась разработка технологии твердой дисперсионной системы сухого экстракта расторопши методом удаления растворителя для повышения биодоступности сухого экстракта расторопши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Объектом исследования служил сухой экстракт расторопши (СЭР) (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), наработанный на кафедре промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России [14], и полимеры: поливинилпирролидон – ПВП K-29/32 (Plasdone™ K-29/32, CAS № 9003-39-8, Ashland Inc., США), поливинилпирролидон-винилацетат – ПВПВА 64 (Plasdone VA64, CAS № 25086-89-9, Ashland Inc., США), гидроксипропилметилцеллюлоза – ГПМЦ (CAS № 9004-65-3, JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия), лаурилсульфат натрия (SDS, CAS № 151-21-3, Sigma-Aldrich Corporation, США), желатин (CAS № 9000-70-8, Clearsynth, Индия).

Методы и оборудование

1. Получение ТДС в лабораторных условиях

Растворение 0,3 г СЭР в 10 мл спирта этилового 96 % проводили при обработке в ванне ультразвуковой «Сапфир», 2,8 л (АО «НПП «Сапфир», Россия), при рабочей частоте 35 кГц, температуре 25 ± 1 °С до полного растворения.

Полимеры взвешивали на аналитических весах CE224-C (ООО «САРТОГОСМ», Россия) и растворяли в 50 мл воды очищенной при постоянном перемешивании (800 об/мин) с помощью магнитной мешалки AREC.T (VELP Scientifica Srl., Италия) до полного растворения. Затем растворы СЭР и полимеров объединяли в соотношении 1 : 5, воздействовали ультразвуком в течение 10 мин.

Образцы 1–10 сушили в шкафу сушильном вакуумном OV-12 (JEIO TECH, Корея) при температуре 55–60 °С до остаточной влажности не более 2 %, измельчали на мельнице лабораторной ЛМ-201 (ООО «ПЛАУН-системы», Россия) до порошка, частицы которого проходят через сито с размером ячеек 355 мкм. В лабораторных условиях наработано по 10,0 г каждого образца.

Образцы 11–14 сушили в шкафу сушильном ШС-80-01 СПУ (Россия) при температуре 80–90 °С до остаточной влажности не более 2 %, измельчали на мельнице лабораторной ЛМ-201 (ООО «ПЛАУН-системы», Россия) до порошка, частицы которого проходят через сито с размером ячеек 355 мкм. В лабораторных условиях наработано по 10,0 г каждого образца. Составы полученных образцов ТДС представлены в таблице 1.

Таблица 1. Составы образцов ТДС

Table 1. Sample composition of the solid dispersion systems

Образец ТДС Solid dispersion	**Количество, г** Quantity, g					
	ПВП K-29/32 PVP K-29/32	**ГПМЦ** HPMC	**Желатин** Gelatin	**SDS** Sodium dodecyl sulfate	**ПВПВА 64** PVP VA 64	**СЭР** Mill thistle extract
1	0,16	0,16	0,16	–	–	0,3
2	0,08	0,16	0,16	–	–	0,3
3	0,80	0,16	–	0,16	–	0,3
4	0,16	0,16	–	–	–	0,3
5	0,80	0,50	–	–	–	0,3
6	–	0,16	–	–	0,50	0,3
7	–	0,50	–	–	0,80	0,3
8	–	–	–	–	0,80	0,3
9	–	–	–	0,16	–	0,3
10	–	–	–	0,50	–	0,3
11	–	–	–	0,80	–	0,3
12	–	–	–	–	1,00	0,3
13	–	–	–	–	5,00	0,3
14	–	–	–	–	10,00	0,3

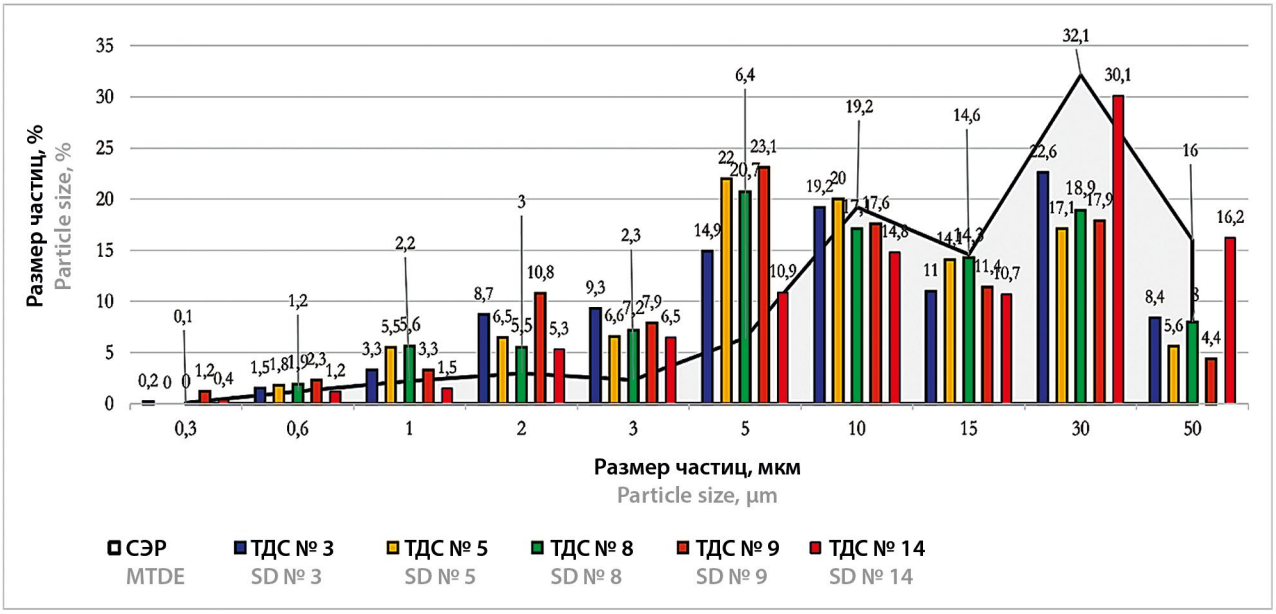


Рисунок 1. Распределение размера частиц СЭР и ТДС

Figure 1. Particle size distribution of milk thistle extract and solid dispersions

2. Исследование показателей качества ТДС

Изучение параметров: распределения размера частиц (лазерный анализатор размера частиц «Микросайзер 201С», Россия); насыпной плотности (тестер насыпной плотности SVM 221, ERWEKA GmbH, Германия); остаточной влажности (влагомер термогравиметрический инфракрасный «Эвлас-2М», Россия); гигроскопичности (климатическая камера HPP 110, Memmert GmbH, Германия). Анализы были проведены согласно методикам, приведенным в ГФ РФ XV изд.[1]

Количественное определение биологически активных веществ (БАВ) проводили в соответствии с ГФ РФ XV изд. по сумме флаволигнанов в пересчете на силибин (спектрофотометр СФ-2000, Россия).

3. Проведение теста «Растворение» для ТДС

В соответствии с методикой, описанной И. И. Краснюком и др. (2021) [15, 16], образцы ТДС по 1,0 г и 0,1 г сухого экстракта расторопши растворяли в стакане, содержащем 750 мл среды растворения – фосфатного забуференного физиологического раствора с pH 6,8 ± 0,5, согласно ГФ РФ XV, ОФС.1.3.0003 «Буферные растворы», при температуре 37 ± 0,1 °С и перемешивании на магнитной мешалке C-MAG HS 7 (IKA, Германия) со скоростью 200 об/мин. Пробы отбирали через 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 и 120 мин с последующим восполнением среды растворения. Высвобождение силибина контролировали спектрофотометрическим методом при длине волны λ = 289 нм.

4. Оценка взаимодействия полимера-носителя с сухим экстрактом расторопши методом ИК-Фурье-спектроскопии

Снятие ИК-спектров образцов проводили на ИК-Фурье-спектрометре Spectrum 3 (PerkinElmer, США) с использованием приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в диапазоне длин волн от 4000 до 400 $см^{-1}$, число накоплений – 10.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с ГФ XV, ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке твердой дисперсионной системы методом удаления растворителя был изучен ряд сополимеров. В результате изучения распределения частиц по размерам был отобран ряд образцов ТДС. Исследования проводили в сравнении с образцом СЭР. Результаты распределения частиц по размерам наилучших вариантов ТДС, полученных на основе полимеров ПВП К-29/32, ПВПВА 64, ГПМЦ, желатин и SDS, показаны на рисунке 1. По сравнению с СЭР в образцах ТДС № 3, 5, 8 и 14 повышалась доля час-

[1] Государственная Фармакопея Российской Федерации. XV издание. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 01.10.2024.

тиц размером от 0,3 до 5 мкм на 22,7; 27,2; 25,7; 33,4 и 10,6 % соответственно и уменьшилась доля частиц размером от 10 до 50 мкм на 20,7; 25,1; 23,6; 30.6 и 10,1 % соответственно. Однако с учетом выхода ТДС по процессу получения были выбраны образцы № 5 и 14 для дальнейших исследований.

Результаты проведения теста «Растворение» образцов ТДС № 5 и 14 в сравнении с образцом СЭР представлены на рисунке 2.

Установлено, что за 20 мин из ТДС № 14 высвободилось 91 ± 0,5 % силибина, за это время из ТДС № 5 высвободилось 47 ± 0,2 % и из СЭР – 26 ± 0,3 %.

Для разработанной ТДС определены такие показатели качества, как содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин, остаточная влажность, насыпная плотность. Исследования проводили в сравнении с образцом СЭР. Результаты представлены в таблице 2.

По содержанию суммы флаволигнанов в пересчете на силибин ТДС № 14 соответствует требованиям НД к сухому экстракту расторопши. Кроме того, условия разработки ТДС не влияют значительно на количественное содержание силибина по сравнению с содержанием его в контрольном образце СЭР.

Остаточная влажность полученной ТДС несколько снизилась по сравнению с контрольным образцом СЭР, что может повысить стабильность образца при хранении.

По сравнению с СЭР ТДС № 14 показала уменьшение на 0,739 г/см^3 насыпной плотности, что повышает ее сыпучесть.

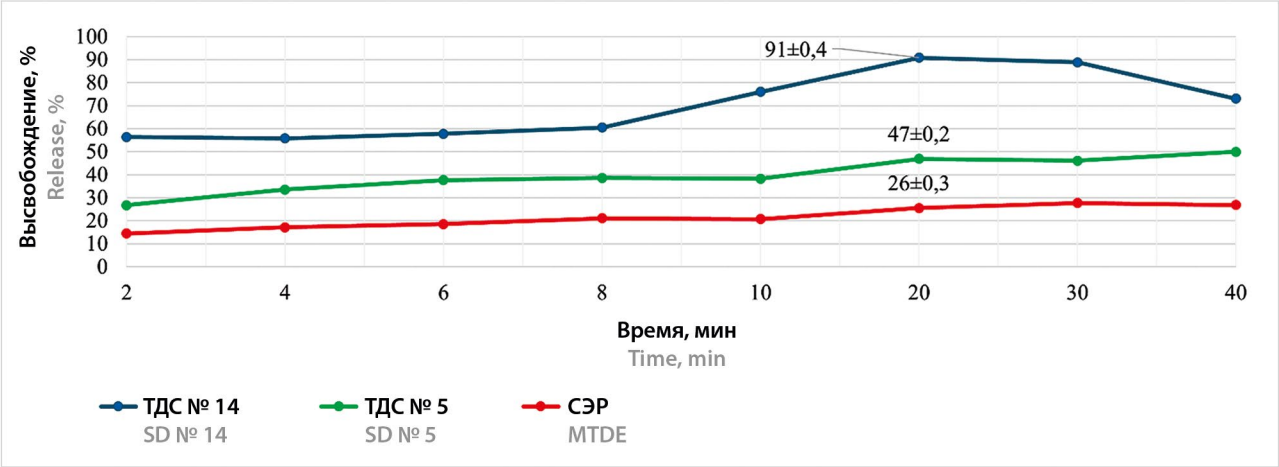


Рисунок 2. Профили высвобождения СЭР и ТДС № 5 и 14

Figure 2. Results of the kinetic dissolution of milk thistle extract and solid dispersions № 5 and 14

Таблица 2. Показатели качества ТДС № 14 на основе ПВПВА 64, соотношение 1 : 10

Table 2. Quality indicators of the solid dispersion № 14 based on PVP VA 64, ratio 1 : 10

Показатель Indicator	**Метод** Method	**Экспериментальные данные** Results	**Контроль** Control	**Норма** Specification
		ТДС № 14 Solid dispersion № 14	**СЭР** Mill thistle extract	
Сумма флаволигнанов в пересчете на силибин, % Content of flavolignans in terms of silybin, %	ОФС.1.2.1.1.0003 GM.1.2.1.1.0003	75,20 ± 0,14	79,20 ± 0,20	Не менее 65 % No less than 65 %
Влажность, % Humidity, %	ОФС.1.2.1.0010 GM.1.2.1.0010	0,14 ± 0,01	0,58 ± 0,03	Не более 5 % No more than 5 %
Насыпная плотность, г/см^3 Bulk density, g/cm^3	ОФС.1.4.2.0024 GM.1.4.2.0024	0,94 ± 0,05	1,68 ± 0,08	
Гигроскопичность Hygroscopicity	ОФС. 1.1.0042 GM. 1.1.0042	Гигроскопичен. Увеличение в массе составило 3 % Hygroscopic. Increase in weight 3 %	Гигроскопичен. Увеличение в массе составило 3,2 % Hygroscopic. Increase in weight 3,2 %	

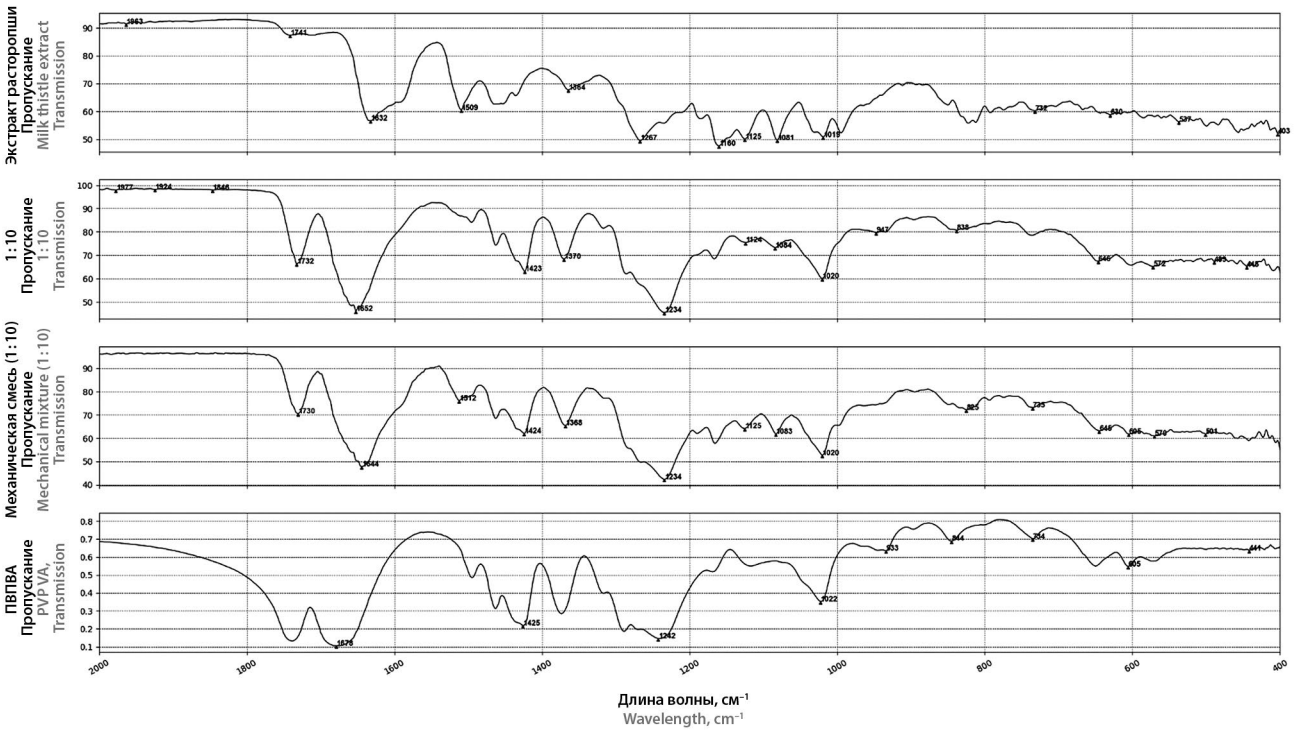


Рисунок 3. ИК-спектры:
1 – СЭР; 2 – ТДС; 3 – механическая смесь (СЭР, ПВПВА 64); 4 – ПВПВА 64

Figure 3. IR-spectra:
1 – Milk thistle extract; 2 – Solid dispersion system; 3 – Mechanical mixture (milk thistle extract, PVP VA 64); 4 – PVP VA 64

При изучении гигроскопичности было установлено, что ТДС, так же как и контрольный образец СЭР, гигроскопичен, что необходимо будет учитывать при разработке лекарственной формы комбинированного препарата с ТДС.

Для оценки возможного взаимодействия ПВПВА 64 с сухим экстрактом расторопши были получены ИК-спектры бинарной твердой дисперсии состава № 14, образца СЭР, механической смеси (СЭР и ПВПВА 64) и полимера ПВПВА 64 (рисунок 3). В ходе интерпретации ИК-спектров образцов ТДС (2) и механической смеси (3) не было отмечено значительных девиаций полос пропускания (коэффициент корреляции 0,9881). Стоит отметить, что ИК-спектры бинарных систем (2, 3) отличаются в сравнении со спектрами индивидуальных компонентов – СЭР (1) и ПВПВА (4). Однако большинство сигналов на спектрах 2 и 3 принадлежат сополимеру ПВПВА 64 (4). Это может говорить о высокой концентрации данного компонента в смеси по сравнению с СЭР. О взаимодействии в бинарной дисперсии сополимера и СЭР можно судить и по девиациям полос пропускания относительно полос на спектрах индивидуальных компонентов. Это дает возможность утверждать, что в ходе реализации различных вариантов пробоподготовки и технологических процессов для получения бинарной дисперсии происходит взаимодействие комплекса «сополимер – СЭР».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана ТДС сухого экстракта расторопши методом удаления растворителя. На основании сравнительной оценки выбран сополимер поливинилпирролидон-винилацетат (ПВПВА 64) в составе ТДС с СЭР. Установлено, что получение ТДС сухого экстракта расторопши позволило увеличить долю частиц размером от 0,3 до 5 мкм и уменьшить долю частиц размером от 10 до 50 мкм на 10–20 % по сравнению с контрольным образцом СЭР.

Для разработанной ТДС были определены такие показатели качества, как содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин, остаточная влажность, насыпная плотность. ТДС сухого экстракта расторопши проанализирована с помощью ИК-Фурье-спектроскопии. Показана физико-химическая совместимость между СЭР и полимером-носителем поливинилпирролидон-винилацетатом.

Создание ТДС сухого экстракта расторопши значительно повысило биолоступность фитосубстанции

за счет увеличения степени высвобождения силибина из ТДС экстракта – в 3 раза по сравнению с контрольным образцом СЭР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Devarbhavi H., Asrani S. K., Arab J. P., Nartey Y. A., Pose E., Kamath P. S. Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of Hepatology*. 2023;79(2):516–537. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.03.017.
2. Гуляев Д. К., Зыкова С. С., Белоногова В. Д., Семакин Д. О., Бузмакова Н. А. Гепатопротекторная активность экстракта сосны обыкновенной шишек. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):128–133. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4(1)-1613.
3. Gillessen A., Schmidt H. H.-J. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Advances in Therapy*. 2020;37(4):1279–1301. DOI: 10.1007/s12325-020-01251-y.
4. Safarpour S., Safarpour S., Moghadamnia A. A., Kazemi S., Ebrahimpour A., Shirafkan F. The protective effects of silymarin nanoemulsion on 5-fluorouracil-induced gastrointestinal toxicity in rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(8):101672. DOI: 10.1016/j.jsps.2023.06.005.
5. Di Costanzo A., Angelico R. Formulation Strategies for Enhancing the Bioavailability of Silymarin: The State of the Art. *Molecules*. 2019;24(11):2155. DOI: 10.3390/molecules24112155.
6. Гусев К. А., Маймистов Д. Н., Павловский В. И., Алиев А. Р., Павловский А. В., Иванова О. В., Цыренов Д. О., Флисюк Е. В. Разработка состава и технологии получения твердой дисперсной системы методом экструзии горячего расплава для повышения биодоступности действующего вещества. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):108–115. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-108-115.
7. Bhalani D. V., Nutan B., Kumar A., Singh Chandel A. K. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*. 2022;10(9):2055. DOI: 10.3390/biomedicines10092055.
8. Zhang X., Xing H., Zhao Y., Ma Z. Pharmaceutical Dispersion Techniques for Dissolution and Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):74. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030074.
9. Kim D., Kim Y., Tin Y.-Y., Soe M.-T.-P., Ko B., Park S., Lee J. Recent Technologies for Amorphization of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics*. 2021;13(8):1318. DOI: 10.3390/pharmaceutics13081318.
10. Baghel S., Cathcart H., O'Reilly N. J. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(9):2527–2544. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.10.008.
11. Sheskey P. J., Cook W. G., Cable C. G., editors. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London: Pharmaceutical Press; 2017. 1216 p.
12. Nair A. R., Lakshman Y. D., Anand V. S. K., Sree K. S. N., Bhat K., Dengale S. J. Overview of extensively employed polymeric carriers in solid dispersion technology. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21:309. DOI: 10.1208/s12249-020-01849-z.
13. Bhujbal S. V., Mitra B., Jain U., Gong Y., Agrawal A., Karki S., Taylor L. S., Kumar S., Zhou Q. (T.). Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(8):2505–2536. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.05.014.
14. Перес Б. А., Процюк А. П., Зеленцова А. Б., Каухова И. Е., Ароян М. В., Новикова Е. К. Разработка технологии получения фитосубстанции расторопши пятнистой плодов (*Silybum marianum* L.) в качестве компонента комплексной терапии заболеваний печени. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):101–110. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1582.
15. Краснюк (мл.) И. И., Нарышкин С. Р., Краснюк И. И., Беляцкая А. В., Степанова О. И., Бобров И. С., Янкова В. Г., Рау Д. В., Воробьев А. Н. Влияние твёрдых дисперсий на растворимость метронидазола. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):195–204. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-195-204.
16. Sherikar A., Mohd Siddique M. U., More M., Goyal S. N., Milivojevic M., Alkahtani S., Alarifi S., Hasnain M. S., Kumar Nayak A. Preparation and Evaluation of Silymarin-Loaded Solid Eutectic for Enhanced Anti-Inflammatory, Hepatoprotective Effect: In Vitro–In Vivo Prospect. *Oxid Med Cell Longev*. 2021:1818538. DOI: 10.1155/2021/1818538.

REFERENCES

1. Devarbhavi H., Asrani S. K., Arab J. P., Nartey Y. A., Pose E., Kamath P. S. Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of Hepatology*. 2023;79(2):516–537. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.03.017.
2. Gulyaev D. K., Zykova S. S., Belonogova V. D., Semakin D. O., Buzmakova N. A. Hepatoprotective Activity of Pine cones Extract. *Drug development & registration*. 2023;12(4):128–133. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4(1)-1613.
3. Gillessen A., Schmidt H. H.-J. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Advances in Therapy*. 2020;37(4):1279–1301. DOI: 10.1007/s12325-020-01251-y.
4. Safarpour S., Safarpour S., Moghadamnia A. A., Kazemi S., Ebrahimpour A., Shirafkan F. The protective effects of silymarin nanoemulsion on 5-fluorouracil-induced gastrointestinal toxicity in rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(8):101672. DOI: 10.1016/j.jsps.2023.06.005.
5. Di Costanzo A., Angelico R. Formulation Strategies for Enhancing the Bioavailability of Silymarin: The State of the Art. *Molecules*. 2019;24(11):2155. DOI: 10.3390/molecules24112155.
6. Gusev K. A., Maimistov D. N., Pavlovsky V. I., Aliev A. R., Pavlovsky A. V., Ivanova O. V., Tsyrenov D. O., Flisyuk E. V. Development of the Composition and Technology for Production a Solid Dispersion System by Hot Melt Extrusion to Increase the Bioavailability of the Active Substance. *Drug development & registration*. 2022;11(4):108-115. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-108-115.
7. Bhalani D. V., Nutan B., Kumar A., Singh Chandel A. K. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*. 2022;10(9):2055. DOI: 10.3390/biomedicines10092055.

8. Zhang X., Xing H., Zhao Y., Ma Z. Pharmaceutical Dispersion Techniques for Dissolution and Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):74. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030074.
9. Kim D., Kim Y., Tin Y.-Y., Soe M.-T.-P., Ko B., Park S., Lee J. Recent Technologies for Amorphization of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics*. 2021;13(8):1318. DOI: 10.3390/pharmaceutics13081318.
10. Baghel S., Cathcart H., O'Reilly N. J. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(9):2527–2544. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.10.008.
11. Sheskey P. J., Cook W. G., Cable C. G., editors. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London: Pharmaceutical Press; 2017. 1216 p.
12. Nair A. R., Lakshman Y. D., Anand V. S. K., Sree K. S. N., Bhat K., Dengale S. J. Overview of extensively employed polymeric carriers in solid dispersion technology. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21:309. DOI: 10.1208/s12249-020-01849-z.
13. Bhujbal S. V., Mitra B., Jain U., Gong Y., Agrawal A., Karki S., Taylor L. S., Kumar S., Zhou Q. (T.). Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(8):2505–2536. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.05.014.
14. Peres B. A., Procyuk A. P., Zelencova A. B., Kauhova I. E., Aroyan M. V., Novikova E. K. Development of Technology of Phytosubstantiation of *Silybum marianum* L. Fruits as a Component of Complex Therapy of Liver Diseases. *Drug development & registration*. 2023;12(4):101–110. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1582.
15. Krasnyuk (Jr.) I. I., Naryshkin S. R., Krasnyuk I. I., Belyatskaya A. V., Stepanova O. I., Bobrov I. S., Yankova V. G., Rau J. V., Vorobiev A. N. Effect of solid dispersions on the solubility of metronidazole. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):195–204. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-195-204.
16. Sherikar A., Mohd Siddique M. U., More M., Goyal S. N., Milivojevic M., Alkahtani S., Alarifi S., Hasnain M. S., Kumar Nayak A. Preparation and Evaluation of Silymarin-Loaded Solid Eutectic for Enhanced Anti-Inflammatory, Hepatoprotective Effect: In Vitro–In Vivo Prospect. *Oxid Med Cell Longev*. 2021:1818538. DOI: 10.1155/2021/1818538.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.322

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1851

Check for updates

CC BY 4.0

Фармацевтическая разработка спрея сангвиритрина для лечения воспалительных заболеваний ротовой полости

М. Н. Анурова[1], Я. А. Дорохина[1]✉, А. С. Гуленков[2], Н. Б. Демина[1], Л. А. Король[1], П. Г. Мизина[2]

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

[2] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР). 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Дорохина Яна Андреевна. **E-mail:** dorohinaiana@yandex.ru

ORCID: М. Н. Анурова – https://orcid.org/0000-0002-7649-9616;
Я. А. Дорохина – https://orcid.org/0009-0005-8645-6512;
А. С. Гуленков – https://orcid.org/0000-0002-1532-9330;
Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791;
Л. А. Король – https://orcid.org/0000-0001-5919-1866;
П. Г. Мизина – https://orcid.org/0000-0001-6510-9603.

Статья поступила: 07.06.2024 **Статья принята в печать:** 09.01.2025 **Статья опубликована:** 10.01.2025

Резюме

Введение. Одними из самых распространённых бактериальных инфекций являются острый и хронический тонзиллиты: по данным ВОЗ, тонзиллитом в мире страдают от 10 до 15 % взрослых и около 20–25 % детей. Объектом исследования являлась оригинальная субстанция сангвиритрина, содержащая не менее 96,5 % суммы бисульфатов двух алкалоидов – сангвинарина и хелеритрина. В связи с высокой противомикробной активностью сангвиритрина актуальной задачей исследования стало создание системы местной доставки на основе данного лекарственного средства в виде спрея.

Цель. Цель работы – разработка оральной лекарственной формы сангвиритрина для местного применения.

Материалы и методы. В качестве активной фармацевтической субстанции использовали сангвиритрин, разработанный во Всероссийском научно-исследовательском институте лекарственных и ароматических растений. Оценку экспериментальных образцов спрея осуществляли в соответствии с рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 17 «О руководстве по качеству лекарственных препаратов для ингаляций и назальных лекарственных препаратов». Изучение органолептических свойств субстанции и образцов спрея проводили по методу А. И. Тенцовой. Местное раздражающее действие спрея оценивали методом конъюнктивальной пробы на кроликах породы шиншилла массой 3,5–4,3 кг. Для количественного определения сангвиритрина в составе лекарственной формы был использован метод спектрофотомерии при длине волны 321 ± 2 нм на спектрофотометре SPECORD® 200 PLUS (Analytik Jena GmbH+Co. KG, Германия). Для разработанного состава в первичной упаковке оценивали показатели качества в соответствии с Государственной фармакопеей РФ XV издания.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных измерений технологических показателей спреев был выбран оптимальный состав вспомогательных компонентов, а именно: система растворителей, биоадгезивный компонент и вспомогательные вещества для коррекции вкуса. Основной недостаток имеющейся на рынке лекарственной формы сангвиритрина – это ее жгучий горький вкус. При коррекции органолептических свойств субстанции был обоснован комплексный подход с введением минимального количества подсластителей и дополнительного β-циклодекстрина. Изучение воздействия разработанной лекарственной формы на слизистую оболочку показало, что степень местнораздражающего действия спрея соответствует значению «слабое или отсутствует».

Заключение. Разработана система местной доставки сангвиритрина для лечения инфекционных и воспалительных заболеваний полости рта в виде спрея, принципиально отличающаяся от лекарственной формы, имеющейся на рынке, – раствора для местного и наружного применения. В первую очередь спрей отличается удобством применения для всех возрастных групп, имеет приятный вкус и обладает биоадгезивными свойствами и, соответственно, потребительскими и фармакологическими преимуществами.

© Анурова М. Н., Дорохина Я. А., Гуленков А. С., Демина Н. Б., Король Л. А., Мизина П. Г., 2025
© Anurova M. N., Dorokhina Ya. A., Gulenkov A. S., Demina N. B., Korol L. A., Mizina P. G., 2025

Ключевые слова: спрей, сангвиритрин, система местной доставки, антибиотикорезистентность, биоадгезия

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

Вклад авторов. Я. А. Дорохина и М. Н. Анурова провели экспериментальную часть исследования и обработали данные. М. Н. Анурова, Н. Б. Демина и П. Г. Мизина участвовали в разработке и составлении дизайна исследования. Все авторы участвовали в написании текста статьи и в обсуждении результатов.

Для цитирования: Анурова М. Н., Дорохина Я. А., Гуленков А. С., Демина Н. Б., Король Л. А., Мизина П. Г. Фармацевтическая разработка спрея сангвиритрина для лечения воспалительных заболеваний ротовой полости. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):160–170. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1851

Pharmaceutical development of sangviritrin spray for the treatment of inflammatory diseases of the oral cavity

Maria N. Anurova[1], Yana A. Dorokhina[1]✉, Alexander S. Gulenkov[2], Natalia B. Demina[1], Lyudmila A. Korol[1], Praskovya G. Mizina[2]

[1] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[2] All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants. 7/1, Grina str., Moscow, 117216, Russia

✉ **Corresponding author:** Yana A. Dorokhina. **E-mail:** dorohinaiana@yandex.ru

ORCID: Maria N. Anurova – https://orcid.org/0000-0002-7649-9616;
Yana A. Dorokhina – https://orcid.org/0009-0005-8645-6512;
Alexander S. Gulenkov – https://orcid.org/0000-0002-1532-9330;
Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791;
Lyudmila A. Korol – https://orcid.org/0000-0001-5919-1866;
Praskovya G. Mizina – https://orcid.org/0000-0001-6510-9603.

Received: 07.06.2024 **Accepted:** 09.01.2025 **Published:** 10.01.2025

Abstract

Introduction. One of the most common bacterial infections includes acute and chronic tonsillitis, affecting 10 to 15 % of adults and approximately 20–25 % of children worldwide, according to the World Health Organization. The focus of this study was an original substance, sangviritrin, containing no less than 96.5 % of the sum of bisulfates of two alkaloids: sanguinarine and chelerythrine. Given the high antimicrobial activity of sangviritrin, the research aimed to develop a local delivery system based on this medicinal substance.

Aim. The aim of this work was to develop an oral medicinal form of sangviritrin.

Materials and Methods. Sangviritrin, produced by the All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, was used as the active pharmaceutical ingredient. The selection of auxiliary components was carried out in accordance with the methodologies specified in the State Pharmacopoeia XV edition. The organoleptic properties of the substance and spray samples were studied using A. I. Tenzova's method. The local irritant action of the spray was assessed using the conjunctival test method on chinchilla rabbits weighing 3.5–4.3 kg. Quantitative determination of sangviritrin in the medicinal form was performed using spectrophotometric methods at a wavelength of 321 ± 2 nm on a spectrophotometer SPECORD® 200 PLUS (Analytik Jena GmbH+Co. KG, Germany).

Results and Discussion. Optimal auxiliary component compositions were selected based on measurements of spray technological parameters. A comprehensive approach was justified for correcting the organoleptic properties of the substance, involving the introduction of a minimal amount of sweeteners and additional use of β-cyclodextrin. Examination of the local irritant action indicated a "weak or absent" degree of local irritation.

Conclusion. A local delivery system for sangviritrin has been developed for the treatment of infectious and inflammatory diseases of the oral cavity.

Keywords: spray, sangviritrin, local delivery system, antibiotic resistance, bioadhesion

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. Yana A. Dorokhina and Maria N. Anurova conducted the experimental part of the study and processed the data. Maria N. Anurova, Natalia B. Demina and Praskovya G. Mizina participated in the development and design of the study. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

For citation: Anurova M. N., Dorokhina Ya. A., Gulenkov A. S., Demina N. B., Korol L. A., Mizina P. G. Pharmaceutical development of sangviritrin spray for the treatment of inflammatory diseases of the oral cavity. *Drug development & registration*. 2025;14(1):160–170. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1851

ВВЕДЕНИЕ

Проблема резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам является актуальной в настоящее время. Устойчивость бактерий к антибиотикам приводит к снижению эффективности методов лечения бактериальных инфекций, увеличению заболеваемости и смертности и в ряде случаев к продолжительному бактерионосительству [1]. В июле 2017 г. на саммите G20 в Гамбурге было подчеркнуто, что мировому сообществу необходимо объединить усилия по поиску новых альтернативных методов лечения бактериальных заболеваний. В России для решения этой проблемы была разработана и внедрена программа «Стратегия контроля антимикробной терапии» для стационаров. Кроме того, была принята Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года, задачей которой является «разработка противомикробных препаратов и альтернативных методов, технологий и средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний человека, животных и растений».

Одними из самых распространённых бактериальных инфекций являются острый и хронический тонзиллиты, возбудителем которых в том числе является β-гемолитический стрептококк группы А, на протяжении многих лет отличающийся широким распространением во всем мире. [2]. Согласно данным статистики, опубликованным ВОЗ, тонзиллитом страдают от 25 до 30% детей и 10–15% взрослого населения планеты [3]. Наиболее эффективным способом лечения инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта является применение антисептических и антибактериальных лекарственных препаратов с системой местной доставки. На современном фармацевтическом рынке представлен ограниченный ассортимент таких препаратов, преимущественно на основе синтетических антисептических средств и комплексных растительных препаратов. Поиск новых средств, обладающих выраженным антибактериальным и противомикробным эффектом, является одним из целевых направлений Стратегии контроля антимикробной терапии в России.

Таким препаратом может быть сангвиритрин, оригинальная субстанция, разработанная во Всероссийском научно-исследовательском институте лекарственных и ароматических растений. Она обладает широким спектром антимикробной активности, ингибируя развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжеподобных и мицелиальных грибов, патогенных простейших. В терапевтических дозах сангвиритрин действует бактериостатически. Установлено, что сангвиритрин подавляет рост и развитие широкого спектра микроорганизмов, включая клинические штаммы, обладающие высокой степенью лекарственной резистентности, в том числе бактерии рода *Staphylococcus, Streptococcus, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Pyocioneus, Shigella, Escherichia, Enterobacter, Acinetobacter, Serratia,* патогенные простейшие рода *Trichomonas* и *Entamoeba*, а также патогенные грибы рода *Candida, Trichophyton, Microsporum* и ряд других, в частности возбудителей глубоких микозов (*Nocardia, Cryptococcus, Actinomyces*) [4]. В основе механизма действия сангвиритрина лежит ингибирование активности бактериальных нуклеаз, нарушение процессов проницаемости стенок клетки, изменение строения нуклеотидов микроорганизмов [5].

На фармацевтическом рынке препараты сангвиритрина представлены двумя лекарственными формами: раствором для местного и наружного применения и таблетками, покрытыми кишечнорастворимой оболочкой. Раствор для местного и наружного применения предназначен для лечения инфекционных и воспалительных заболеваний полости рта и глотки, однако он имеет существенные недостатки: неудобство использования с потребительской точки зрения в связи с необходимостью разведения водой и жгучим, горьким, неприятным вкусом с ярко выраженным послевкусием. Раствор предназначен для полоскания, соответственно, дети не смогут его использовать, по крайней мере до трех лет. Из-за неудовлетворительного вкуса у данного препарата, несмотря на высокую эффективность, низкая комплаентность. Кроме того, в составе препарата содержится значительное количество этанола, что также ограничивает возможности его назначения. Таким образом, разработка лекарственного препарата местного действия сангвиритрина с противовоспалительными, антибактериальными, противогрибковыми и иммуномодулирующими свойствами, который возможно применять у пациентов любой возрастной категории, с улучшенными потребительскими и биофармацевтическими характеристиками, является актуальной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась оригинальная субстанция сангвиритрина, содержащая смесь бисульфатов бензо[с]фенантридиновых алкалоидов сангвинарина и хелеритрина, выделяемых из травы маклейи сердцевидной (*Macleya cordata* Willd.) и маклейи мелкоплодной (*Macleya microcarpa* Fedde.) семейства маковых (*Papaveraceae*), производства АО «Фармцентр ВИЛАР». Субстанция лекарственного вещества представляет собой ярко-оранжевый негигроскопичный порошок, плохо растворимый в воде, хорошо растворимый в этаноле.

В качестве растворителей и сорастворителей рассматривали возможность использования воды очищенной (АКВАД-30, Россия), глицерина (ООО ТД «ХИММЕД», Россия), пропиленгликоля (ООО ТД «ХИММЕД», Россия), спирта этилового (АО «Биохим», Россия). В качестве загустителей и биоадгезивных компонентов изучали возможность применения полоксамера мар-

ки Kolliphor® P 407 (BASF, Германия), карбомера марки Carbopol® 974 (Lubrisol Corporation, США), гидроксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ) (Natrosol™ 250 HHX, Ashland, США), натрийкарбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ) марки Blanose (Ashland, США), гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ) (Benecel™, Ashland, США) в различных концентрациях. Все растворители и вспомогательные вещества, использованные в работе, разрешены для применения в составе лекарственных препаратов, и растворители, и эксципиенты соответствуют требованиям Европейской фармакопеи.

Фармацевтическую разработку лекарственной формы проводили на основании принципа «качество, запланированное при разработке» (с англ. «Quality by Design») в соответствии с ICH Q8[1]. Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии № 17 «О руководстве по качеству лекарственных препаратов для ингаляций и назальных лекарственных препаратов»[2] и ряд актуальных публикаций по данной теме [6, 7] предлагают оценивать качество спреев на этапе разработки по следующим параметрам: установлению физических характеристик, стабильности, биоадгезивным характеристикам, изучению экстрагируемых веществ и вымываемых веществ, выбору первичной упаковки, обоснованию наличия или отсутствия консерванта.

Седиментационную устойчивость полученных образцов спреев определяли визуально по отсутствию осадка, изменения цвета и однородности раствора при хранении в следующих условиях: при температуре 25 ± 2 °C, относительной влажности 60 % в климатической камере BINDER FP 56. Сангвиритрин обладает низкой растворимостью, и в процессе хранения возможно гипотетическое образование осадка. Кинематическую вязкость спреев изучали на капиллярном вискозиметре Оствальда согласно ОФС.1.2.1.0015 «Вязкость» Государственной фармакопеи XV издания. Определение цветности или степени окраски жидкости проводили по методу 1, описанному в ОФС.1.2.1.0006 «Степень окраски жидкостей» Государственной фармакопеи XV издания, в качестве эталона сравнения использовали свежеприготовленный эталон Y5. Прозрачность и степень мутности экспериментальных образцов определяли визуально по методике, описанной в ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей» Государственной фармакопеи XV издания.

Следующим этапом исследования стало изучение биоадгезивных свойств полученных экспериментальных образцов спреев. Для имитации слизистой оболочки был использован 20,0 % раствор муцина свиного желудка II типа (SIGMA, Sigma-Aldrich, США). Силу мукоадгезии определяли по усилию отрыва спрея от слоя муцина, рассчитывая нагрузку, выдерживаемую в момент отрыва мукоадгезивной системой. Система состояла из эпителия, то есть геля муцина, нанесенного на стекло, которое заранее покрыли нетканым материалом, а образцы спрея, нанесенного на аналогичный материал, закрепленный на втором стекле слоем 2 × 2 см, выполняли роль адгезива. Силу мукоадгезии вычисляли по формуле (1):

$$F = m \cdot g, \quad (1)$$

где F – сила в момент отрыва, Н; m – масса груза, при которой произошел отрыв образца от муциновой поверхности, кг; g – постоянная Ньютона, 9,8 Н/кг [8, 9].

Первым технологическим подходом для коррекции вкуса спрея сангвиритрина было введение в состав корригентов вкуса и запаха. Для коррекции органолептических свойств в качестве подсластителей использовали сахарозу (sucrose, Béghin Say, Франция), соответствующую требованиям Европейской фармакопеи, натрия сахаринат (ООО ТД «ХИММЕД», Россия); в качестве ароматизаторов – ванилин (ООО ПК «Фарм-про», Россия), ароматизатор «апельсин» (ООО «Скорпио-Аромат», Россия), ментол (ООО ТД «ХИММЕД», Россия) и эфирное масло мяты (ООО ПК «Фарм-про», Россия), соответствующие ГОСТ Р 53904-2010. Вторым технологическим приемом коррекции вкуса стало получение комплекса с β-циклодекстрином (Sigma-Aldrich, США) – этот прием достаточно широко используется для маскировки горького вкуса высокомолекулярных соединений и для повышения их растворимости [10–12]. Для этого субстанцию сангвиритрина смешивали с полимером в различных соотношениях в водной среде в течение 5 ч на магнитной мешалке ES-6120 (ГК «Экрос», Россия). Оценку вкуса всех исследуемых композиций проводили органолептическим методом А. И. Тенцовой [13]. Из полученных показателей выводили индекс вкуса, являющийся среднеарифметическим всех показателей, для лиц, участвующих в испытании (20 человек). Учитывали показатели «сладость» (1 – несладкий, 5 – очень сладкий), «наличие послевкусия» (1 – отсутствует, 5 – присутствует сильное), «характер послевкусия» (1 – неприятный, 5 – очень приятный), «вкус в целом» (1 – неприятный, 5 – приятный).

Экспериментальные образцы спреев получали последовательным растворением субстанции действующего и вспомогательных веществ в воде очищенной на магнитной мешалке ES-6120 (ГК «Экрос», Россия) без нагревания. Полимеры, требующие других температурных режимов растворения, а именно полоксамер и гидроксипропилметилцеллюлозу, получа-

[1] ICH. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/ Q8_R1/Step4/ Q8_R2_Guideline. Accessed: 30.08.2009.

[2] Коллегия Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. N 17 «О руководстве по качеству лекарственных препаратов для ингаляций и назальных лекарственных препаратов». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/551086567. Ссылка активна на 30.08.2009.

ли в виде концентратов при температуре 60–65 °С, затем охлаждали и вводили в состав спрея.

В качестве упаковочных материалов использовали флаконы из светозащитного стекла объемом 30 мл (ООО «ТК «БЕЛАНД», Россия) и пластиковые насадки различных типов: L, SR, LF, J, 3" (Shenzhen Bona Pharma Technology Co., Ltd., Китай), сертифицированные для упаковки лекарственных препаратов.

Стабильность лекарственной формы в первичной упаковке определяли в соответствии с ОФС.1.1.0009 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» Государственной фармакопеи XV издания в рамках ускоренных испытаний при температуре 40 ± 2 °С и относительной влажности 75 ± 5 % в климатической камере BINDER FP 56, анализируя следующие параметры: описание, количественное определение, среднюю массу доставляемой дозы, pH, однородность доставляемых доз, однородность дозирования, герметичность упаковки, количество доз. Параметры контроля лекарственной формы выбраны на основе разработанной спецификации в соответствии с ОФС.1.4.1.0046 «Спреи».

Для количественного определения субстанции сангвиритрина в составе лекарственной формы использовали метод спектрофотомерии при длине волны 321 ± 2 нм [14] на спектрофотометре SPECORD® 200 PLUS (Analytik Jena GmbH+Co. KG, Германия). Методика количественного определения была валидирована в соответствии с требованиями ОФС. 1.1.0012 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи XV издания по показателям «специфичность», «аналитическая область», «линейность», «сходимость», «промежуточная прецизионность».

Определение местного раздражающего действия спрея проводили методом конъюнктивальной пробы на кроликах породы шиншилла массой 3,5–4,3 кг в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств»[1] и решением локального этического комитета ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 27 от 24.10.2023). Местнораздражающее действие оценивали на 12 кроликах. Спрей для местного и наружного применения в количестве 0,1 мл закапывали три раза в день в течение 7 дней. Один глаз служил для нанесения средства, другой – в качестве контроля, в него вводили 0,1 мл воды очищенной. Отмечали выраженность гиперемии, отека конъюнктивы, инъекцию сосудов склеры, состояние роговицы и радужной оболочки, количество и качество выделений из глаза в течение 14 дней, которые оценивали в баллах.

[1] Коллегия Евразийской экономической комиссии решение от 26 ноября 2019 года N 202 «Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/563887387. Ссылка активна на 20.04.2024.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве системы местной доставки выбран оральный спрей, так как спреи обладают рядом преимуществ, а именно: высокой биодоступностью, точностью дозирования, простотой технологии, отсутствием пропеллента, возможностью коррекции органолептических свойств. Основное преимущество – это возможность использования у различных возрастных групп, а именно у детей с трех лет и у пожилых пациентов, что делает их привлекательными с точки зрения маркетинга по сравнению с другими системами местной доставки.

При разработке спрея необходимо было обосновать выбор растворителя, который осуществляли по степени растворимости лекарственного вещества в соответствии с ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость» Государственной фармакопеи XV издания. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты определения растворимости сангвиритрина в различных растворителях

Table 1. Results of determining the solubility of sanguiritrin in various solvents

Растворитель Solvent	**Растворимость** Solubility
Вода очищенная Purified water	Очень мало растворим Very slightly soluble
Глицерин Glycerol	Очень мало растворим Very slightly soluble
Спирт этиловый 10%-й Ethyl alcohol 10 %	Очень мало растворим Very slightly soluble
Спирт этиловый 20%-й Ethyl alcohol 20 %	Мало растворим Slightly soluble
Водный раствор ПЭГ-400 5%-й Aqueous solution of PEG-400 5 %	Очень мало растворим Very slightly soluble
Водный раствор ПЭГ-400 10%-й Aqueous solution of PEG-400 10 %	Мало растворим Slightly soluble
Водный раствор пропиленгликоля 10%-й Aqueous solution of propylene glycol 10 %	Очень мало растворим Very slightly soluble
Водный раствор пропиленгликоля 10%-й Aqueous solution of propylene glycol 10 %	Очень мало растворим Very slightly soluble
Водный раствор глицерина 10%-й и ПЭГ-400 10%-й Aqueous solution of glycerin 10% and PEG-400 10 %	Очень мало растворим Very slightly soluble
Водный раствор глицерина 20%-й и ПЭГ-400 10%-й Aqueous solution of glycerin 20% and PEG-400 10 %	Мало растворим Slightly soluble

Сангвиритрин имеет лучшую растворимость в 20%-м растворе этанола и в водном растворе глицерина 20%-м и ПЭГ-400 10%-м. Так как этанол обладает раздражающим действием на слизистую оболочку ро-

товой полости, выбрали третий растворитель, в котором содержится, помимо ПЭГ-400, глицерин, который способен защищать раздраженные, воспаленные участки в ротовой полости и обладает смягчающим действием при першении в горле и ангине [15]. На основе выбранной системы растворителей изготавливали экспериментальные образцы спрея, приведенные в таблице 2.

Для экспериментальных образцов оценивали показатели качества (таблица 3).

Полученные образцы спреев сравнивали, основываясь на данных, полученных при измерении технологических параметров. В качестве наиболее оптимального из изученных составов был выбран образец № 4, поскольку он был седиментационно стабилен, обладал достаточной вязкостью $42{,}27 \pm 0{,}15$ мм^2/с и максимальной силой мукоадгезии $3{,}95 \pm 0{,}19$ Н. В состав препарата решено не вводить консервант, так как выбранная первичная упаковка должна обеспечить герметичность и отсутствие возможности попадания внешней микрофлоры через насадку при многократном использовании.

Определение органолептических свойств субстанции сангвиритрина показало, что она имеет выраженный горький вкус и неприятное, жгучее послевкусие, поэтому были рассмотрены два концептуальных подхода к решению этого вопроса. Первый заключался в изменении органолептических свойств посредством введения корригентов вкуса, а именно подсластителей и ароматизаторов (таблица 4).

Как видно из данных таблицы, введением корригентов не удалось добиться удовлетворительного вкуса лекарственной формы. Поэтому использовали другой подход – реакцию комплексообразования с β-циклодекстрином. Комплексообразование с β-циклодекстрином широко используется для коррекции вкуса, в том числе в детских лекарственных формах и в коммерческих продуктах [16, 17]. Комплексообразование проводили при соотношениях полимера и субстанции 1:1, 1:2, 2:1, в качестве среды использовали смесь воды очищенной, глицерина и ПЭГ-400, перемешивание проводили на магнитной мешалке в течение 1, 3, 5 и 7 ч. У полученных растворов оценивали вкус, а также определяли увеличение растворимости сангвиритрина. Лучшими органолептическими свойствами обладал раствор, полученный при соотношении полимера и лекарственного вещества 2:1, и при перемешивании в течение 5 ч он имел слабый горьковатый вкус, без выраженного послевкусия. Данные, полученные при изучении органолептических свойств растворов с циклодекстрином, представлены в таблице 5. Отдельно проводили изучение отсутствия химического взаимодействия между сангвиритрином и β-циклодекстрином. Методом спектрофотомерии не было обнаружено возникновения дополнительных пиков или изменения характера и интенсивности спектра поглощения. Таким образом, при введении β-циклодекстрина в состав спрея наблюдается образование клатрата за счет слабых ван-дер-ваальсовых сил и гидрофобных вза-

Таблица 2. Экспериментальные составы спрея сангвиритрина

Table 2. Experimental compositions of sanguiritrin spray

№ / Компоненты, г / Components, g	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Сангвиритрин Sanguiritrin	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Глицерин Glycerol	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
ПЭГ-400 PEG-400	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Полоксамер 407 Poloxamer 407	2,0	2,0	4,0	4,0	4,0	2,0	4,0	2,0	2,0	4,0	2,0	4,0
Карбопол 974 Carbopol 974	0,1	–	0,1	–	–	–	–	–	0,05	0,15	–	–
ГЭЦ 0 GEC 0	–	0,5	–	0,5	–	–	0,3	0,7	–	–	–	–
NaКМЦ NaKMC	–	–	–	–	1,0	1,0	–	–	–	–	0,75	1,25
Вода очищенная Purified water	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100

Таблица 3. Показатели качества экспериментальных составов спрея сангвиритрина

Table 3. Quality indicators of experimental compositions of sanguiritrin spray

№ образца Sample No. / **Показатель** Indicator	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Агрегативная стабильность 30 суток Aggregative stability 30 days	Прозрачная Transparent	Видимая опалесценция Visible opalescence	Видимая опалесценция Visible opalescence	Прозрачная Transparent	Прозрачная Transparent	Видимая опалесценция Visible opalescence
Кинематическая вязкость, мм²/с Kinematic viscosity, mm²/s	10,73 ± 0,25	7,78 ± 0,37	96,41 ± 0,91	42,27 ± 0,15	26,54 ± 0,18	13,44 ± 0,55
pH	6,7 ± 0,1	6,5 ± 0,1	6,7 ± 0,1	6,4 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,1
Сила мукоадгезии, Н Mucoadhesion force, N	3,68 ± 0,11	3,63 ± 0,22	3,72 ± 0,27	3,95 ± 0,19	3,43 ± 0,21	3,23 ± 0,17
№ образца Sample No. / **Показатель** Indicator	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Агрегативная стабильность 30 суток Aggregative stability 30 days	Прозрачная Transparent	Видимая опалесценция Visible opalescence	Видимая опалесценция Visible opalescence	Прозрачная Transparent	Прозрачная Transparent	Видимая опалесценция Visible opalescence
Кинематическая вязкость, мм²/с Kinematic viscosity, mm²/s	11,73 ± 0,02	21,22 ± 0,15	35,19 ± 0,24	19,24 ± 0,17	10,11 ± 0,21	40,05 ± 0,15
pH	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,1	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,1	6,6 ± 0,1
Сила мукоадгезии, Н Mucoadhesion force, N	3,66 ± 0,11	3,68 ± 0,11	3,58 ± 0,22	3,68 ± 0,24	3,66 ± 0,22	3,56 ± 0,21

имодействий, приводящее к маскировке вкуса и увеличению растворимости сангвиритрина в подобранной системе растворителей в 2,15 раза [16–18].

При коррекции органолептических свойств составов спреев применяли комплексный подход с добавлением минимального количества подсластителей и дополнительного введения β-циклодекстрина. В качестве основного состава корригентов был выбран спрей с дополнительным введением 0,5 г эфирного масла мяты перечной и 0,02 г натрия сахарината. Показатели вкуса полученного спрея отражены на лепестковой диаграмме (рисунок 1).

На следующем этапе исследования проводили выбор упаковки спрея российского и китайского производства. Предполагаемые варианты упаковки для спрея – флакон из темного стекла объемом 30 мл с различными типами насадок. Применение темного стекла оптимально с учетом химического строения молекул сангвинарина и хелеритрина. Применение пластмассовых флаконов в данном случае нецелесообразно, так как сангвиритрин является субстанцией растительного происхождения и, возможно, способен проникать в структуру полимерных материалов. Далее проводили выбор насадки для спрея, основываясь на показателях размера факела распыления и длительности распыления. Всего было изучено пять образцов насадок с различными параметрами диаметра форсунки и длины горлышка. Изученные параметры насадок представлены в таблице 6.

По результатам изучения образцов насадок для спрея сангвиритрина установили, что насадка 3" обладает оптимальным размером факела распыления (55 ± 1 мм), а также имеет более длительный период распыления (0,22 с), благодаря чему способна высвобождать большее количество действующего вещества.

Одним из важнейших параметров лекарственного препарата является его стабильность. В рамках изучения программы стабильности разработанной лекарственной формы получены данные по хранению препарата в выбранной первичной упаковке в ускоренных условиях. Была показана сохранность всех показателей качества готовой лекарственной формы, входящих в нормативный документ по качеству в рамках критериев приемлемости, в течение 6 месяцев: описания, pH, однородности массы дозы, количества доз в упаковке, размера частиц, однородности дозирования.

Таблица 4. Оценка вкуса субстанции сангвиритрина и экспериментальных образцов спрея

Table 4. Evaluation of the taste of the sanguiritrin substance and experimental spray samples

Состав образца / Sample composition	Сладость / Sweetness	Наличие послевкусия / Presence of aftertaste	Характер послевкусия / Character of aftertaste	Вкус в целом / Overall taste
Раствор 0,02%-й сангвиритрина / Solution 0.02 % sanguiritrin	1	5	1	1
Состав 4 с дополнительным введением 0,5 г эфирного масла мяты перечной и 0,02 г натрия сахарината / Composition 4 with additional addition of 0.5 g peppermint essential oil and 0.02 g sodium saccharinate	5	2	2	2
Состав 4 с дополнительным введением ментола 0,5 г и сахарозы 0,1 г / Composition 4 with additional addition of menthol 0.5 g and sucrose 0.1 g	5	2	3	3
Состав 4 с дополнительным введением ментола 0,5 г и сахарозы 0,2 г / Composition 4 with additional addition of menthol 0.5 g and sucrose 0.2 g	5	3	3	2
Состав 4 с дополнительным введением 1,0 г эфирного масла мяты перечной и 0,04 г натрия сахарината / Composition 4 with additional addition of 1.0 g of peppermint essential oil and 0.04 g of sodium saccharinate	5	2	2	2

Заключительным этапом данного исследования стала сравнительная оценка местнораздражающего действия спрея для местного и наружного применения на слизистую оболочку глаза кролика. Была использована слизистая оболочка глаза, а не ротовой полости в связи с большей чувствительностью и простотой визуального наблюдения. Результаты исследования местнораздражающего действия спрея приведены в таблице 7.

По данным таблицы установили, что степень местнораздражающего действия спрея меньше выражена, чем у раствора для местного и наружного применения, и соответствует значению «слабое или отсутствует».

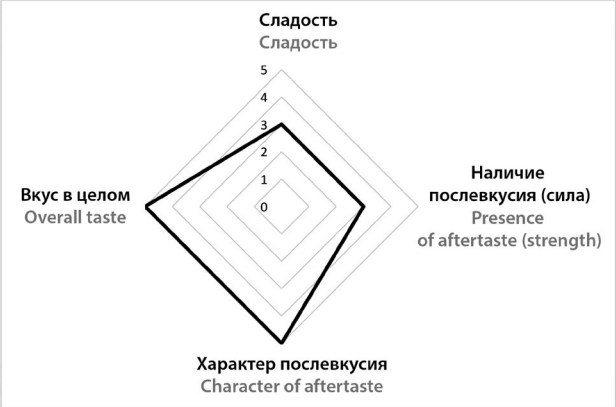


Рисунок 1. Результаты определения вкуса образца орального спрея сангвиритрина в соотношении с полимером 2 : 1

Figure 1. Results of determining the taste of a sample of sanviritrin oral spray in a 2 : 1 ratio with polymer

Таблица 5. Оценка органолептических свойств полученных растворов сангвиритрина с β-циклодекстрином

Table 5. Evaluation of the organoleptic properties of the resulting solutions of sanguiritrin with β-cyclodextrin

Соотношение полимер : ЛВ / Polymer : drug ratio	Время перемешивания / Mixing time	1 час / 1 hour	3 часа / 3 hours	5 часов / 5 hours	7 часов / 7 hours
1 : 2	Сладость / Sweetness	1	1	1	1
	Наличие послевкусия / Presence of aftertaste	4	4	4	4
	Характер послевкусия / Character of aftertaste	2	2	2	2
	Вкус в целом / Overall taste	1	1	1	1
1 : 1	Сладость / Sweetness	1	2	2	2
	Наличие послевкусия / Presence of aftertaste	4	4	4	4
	Характер послевкусия / Character of aftertaste	2	2	2	2
	Вкус в целом / Overall taste	1	2	2	2
2 : 1	Сладость / Sweetness	2	2	2	2
	Наличие послевкусия / Presence of aftertaste	4	4	4	4
	Характер послевкусия / Character of aftertaste	2	2	4	4
	Вкус в целом / Overall taste	2	2	3	3

Таблица 6. **Технологические параметры насадок и образцов спрея**

Table 6. **Technological parameters of nozzles and spray samples**

Образец насадки № Nozzle sample No.	**L** 	**SR** 	**J** 	**3»** 	**LF**
Технологические параметры насадки: – диаметр форсунки, мм; – длина горлышка, мм Technological parameters of the nozzle: – nozzle diameter, mm; – neck length, mm	 5 65 5 65	 7 35 7 35	 7 55 7 55	 8 75 8 75	 5 35 5 35
Диаметр факела распыления, мм: – начало распыления; – середина распыления; – конец распыления Spray torch diameter, mm: – start of spraying; – middle of spray; – end of spray	 35 35 37 35 35 37	 37 37 38 37 37 38	 40 41 41 40 41 41	 54 55 56 54 55 56	 40 40 41 40 40 41
Длительность распыления, с Spray duration, s	0,14	0,12	0,15	0,22	0,11

Таблица 7. **Результаты оценки интенсивности местнораздражающего действия спрея и раствора для местного и наружного применения сангвиритрина**

Table 7. **Results of assessing the intensity of the local irritating effect of the spray and solution for local and external use of sanviritrin**

Кролик № **Баллы** Rabbit No. Points **Признаки местнораздражающего действия** Signs locally irritating actions	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**Ср.** Average	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**Ср.** Average
	Спрей Spray							**Раствор для местного и наружного применения** Solution for local and external use						
Покраснение века и бульбарная конъюнктива, не затрагивающая роговицу и радужную оболочку Redness of the eyelid and bulbar conjunctiva, sparing the cornea and iris	1	1	1	0	0	1	0,7	3	2	2	1	3	1	1,7
Отек век Swelling of the eyelids	1	1	1	1	1	0	0,8	1	1	1	1	1	2	1,0
Выделения Discharge	1	0	0	0	0	0	0,2	1	0	1	0	1	1	0,7
Помутнение роговицы – степень плотности, участок наибольшей плотности Corneal opacification – degree of density, area of greatest density	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0,3
Площадь поражении роговицы Corneal lesion area	0	0	1	0	0	0	0,2	1	2	1	0	2	1	1,2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы был обоснован выбор лекарственной формы системы местной доставки для сангвиритрина в виде спрея, подобраны вспомогательные вещества: растворители ПЭГ-400 и глицерин, загустители, биоадгезивные компоненты ГЭЦ и полоксамер 407. Исследованы способы коррекции органолептических свойств орального спрея с сангвиритрином, обладающим выраженным горьким вкусом. Показано, что для достижения сбалансирован-

ного вкуса возможно введение корригентов натрия сахарината и эфирного масла мяты, а также комплексообразование с β-циклодекстрином. Продемонстрирована стабильность лекарственной формы в ускоренных условиях хранения в течение 6 месяцев. Для полученного спрея изучено местнораздражающее действие на слизистой оболочке. Таким образом, разработан состав спрея сангвиритрина, перспективный для дальнейших исследований. Следующим этапом исследования в соответствии с рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии № 17 станет определение экстрагируемых и вымываемых веществ из первичной упаковки, изучение требования к первичной и повторной прокачке насадки, функциональных характеристик при низких температурах, при температурной цикличности, дальнейшее изучение стабильности препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михалева Т. В., Захарова О. И., Ильясов П. В. Антибиотикорезистентность: современные подходы и пути преодоления (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019;55(2):124–132. DOI: 10.1134/S0555109919020119.
2. Селезнев К. Г., Окунь О. С., Долженко С. А., Андреев П. В., Климов З. Т., Канаева Е. А. Реабилитация пациентов, перенесших острый стрептококковый тонзиллит, как профилактика развития хронического тонзиллита. *Вестник гигиены и эпидемиологии*. 2019;23(1):21–24.
3. Павлова Г. В., Мартюшева В. И. Вторичная профилактика обострений хронического тонзиллита бактериофагальными средствами. *Вестник оториноларингологии*. 2019;84(2):46–49. DOI: 10.17116/otorino20198402146.
4. Вичканова С. А. Данные клинического исследования антимикробного растительного препарата Сангвиритрин. *РМЖ*. 2012;2:75.
5. Бортникова В. В. и др. Изучение иммуномодулирующих свойств лекарственного средства Сангвиритрин. *Untraditional natural resources, innovation technologies and products*. 2016;23:162.
6. Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Волкова П. О. Подходы к разработке препарата низкодозированного налтрексона в форме спрея назального (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):37–47. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-37-47.
7. Абросимова О. Н., Пивоварова Н. С., Буракова М. А., Шебитченко Т. С. Разработка технологии и состава средства для полости рта на основе фитосубстанций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):37–45. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-37-45.
8. Киржанова Е. А., Хуторянский В. В., Балабушевич Н. Г., Харенко А. В., Демина Н. Б. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014;3(8):66–81.
9. Amorós-Galicia L., Nardi-Ricart A., Verdugo-González C., Arroyo-García C. M., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé-Negre J.M., Suñé-Pou M. Development of a Standardized Method for Measuring Bioadhesion and Mucoadhesion That Is Applicable to Various Pharmaceutical Dosage Forms. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):1995. DOI: 10.3390/pharmaceutics14101995.
10. Zheng X., Wu F., Hong Y., Shen L., Lin X., Feng Y. Developments in Taste-Masking Techniques for Traditional Chinese Medicines. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):157. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030157.
11. Liu T., Wan X., Luo Z., Liu C., Quan P., Cun D., Fang L. A donepezil/cyclodextrin complexation orodispersible film: Effect of cyclodextrin on taste-masking based on dynamic process and in vivo drug absorption. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;14(2):183–192. DOI: 10.1016/j.ajps.2018.05.001.
12. Moutasim M. Y., ElMeshad A. N., El-Nabarawi M. A. A pharmaceutical study on lornoxicam fast disintegrating tablets: formulation and in vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*. 2017;7(3):450–459. DOI: 10.1007/s13346-017-0367-6.
13. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Демина Н. Б. Проблемы коррекции органолептических свойств лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;4(13);64–73.
14. Толкачев О. Н., Савина А. А., Копылова И. Е., Охотникова В. Ф., Качалина Т. В., Быков В. А. Сангвиритрин: химико-технологические исследования бензофенантридиновых алкалоидов (обзор). *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2011;2:19–27.
15. Jabbar M. L., Mahboba J. H., Meazher N. Comparing the effectiveness of topical dexamethasone emollient, lidocaine gel, and glycerin emollient on the endotracheal tube for postoperative hoarseness of voice, sore throat, and laryngospasm. *Journal of Medicine and Life*. 2023;16(6):904–907. DOI: 10.25122/jml-2022-0137.
16. Lopalco A., Manni A., Keeley A., Haider S., Li W., Lopedota A., Altomare C.D., Denora N., Tuleu C. In Vivo Investigation of (2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin-Based Formulation of Spironolactone in Aqueous Solution for Paediatric Use. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):780. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040780.
17. Loftsson T., Saokham P., Sá Couto A. R. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes in aqueous solutions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;560:228–234. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.02.004.
18. Muankaew C., Saokham P., Jansook P., Loftsson T. Self-assembly of cyclodextrin complexes: detection, obstacles and benefits. *Pharmazie*. 2020;75(7):307–312. DOI: 10.1691/ph.2020.0405.

REFERENCES

1. Mikhaleva T. V., Zakharova O. I., Ilyasov P. V. Antibiotic Resistance: Modern Approaches and Ways to Overcome it (Review). *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*. 2019;55(2):124–132. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0555109919020119.
2. Seleznev K. G., Okun O. S., Dolzhenko S. A., Andreev P. V., Klimov Z. T., Kanaeva E. A. Rehabilitation of Patients Who Have Suffered Acute Streptococcal Tonsillitis as a Prevention of Chronic Tonsillitis Development. *Vestnik gigieny i epidemiologii*. 2019;23(1):21–24. (In Russ.)
3. Pavlova G. V., Martiusheva V. I. Secondary prevention of chronic tonsillitis exacerbations by bacteriophage medications. *Vestnik otorinolaringologii*. 2019;84(2):46–49. (In Russ.) DOI: 10.17116/OTORINO20198402146.
4. Vichkanova S. A. Clinical Study Data on the Antimicrobial Plant Preparation Sangviritrin. *Russian Medical Journal*. 2012;2:75. (In Russ.)

5. Bortnikova V. V., et al. Study of the Immunomodulatory Properties of the Drug Sangviritrin. *Untraditional Natural Resources, Innovative Technologies and Products*. 2016;23:162.
6. Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Volkova P. O. Approaches to the Development of a Low-dose Naltrexone Preparation in the Form of a Nasal Spray (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(1):37–47. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-37-47.
7. Abrosimova O. N., Pivovarova N. S., Burakova M. A., Shebitchenko T. S. Development of Technology and Composition of the Medicinal Product for Oral Cavity Based on Phytosubstances. *Drug development & registration*. 2021;10(4):37–45. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-37-45.
8. Kirzhanova E. A., Khutorianskiy V. V., Balabushevich N. G., Kharenko A. V., Demina N. B. Methods for Analyzing of Mucoadhesion: from Basic Research to Practical Applications in Dosage Forms Development. *Drug Development & Registration*. 2014;3(8):66–81. (In Russ.)
9. Amorós-Galicia L., Nardi-Ricart A., Verdugo-González C., Arroyo-García C. M., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé-Negre J. M., Suñé-Pou M. Development of a Standardized Method for Measuring Bioadhesion and Mucoadhesion That Is Applicable to Various Pharmaceutical Dosage Forms. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):1995. DOI: 10.3390/pharmaceutics14101995.
10. Zheng X., Wu F., Hong Y., Shen L., Lin X., Feng Y. Developments in Taste-Masking Techniques for Traditional Chinese Medicines. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):157. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030157.
11. Liu T., Wan X., Luo Z., Liu C., Quan P., Cun D., Fang L. A donepezil/cyclodextrin complexation orodispersible film: Effect of cyclodextrin on taste-masking based on dynamic process and in vivo drug absorption. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;14(2):183–192. DOI: 10.1016/j.ajps.2018.05.001.
12. Moutasim M. Y., ElMeshad A. N., El-Nabarawi M. A. A pharmaceutical study on lornoxicam fast disintegrating tablets: formulation and in vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*. 2017;7(3):450–459. DOI: 10.1007/s13346-017-0367-6.
13. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Demina N. B. The problem of taste masking of drugs. *Drug Development & Registration*. 2015;4(13);64–73. (In Russ.)
14. Tolkachev O. N., Savina A. A., Kopylova I. E., Okhotnikova V. F., Kachalina T. V., Bykov V. A. Sangviritrin: Chemical and Technological Studies of Benzophenanthridine Alkaloids (Review). *Voprosy biologicheskoy, medicinskoy i farmacevticheskoy himii*. 2011;2:19–27. (In Russ.)
15. Jabbar M. L., Mahboba J. H., Meazher N. Comparing the effectiveness of topical dexamethasone emollient, lidocaine gel, and glycerin emollient on the endotracheal tube for postoperative hoarseness of voice, sore throat, and laryngospasm. *Journal of Medicine and Life*. 2023;16(6):904–907. DOI: 10.25122/jml-2022-0137.
16. Lopalco A., Manni A., Keeley A., Haider S., Li W., Lopedota A., Altomare C.D., Denora N., Tuleu C. In Vivo Investigation of (2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin-Based Formulation of Spironolactone in Aqueous Solution for Paediatric Use. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):780. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040780.
17. Loftsson T., Saokham P., Sá Couto A. R. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes in aqueous solutions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;560:228–234. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.02.004.
18. Muankaew C., Saokham P., Jansook P., Loftsson T. Self-assembly of cyclodextrin complexes: detection, obstacles and benefits. *Pharmazie*. 2020;75(7):307–312. DOI: 10.1691/ph.2020.0405.

Оригинальная статья / Research article

УДК 547.995.15

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1881

Check for updates

CC BY 4.0

Исследование влияния молекулярной массы гиалуроновой кислоты на кинетику высвобождения мангиферина из полимерной матрицы

П. П. Снетков[1]✉, Р. О. Шайкенов[1], В. И. Климшина[1], Ю. Э. Генералова[1, 2], С. Н. Морозкина[1, 3]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО». 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, д. 49, литера А

[2] 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

[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова». 360004, Россия, Северо-Кавказский федеральный округ, Кабардино-Балкарская Республика, г. Нальчик, ул. Чернышевского, д. 173

✉ **Контактное лицо:** Снетков Петр Петрович. **E-mail:** ppsnetkov@itmo.ru

ORCID: П. П. Снетков – https://orcid.org/0000-0001-9949-5709;
Р. О. Шайкенов – https://orcid.org/0009-0005-1721-1044;
В. И. Климшина – https://orcid.org/0000-0002-9979-3922;
Ю. Э. Генералова – https://orcid.org/0000-0002-2573-6036;
С. Н. Морозкина – https://orcid.org/0000-0003-0122-0251.

Статья поступила: 26.07.2024 **Статья принята в печать:** 24.10.2024 **Статья опубликована:** 15.01.2025

Резюме

Введение. В настоящее время широкое распространение получает применение природных биологически активных веществ (БАВ) в качестве эффективных антибактериальных препаратов как для наружного, так и для внутреннего применения. Особый интерес представляет полифенол мангиферин, извлекаемый из листьев растения *Mangifera indica*. Несмотря на доказанную противомикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий, применение мангиферина ограничено его низкой растворимостью в воде. Для повышения растворимости и, соответственно, биодоступности применяют различные подходы, в частности инкапсулирование в полимерные и биополимерные матрицы. Одним из перспективных биополимеров для инкапсуляции БАВ является гиалуроновая кислота, обладающая полной биосовместимостью с тканями живого организма и способная к полной биодеградации под воздействием ферментов (гиалуронидаз).

Цель. Изучение кинетики высвобождения природного биологически активного соединения мангиферина из полимерной матрицы на основе гиалуроновой кислоты с различной молекулярной массой.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись полимерные плёнки, полученные методом полива 1,5 масс.% формовочных растворов гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 1,30 и 2,48 МДа с различным содержанием мангиферина. Соотношение гиалуроновой кислоты к мангиферину варьировалось в пределах от 5 до 25 (по массе). Количественное определение высвободившегося мангиферина проводили методом УФ/ВИД-спектрофотометрии при длине волны 237 нм. В качестве модельной среды использовался фосфатный буферный раствор с pH 7,4. Кинетику высвобождения мангиферина оценивали с помощью различных математических моделей.

Результаты и обсуждение. Исследование кинетики высвобождения мангиферина из полимерной матрицы на основе гиалуроновой кислоты показало сигмоидальный характер высвобождения биологически активного агента. Механизм высвобождения имеет сложный характер типа Super Case II transport, за исключением образца с низким содержанием мангиферина и гиалуроновой кислотой 1,3 МДа, для которого обнаруживается аномальный характер высвобождения (диффузия не по закону Фика), что обусловлено гидрофильной природой гиалуроновой кислоты, быстрым набуханием полимерной матрицы, а также значительным опережением темпов диффузии мангиферина по сравнению со скоростью релаксации полимера. Наиболее подходящей является модель Weibull, описывающая кинетику высвобождения мангиферина с большей точностью по сравнению с другими математическими моделями.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной возможности использовать разработанные полимерные плёнки в качестве биомедицинских материалов наружного применения, обеспечивая таким образом трансдермальную доставку лекарственных препаратов. В дальнейшем авторы работы планируют разработать методику обеспечения пролонгированного и контролируемого высвобождения загруженного лекарственного агента, в том числе за счет применения различных сшивающих агентов.

© Снетков П. П., Шайкенов Р. О., Климшина В. И., Генералова Ю. Э., Морозкина С. Н., 2025
© Snetkov P. P., Shaikenov R. O., Klimshina V. I., Generalova Yu. E., Morozkina S. N., 2025

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, кинетика высвобождения, коэффициент ёмкости матрицы, мангиферин, полимерная матрица, система доставки, эффективность инкапсуляции

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

Вклад авторов. П. П. Снетков, С. Н. Морозкина – разработка концепции исследования. П. П. Снетков, Ю. Э. Генералова – разработка методологии. П. П. Снетков, В. И. Климшина, Р. О. Шайкенов, Ю. Э. Генералова, С. Н. Морозкина – проведение исследования. П. П. Снетков – обработка экспериментальных данных. П. П. Снетков, В. И. Климшина, Р. О. Шайкенов, Ю. Э. Генералова – подготовка текста статьи к публикации. П. П. Снетков, С. Н. Морозкина – доработка и редактирование текста. П. П. Снетков – визуализация. П. П. Снетков – ресурсное обеспечение исследования. П. П. Снетков – научное руководство и администрирование проекта. Все авторы участвовали в анализе полученных данных и обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, научный проект № 24-23-00269, https://rscf.ru/project/24-23-00269/

Для цитирования: Снетков П. П., Шайкенов Р. О., Климшина В. И., Генералова Ю. Э., Морозкина С. Н. Исследование влияния молекулярной массы гиалуроновой кислоты на кинетику высвобождения мангиферина из полимерной матрицы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):171–180. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1881

The influence of the molecular weight of hyaluronic acid on the mangiferin release kinetics from the polymer matrix

Petr P. Snetkov[1]✉, Roman O. Shaikenov[1], Vladislava I. Klimshina[1], Yuliya E. Generalova[1, 2], Svetlana N. Morozkina[1, 3]

[1] ITMO University. 49A, Kronverkskiy prospekt, Saint-Petersburg, 197101, Russia
[2] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[3] Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov. 173, Chernyshevskogo str., Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, North Caucasus Federal District, 360004, Russia

✉ **Corresponding author:** Petr P. Snetkov. **E-mail:** ppsnetkov@itmo.ru

ORCID: Petr P. Snetkov – https://orcid.org/0000-0001-9949-5709;
Roman O. Shaikenov – https://orcid.org/0009-0005-1721-1044;
Vladislava I. Klimshina – https://orcid.org/0000-0002-9979-3922;
Yuliya E. Generalova – https://orcid.org/0000-0002-2573-6036;
Svetlana N. Morozkina – https://orcid.org/0000-0003-0122-0251.

Received: 26.07.2024 **Accepted:** 24.10.2024 **Published:** 15.01.2025

Abstract

Introduction. Currently, the use of natural biologically active agents (BAA) as effective antibacterial drugs for both external and internal use is becoming widespread. Polyphenol mangiferin, extracted from the leaves of the *Mangifera indica* plant, is the most attractive BAA. Despite high antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative strains of bacteria, the use of mangiferin is limited by its low aqueous solubility. To increase solubility and, accordingly, bioavailability, various approaches are used, in particular, encapsulation in polymer and biopolymer matrices. One of the promising biopolymers for the encapsulation of biologically active substances is hyaluronic acid, which is completely biocompatible with the tissues of a living organism and is capable of complete biodegradation under the influence of enzymes (hyaluronidases).

Aim. Study of the release kinetics of the biologically active agent (mangiferin) from a polymer matrix based on hyaluronic acid with different molecular weights.

Materials and methods. Polymer films obtained by casting method from 1.5 wt.% forming solutions of hyaluronic acid with a molecular weight of 1.30 and 2.48 MDa with different contents of mangiferin were used as the objects of the study. The weight ratio of hyaluronic acid to mangiferin varied from 5 to 25. Released mangiferin was measured by UV/Vis spectrophotometry at a wavelength of 237 nm. A phosphate buffered saline with pH 7.4 was used as a model medium. The mangiferin release kinetic was assessed using various mathematical models.

Results and discussion. Mangiferin release kinetic from a polymer matrix based on hyaluronic acid has a release sigmoidal pattern. The release mechanism has a complex nature of the Super Case II transport type, with the exception of a sample with a low content of mangiferin and hyaluronic acid with molecular weight equal to 1.3 MDa, for which an abnormal release pattern is detected (non-Fickian diffusion), due to the hydrophilic nature of hyaluronic acid, the rapid swelling of the polymer matrix, as well as a significant leading in the diffusion of mangiferin compared to the relaxation rate of the polymer. The most suitable model is the Weibull model, which describes the mangiferin release kinetics with greater accuracy compared to other mathematical models.

Conclusion. The results obtained indicate the potential possibility of using the developed polymer films as biomedical materials for external use, which provide transdermal delivery of pharmaceutical agents. The authors of the study are planning to develop a methodology for prolonged and controlled release of a loaded biologically active agent, including by various cross-linking agents.

Keywords: hyaluronic acid, release kinetics, drug loading capacity, mangiferin, polymer matrix, delivery system, encapsulation efficiency

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. Petr P. Snetkov, Svetlana N. Morozkina – conceptualization. Petr P. Snetkov, Yuliya E. Generalova – methodology. Petr P. Snetkov, Vladislava I. Klimshina, Roman O. Shaikenov, Yuliya E. Generalova, Svetlana N. Morozkina – investigation. Petr P. Snetkov – data curation. Petr P. Snetkov, Vladislava I. Klimshina, Roman O. Shaikenov, Yuliya E. Generalova – preparing the text of the article for publication. Petr P. Snetkov, Svetlana N. Morozkina – text revision and editing. Petr P. Snetkov – visualization. Petr P. Snetkov – resources. Petr P. Snetkov – supervision and project administration. All authors participated in the analysis of the data obtained and discussion of the results.

Funding. This research was funded by the Russian Science Foundation, project number 24-23-00269. Link to information about the project: https://rscf.ru/en/project/24-23-00269/

For citation: Snetkov P. P., Shaikenov R. O., Klimshina V. I., Generalova Yu. E., Morozkina S. N. The influence of the molecular weight of hyaluronic acid on the mangiferin release kinetics from the polymer matrix. *Drug development & registration*. 2025;14(1):171–180. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1881

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики нашли широкое применение в животноводстве в целях профилактики инфекционных заболеваний, однако это может привести к попаданию антибиотиков через продукты животноводства и рыбного хозяйства в организм человека, отравлению и появлению резистентных штаммов бактерий [1–3]. Чтобы не допустить развития резистентности к антибиотикам, их использование было ограничено в США [4], в Индии [5], в ЕС также были приняты меры по ограничению использования антибиотиков без предписания ветеринара и в качестве стимулирующих добавок к кормам [6]. В Китае антибиотик колистин был полностью запрещен к использованию в животноводстве [7].

В качестве альтернативы антибиотиками возможно использование фитобиотиков – биологически активных веществ, выделенных из растений. Они обладают широким спектром антибактериальной, антиоксидантной, противовирусной, противовоспалительной и иммуномодулирующей активности, но при этом не вызывают появления резистентных штаммов бактерий [8–9].

Мангиферин (рисунок 1) – это биологически активное вещество, выделяемое из листьев растения *Mangifera indica*. Мангиферин обладает множеством свойств: антиоксидантным, противовоспалительным, нейро- и кардиоукрепляющим, иммуномодулирующим и другими. Эти свойства в перспективе позволяют использовать его как эффективное лекарство [10–11].

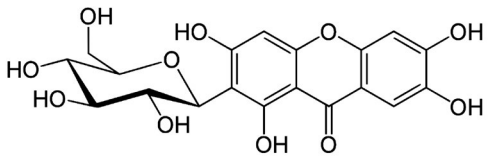


Рисунок 1. Химическая структура мангиферина

Figure 1. Chemical structure of mangiferin

Исследователи отмечают высокую антибактериальную активность мангиферина против распространенных штаммов патогенных бактерий. Так, было показано, что мангиферин подавляет рост 9 штаммов *Staphylococcus aureus*, 7 штаммов *Salmonella typhi*, а также *Salmonella citreus* [12], *Bacillus cereus*, *Salmonella virchow*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также грибков *Aspergillus flavus* и *Thermoascus aurantiacus* [13]. Частично эти результаты подтвердили N. T. T. Loan с соавторами [14].

Мангиферин также обладает противовирусными свойствами, например в отношении вируса герпеса [15–16] и вируса гриппа H1N1 [17]. Более того, мангиферин обладает также противовоспалительными свойствами, что было показано на клеточных и животных моделях [18]. Он оказывает положительное терапевтическое действие при различных патологических осложнениях, а также обеспечивает защиту от широкого спектра физиологических нарушений [19]. Было обнаружено, что мангиферин отличается очень

высоким уровнем антиоксидантной активности [20]. Чем выше степень очистки используемого мангиферина, тем большей антиоксидантной активностью он обладает [14].

Однако для мангиферина характерна низкая биодоступность вследствие низкой липофильности, препятствующей прохождению его молекул через мембраны клеток [10]. Также низкая биодоступность – следствие плохой растворимости мангиферина в воде: всего 0,38 мг/мл при 25 °C [21]. Для повышения эффективности биологически активных соединений используют различные методы, в том числе инкапсуляцию («загрузку») активных агентов в полимерные матрицы [22]. Полисахариды являются перспективными кандидатами для использования в качестве полимерных систем, улучшающих биологическую эффективность загруженных природных соединений. Так, D. H. Kim с соавт. [23] инкапсулировали экстракт прополиса в наночастицы, полученные методом ионного гелеобразования, где в качестве оболочки был использован полиэлектролитный комплекс хитозана и гиалуроновой кислоты. Это позволило увеличить растворимость природного соединения в 2,43 раза и обеспечить диспергирование наночастиц в дистиллированной воде без их агломерации. T. Wu и др. [24] доказали, что добавление альгината натрия к наночастицам, состоящим из зеина и содержащим нарингенин, увеличило растворимость последнего в 1,27 раза, а по сравнению с чистым флавоноидом растворимость улучшилась в 3,13 раза.

Гиалуроновая кислота – это природный гетерополисахарид, состоящий из повторяющихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. Благодаря своим уникальным свойствам, таким как биодеградируемость, биосовместимость, гигроскопичность и мукоадгезивность, этот полисахарид используется для адресной доставки лекарств и во многих медицинских приложениях [25]. Кроме того, гидрогели на основе гиалуроновой кислоты являются подходящими кандидатами для использования в качестве полимерных систем для «загрузки» природных соединений с целью ускорения заживления ран [26].

Варьирование молекулярной массы гиалуроновой кислоты позволяет регулировать свойства полимера. Так, низкомолекулярный полисахарид (6–20 кДа) связан с процессами ангиогенеза, экспрессии генов и провоспаления, среднемолекулярный (20 кДа – 1 МДа) – с регенерацией и эмбриогенезом, а высокомолекулярная кислота (более 1 МДа) обладает иммуносупрессивным и антиангиогенным эффектами [27]. В зависимости от молекулярной массы изменяются не только биологические свойства гиалуроновой кислоты [28], но и физические, физико-химические, структурные параметры и степень деградации [29]. Кроме того, размер полимерной цепи определяет способность полисахарида к адресной доставке лекарственных препаратов. Y. Chi с соавт. [30] показали, что микроиглы на основе гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 74 000 Да обладали максимальной степенью высвобождения лекарственного агента *in vitro*, а также продемонстрировали наибольшее количественное содержание лекарственного агента в тканях и самое длительное время удерживания лекарства *in vivo* по сравнению с микроиглами на основе гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 10 000 Да и 290 000 Да.

Целью данной работы является исследование кинетики высвобождения природного биологически активного агента мангиферина из полимерной матрицы на основе гиалуроновой кислоты с разной молекулярной массой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись полимерные пленки, полученные из 1,5 масс.% формовочных растворов гиалуроновой кислоты двух молекулярных масс: 1,30 МДа (Rensin Chemicals Limited, Китай) и 2,48 МДа (Amhwa Biopharm Co., Ltd., Китай). Мангиферин (98 %, abcr GmbH, Германия) вводился в состав формовочных растворов из расчета 1:5, 1:15, 1:25 (по отношению к массе гиалуроновой кислоты). В качестве растворителя использовалась равнообъемная смесь воды очищенной ФС.2.2.0020 и диметилсульфоксида (ХЧ, ТУ 2635-114-44493179-08, АО «ЭКОС-1», Россия). Формовочные полимерные растворы выливали в чашки Петри $D = 90$ мм, оставляли на 24 ч при комнатной температуре для стабилизации и деаэрации и затем сушили при температуре 40 °C в течение 48 ч. Схема изготовления пленок представлена на рисунке 2.

Наименования и описания полученных полимерных пленок представлены в таблице 1.

Таблица 1. Полученные полимерные пленки на основе гиалуроновой кислоты

Table 1. The polymer samples based on hyaluronic acid

№	Наименование Name	Молекулярная масса ГК, МДа Molecular weight of HA, MDa	Массовое соотношение ГК и мангиферина Mass ratio of HA and mangiferin
1	ГК1_25 HA1_25	1,30	25:1
2	ГК1_15 HA1_15	1,30	15:1
3	ГК1_5 HA1_5	1,30	5:1
4	ГК2_25 HA2_25	2,48	25:1
5	ГК2_15 GK2_15	2,48	15:1
6	ГК2_5 HA2_5	2,48	5:1

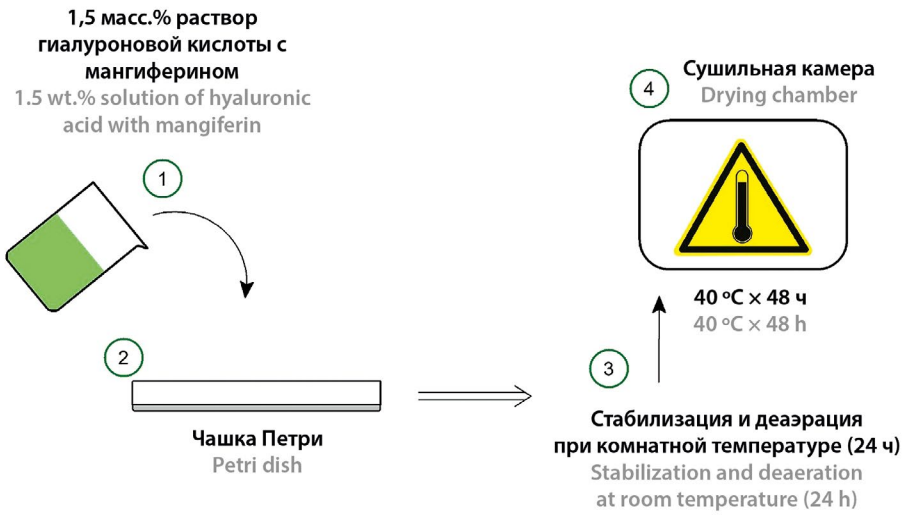


Рисунок 2. **Схема изготовления полимерных пленок на основе гиалуроновой кислоты**

Figure 2. **Schematic illustration of the polymer samples preparation**

Оценка кинетики высвобождения мангиферина из полимерных пленок

Для изучения кинетики высвобождения мангиферина из пленок на основе гиалуроновой кислоты брали навеску пленки 100 мг, добавляли 50 мл фосфатного буферного раствора (pH 7,4), помещали на магнитную мешалку с нагреванием (37 °C, 200 об/мин). Отбор проб объемом 1,0 мл осуществляли через заданные промежутки времени, при этом каждый раз взамен взятой пробы добавляли 1,0 мл чистого буферного раствора. При необходимости пробы разбавляли в 10–50 раз. Количественное определение проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм методом спектрофотомерии при длине волны 237 нм (спектрофотометр Lambda 1050, PerkinElmer, США). Перед непосредственным определением оптической плотности пробу фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. В качестве калибровочного графика использовался раствор мангиферина в фосфатном буферном растворе с pH 7,4. Эксперимент проведен в трех повторностях для каждого типа образца.

Высвобождение мангиферина рассчитывали исходя из количества высвободившегося и исходного количества мангиферина в полимерном образце с использованием следующего уравнения [31]:

$$\text{Высвобождение мангиферина (\%)} = \frac{m_{\text{высвободившегося мангиферина}}}{m_{\text{мангиферина в образце}}} \cdot 100\ \%, \quad (1)$$

где $m_{\text{высвободившегося мангиферина}}$ – количество мангиферина (г), высвободившегося в модельную среду за 15, 30, 45, 60, 90, 120 и 180 мин; $m_{\text{мангиферина в образце}}$ – общее фактическое содержание мангиферина в образце (г).

Оценка количественного содержания мангиферина в исходных образцах

Для количественного определения мангиферина в образцах с целью дальнейшего расчета высвобождения, а также для оценки емкости полимерной матрицы и эффективности инкапсуляции точную навеску массой 100 мг полностью растворяли в смеси этанола и дистиллированной воды (объемное соотношение 1:4), после чего пропускали пробу через мембранный шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм и определяли содержание мангиферина спектрофотометрическим методом при длине волны 237 нм. Калибровочный график был получен с использованием растворов мангиферина в смеси этанола и дистиллированной воды (объемное соотношение 1:4). Каждый эксперимент проведен три раза для каждого типа образца.

Оценка емкости полимерной матрицы и эффективности инкапсуляции производилась по следующим формулам [32–33]:

$$\text{Емкость полимерной матрицы} = \frac{m_{\text{мангиферина в образце}}}{m_{\text{образца}}} \cdot 100\ \%, \quad (2)$$

$$\text{Эффективность инкапсуляции} = \frac{m_{\text{мангиферина в образце}}}{\text{исх.}m_{\text{мангиферина}}} \cdot 100\ \%, \quad (3)$$

где $m_{\text{мангиферина в образце}}$ – фактическое содержание мангиферина в анализируемом образце (г); $m_{\text{образца}}$ – масса анализируемого образца (пленки) (г); исх.$m_{\text{мангиферина}}$ – масса мангиферина (г), «загруженного» в исходный формовочный полимерный раствор.

Математическая модель кинетики высвобождения мангиферина

Для определения кинетики высвобождения мангиферина из полимерных образцов использовались различные математические модели, включая нулевой порядок, первый порядок, Higuchi, Hixson – Crowell, Korsmeyer – Peppas, Peppas – Sahlin, Weibull [33–36]. Значения кинетических параметров были получены при анализе экспериментальных данных в программе OriginPro 2019b (OriginLab Corporation, США). В таблице 2 показаны соответствующие уравнения для каждой модели.

Таблица 2. Различные математические модели, описывающие кинетику высвобождения мангиферина

Table 2. Various models for mathematical description the mangiferin release kinetics

Наименование модели Model name	Уравнение Equation
Нулевой порядок Zero order	$Q_t = Q_0 + K_0 \cdot t$
Первый порядок First order	$\ln(Q_t) = \ln(Q_0) + K_F \cdot t$
Higuchi	$Q_t = K_H \cdot t^{\frac{1}{2}}$
Hixson – Crowell	$Q_0^{\frac{1}{3}} - Q_t^{\frac{1}{3}} = K_s \cdot t$
Korsmeyer – Peppas	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_k \cdot t^n$
Peppas – Sahlin	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_{P1} \cdot t^m + K_{P2} \cdot t^{2m}$
Weibull	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - e^{-\alpha \cdot t^\beta}$

Примечание. Q_t – количество высвободившегося вещества за время t; Q_0 – исходное количество «загруженного» вещества в системе; Q_∞ – количество высвободившегося вещества при полном «истощении» полимерной матрицы (капсулы); K – константа скорости высвобождения; m – показатель высвобождения; n – коэффициент диффузии; α – масштабный коэффициент; β – параметр формы.

Note. Q_t – amount of substance released during time t; Q_0 – initial amount of "loaded" substance in the system; Q_∞ – amount of substance released upon complete "depletion" of the polymer matrix (capsule); K – release rate constant; m – release rate; n – diffusion coefficient; α – scale factor; β – shape parameter.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика высвобождения мангиферина в фосфатный буферный раствор (pH 7,4) из полимерных пленок на основе гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 1,30 МДа и 2,48 МДа приведена на рисунках 3 и 4 соответственно.

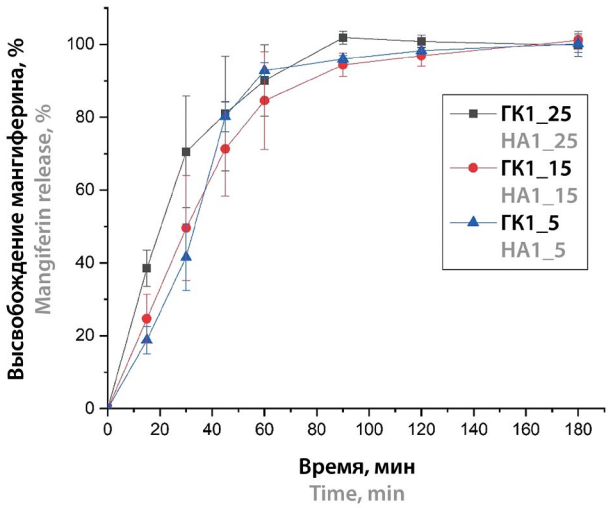


Рисунок 3. Кинетика высвобождения мангиферина в фосфатный буферный раствор (pH 7,4) из полимерной матрицы на основе гиалуроновой кислоты с ММ 1,30 МДа

Figure 3. Mangiferin release profiles from the polymer samples based on hyaluronic acid with MW 1,30 MDa into phosphate-buffered saline (pH 7,4)

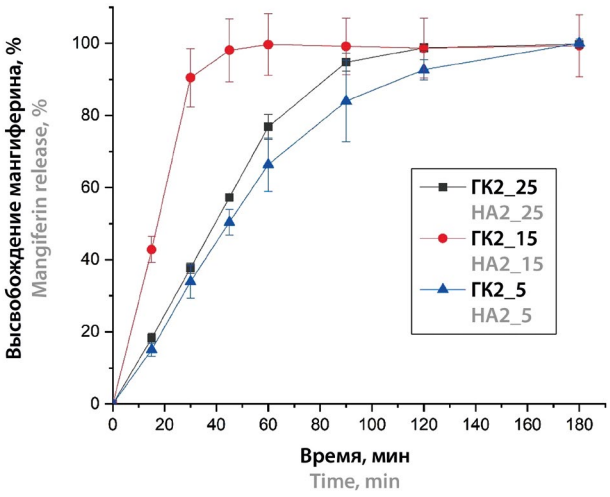


Рисунок 4. Кинетика высвобождения мангиферина в фосфатный буферный раствор (pH 7,4) из полимерной матрицы на основе гиалуроновой кислоты с ММ 2,48 МДа

Figure 4. Mangiferin release profiles from the polymer samples based on hyaluronic acid with MW 2,48 MDa into phosphate-buffered saline (pH 7,4)

Профили высвобождения мангиферина в случае использования гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 1,30 МДа имели схожую кинетику вне зависимости от содержания биологически активного агента в образце. В этом случае не наблюдалось взрывного характера высвобождения – мангиферин постепенно высвобождался в течение 180 мин.

В случае использования более высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (2,48 МДа) высвобождение идет медленнее, за исключением образца ГК2_15, который имеет существенное отличие кинетики высвобождения на начальном этапе, характеризующееся более быстрым выходом на плато. Такой характер высвобождения может быть обусловлен изменениями силы взаимодействия между полимером-носителем и загруженным агентом [37, 38], диффузией биологически активного агента к поверхности образца при сушке [38, 39], различной микроструктурой поверхности образца [39, 40], изменением осмотического давления гиалуроновой кислоты с увеличением ее молекулярной массы [29], а также другими факторами.

Учитывая широкий спектр биологической активности природного мангиферина, а также профили его высвобождения из полимерных матриц, можно сделать вывод о перспективах использования полученных полимерных пленок в качестве потенциального антибактериального и противовоспалительного раневого/ожогового покрытия с постепенным высвобождением «загруженного» лекарственного средства и оперативным купированием воспалительных реакций и бактериального роста.

Механизм высвобождения мангиферина из полимерных матриц на основе гиалуроновой кислоты можно проанализировать путем сопоставления экспериментальных данных о высвобождении мангиферина с различными математическими моделями кинетики высвобождения лекарственных средств, включая модели нулевого порядка, первого порядка, Higuchi, Hixson – Crowell, Korsmeyer – Peppas, Peppas – Sahlin, Weibull. Эти модели были применены к профилю высвобождения мангиферина из пленок, полученных с использованием гиалуроновой кислоты двух марок. Результаты расчета параметров моделей приведены в таблице 3.

Модели Korsmeyer – Peppas, Peppas – Sahlin и Weibull в наилучшей степени описывают кинетику высвобождения мангиферина из полимерных матриц на основе гиалуроновой кислоты. Значение параметра n в модели Korsmeyer – Peppas для всех анализируемых образцов, кроме ГК1_25 и ГК1_15, превышает 1,00, что свидетельствует об аномальном механизме диффузии биологически активного агента из полимерного слоя по типу Super Case II transport mechanism [41–43]. Подобный механизм высвобождения мангиферина в этом случае обусловлен гидрофильной природой гиалуроновой кислоты, быст-

Таблица 3. Кинетические параметры высвобождения мангиферина из образцов на основе гиалуроновой кислоты

Table 3. Kinetic parameters of mangiferin release from the samples based on hyaluronic acid

Модель и параметры Model and parameters		Наименование образца Sample name					
		ГК1_25 HA1_25	ГК1_15 HA1_15	ГК1_5 HA1_5	ГК2_25 HA2_25	ГК2_15 HA2_15	ГК2_5 HA2_5
Нулевой порядок Zero order	K_0	0,10658	0,19426	0,64742	0,14085	0,14950	0,72543
	R^2	0,58515	0,7125	0,64914	0,77886	0,40097	0,88507
Первый порядок First order	K_F	0,00424	0,00664	0,00763	0,00864	0,00268	0,00961
	R^2	0,49494	0,56313	0,48119	0,61809	0,26783	0,66875
Higuchi	K_H	2,21371	3,30737	10,90744	2,10289	3,86734	9,0445
	R^2	0,90234	0,90631	0,84131	0,91837	0,56117	0,94561
Hixson – Crowell	K_S	–0,00993	–0,01286	–0,01973	–0,01208	–0,01077	–0,02052
	R^2	0,37432	0,46433	0,47319	0,53554	0,30248	0,57855
Korsmeyer – Peppas ($Q_t/Q_0 < 0,6$)	K_K	0,02732	0,01671	0,00524	0,01102	0,02203	0,00908
	n	0,97471	0,99543	1,30021	1,03805	1,11265	1,05658
	R^2	0,99989	0,99993	0,98966	0,99999	0,99965	0,99890
Korsmeyer – Peppas (все данные) Korsmeyer – Peppas (all data)	K_K	0,07498	0,02816	0,00324	0,08379	0,42347	0,05766
	n	0,63405	0,83729	1,44488	0,50247	0,18354	0,56781
	R^2	0,94795	0,98948	0,99266	0,91838	0,87585	0,95249
Peppas – Sahlin	K_1	0,08436	0,03765	0,0292	0,01523	0,16211	0,01279
	K_2	–0,00169	$-3,3911 \cdot 10^{-4}$	$-1,9716 \cdot 10^{-4}$	$-5,4461 \cdot 10^{-5}$	–0,00619	$-4,0278 \cdot 10^{-5}$
	m	0,66501	0,81308	0,88258	0,99795	0,54923	1,00289
	R^2	0,98981	0,98492	0,94665	0,99188	0,94168	0,99602
Weibull	α	0,02182	0,00729	$6,0028 \cdot 10^{-4}$	0,00260	0,00207	0,00411
	β	1,15873	1,3456	2,04681	1,53902	2,08613	1,35633
	R^2	0,99631	0,99894	0,99287	0,99812	0,99940	0,99968

Таблица 4. Емкость полимерной матрицы и эффективность инкапсуляции мангиферина в полимерной матрице на основе гиалуроновой кислоты (*n* = 3, ±SD)

Table 4. Drug loading capacity and encapsulation efficiency of mangiferin-loaded polymer films based on hyaluronic acid (*n* = 3, ±SD)

Наименование образца Sample name	Емкость полимерной матрицы, % Drug loading capacity of the polymer matrix, %		Эффективность инкапсуляции, % Encapsulation efficiency, %	
	Теоретическая Theoretical	Экспериментальная Experimental	Теоретическая Theoretical	Экспериментальная Experimental
ГК1_25 HA1_25	3,85	3,39 ± 0,09	~100,0	96,03 ± 2,64
ГК1_15 HA1_15	6,25	5,20 ± 0,15	~100,0	95,12 ± 3,21
ГК1_5 HA1_5	16,67	14,74 ± 0,28	~100,0	98,56 ± 2,10
ГК2_25 HA2_25	3,85	3,63 ± 0,04	~100,0	99,25 ± 1,02
ГК2_15 HA2_15	6,25	5,18± 0,11	~100,0	98,35 ± 1,87
ГК2_5 HA2_5	16,67	14,18 ± 0,09	~100,0	95,73 ± 0,98

рым набуханием полимерной матрицы, а также значительным опережением темпов диффузии мангиферина по сравнению со скоростью релаксации полимера [33].

Параметр *n* модели Korsmeyer – Peppas для образцов ГК1_25 и ГК1_15 составляет 0,97471 и 0,99543 соответственно, что для тонких пленок свидетельствует об аномальном диффузионном механизме высвобождения не по закону Фика ($0,5 < n < 1,0$) [43, 44]. В этом случае скорости диффузии мангиферина и релаксации полимера сопоставимы [34]. Таким образом, кинетика высвобождения зависит также от содержания мангиферина в полимерной матрице, а не только от молекулярной массы полимера.

В уравнении Weibull параметр формы β характеризует форму кривой высвобождения. Так, при $\beta = 1,0$ кривая высвобождения представляет собой экспоненциальную форму, при $\beta > 1,0$ – сигмоидальную форму и при $\beta < 1,0$ – параболическую форму [33, 45]. Для исследуемых пленок на основе гиалуроновой кислоты параметр формы β больше 1,0, что соответствует сигмоидальной форме профиля высвобождения мангиферина. Помимо этого, значение $\beta > 1,26$ для большинства образцов (кроме образца ГК1_25) свидетельствует о сложном механизме высвобождения биологически активного агента (Super Case II transport) [33, 34, 43]. Для образца ГК1_25, $\beta = 1,15873$ ($0,65 < \beta < 1,26$) обнаруживается аномальный характер высвобождения (диффузия не по закону Фика) [43]. Данная модель вносит некоторое уточнение к модели Korsmeyer – Peppas, в особенности для образцов на основе гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 1,30 МДа с низким содержанием мангиферина.

Таким образом, модель Weibull описывает кинетику полного высвобождения мангиферина с большей точностью по сравнению с другими используемыми моделями. Эта модель достаточно гибкая и позволяет описывать сложные системы, в том числе на основе гидрофильных полимеров, обладающих способностью набухать в процессе высвобождения БАВ.

Результаты определения емкости полимерной матрицы и эффективности инкапсуляции мангиферина в полимерной матрице на основе гиалуроновой кислоты приведены в таблице 4.

Из представленной таблицы видно, что в целом эффективность инкапсуляции для всех полимерных образцов имеет высокие значения (более 90 %) и не имеет явной зависимости от содержания мангиферина в системе и от молекулярной массы гиалуроновой кислоты.

Емкость полимерной матрицы напрямую зависит от исходного количества мангиферина, загруженного в полимерную матрицу, и увеличивается с увеличением содержания мангиферина в системе. В то же время авторами обнаружено, что дальнейшее увеличение содержания мангиферина в исходном формующем полимерном растворе не приводит к выпадению осадка, поэтому массовое соотношение гиалуроновой кислоты и мангиферина может быть увеличено для усиления терапевтического эффекта. Разницу между теоретическими и экспериментальными значениями емкости полимерной матрицы можно объяснить наличием остаточных количеств связанной воды и ДМСО в образцах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изучения кинетики высвобождения мангиферина из полимерной матрицы использовались пленки на основе гиалуроновой кислоты двух молекулярных масс, а также фосфатный буферный раствор с pH 7,4.

При этом важно отметить, что активирующие агенты 4-диметиламинопиридин или 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид не применялись в данном исследовании для включения мангиферина в матрицу гиалуроновой кислоты.

Исследование кинетики высвобождения мангиферина из полимерной матрицы показало, что высвобождение мангиферина проходит по сигмоидальной форме и имеет сложный механизм типа Super Case II transport, за исключением образца ГК1_25, для которого обнаруживается аномальный характер высвобождения (диффузия не по закону Фика). При этом наиболее подходящей является модель Weibull, описывающая кинетику высвобождения мангиферина с большей точностью по сравнению с другими математическими моделями.

Эффективность инкапсуляции мангиферина в полимерной матрице не зависит от содержания БАВ в системе и от молекулярной массы гиалуроновой кислоты и составляет более 90 %, что является высоким показателем.

Емкость полимерной матрицы прямо пропорциональна количеству загруженного мангиферина; расхождение экспериментальных и расчетных значений обусловлено наличием связанной воды и ДМСО в полимерных образцах.

Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего усовершенствования разработанных полимерных систем доставки мангиферина, в частности для обеспечения их ограниченного набухания и контролируемого (пролонгированного) высвобождения активного агента путем проведения химической и/или физической сшивки полимерной матрицы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Chen J., Sun R., Pan C., Sun Y., Mai B., Li Q. X. Antibiotics and food safety in aquaculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(43):11908–11919. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c03996.
2. Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*. 2018;23(4):795. DOI: 10.3390/molecules23040795.
3. Liu X., Steele J. C., Meng X.-Z. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. *Environmental Pollution*. 2017;223:161–169. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.01.003.
4. Casey J. A., Tartof S. Y., Davis M. F., Nachman K. E., Price L., Liu C., Yu K., Gupta V., Innes G. K., Tseng H. F., Do V., Pressman A. R., Rudolph K. E. Impact of a Statewide Livestock Antibiotic Use Policy on Resistance in Human Urine *Escherichia coli* Isolates: A Synthetic Control Analysis. *Environmental Health Perspectives*. 2023;131(2):027007. DOI: 10.1289/ehp11221.
5. Dutta T. K., Yadav S. K., Chatterjee A. Antibiotics as feed additives for livestock: Human health concerns. *Indian Journal of Animal Health*. 2019;58(2-Special Issue):121–136. DOI: 10.36062/ijah.58.2spl.2019.121-136.
6. Simjee S., Ippolito G. European regulations on prevention use of antimicrobials from January 2022. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*. 2022;44:e000822. DOI: 10.29374/2527-2179.bjvm000822.
7. Umair M., Hassan B., Farzana R., Ali Q., Sands K., Mathias J., Afegbua S., Haque M. N., Walsh T. R., Mohsin M. International manufacturing and trade in colistin, its implications in colistin resistance and One Health global policies: a microbiological, economic, and anthropological study. *The Lancet Microbe*. 2023;4(4):e264–e276. DOI: 10.1016/s2666-5247(22)00387-1.
8. Alghirani M. M., Chung E. L. T., Jesse F. F. A., Sazili A. Q., Loh T. C. Could Phytobiotics replace Antibiotics as Feed Additives to Stimulate Production Performance and Health Status in Poultry? An Overview. *Journal of Advanced Veterinary Research*. 2021;11(4):254–265.
9. Gheisar M. M., Kim I. H. Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review. *Italian Journal of Animal Science*. 2017;17(1):92–99. DOI: 10.1080/1828051x.2017.1350120.
10. Du S., Liu H., Lei T., Xie X., Wang H., He X., Tong R., Wang Y. Mangiferin: An effective therapeutic agent against several disorders (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(6):4775–4786. DOI: 10.3892/mmr.2018.9529.
11. Jyotshna N., Khare P., Shanker K. Mangiferin: A review of sources and interventions for biological activities. *BioFactors*. 2016;42(5):504–514. DOI: 10.1002/biof.1308.
12. Biswas T., Sen A., Roy R., Maji S., Maji H. S. Isolation of Mangiferin from Flowering Buds of Mangifera indica L and its Evaluation of *in vitro* Antibacterial Activity. *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2015;4(3):49–56.
13. Singh S. K., Tiwari R. M., Sinha S. K., Danta C. C., Prasad S. K. Antimicrobial evaluation of mangiferin and its synthesized analogues. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(2):S884–S887. DOI: 10.1016/s2221-1691(12)60329-3.
14. Loan N. T. T., Long D. T., Yen P. N. D., Hanh T. T. M., Pham T. N., Pham D. T. N. Purification Process of Mangiferin from Mangifera indica L. Leaves and Evaluation of Its Bioactivities. *Processes*. 2021;9(5):852. DOI: 10.3390/pr9050852.
15. Zheng M. S., Lu Z. Y. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chinese medical journal*. 1990;103(2):160–165.
16. Rechenchoski D. Z., Agostinho K. F., Faccin-Galhardi L. C., Garcia Lonni A. A. S., Honório da Silva J. V., Goulart de Andrade F., Pacheco Cunha A., Pontes Silva Ricardo N. M., Nozawa C., Carvalho Linhares R. E. Mangiferin: A promising natural xanthone from Mangifera indica for the control of acyclovir – resistant herpes simplex virus 1 infection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2020;28(4):115304. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115304.
17. Grienke U., Schmidtke M., von Grafenstein S., Kirchmair J., Liedl K. R., Rollinger J. M. Influenza neuraminidase: A druggable target for natural products. *Natural Product Reports*. 2012;29(1):11–36. DOI: 10.1039/c1np00053e.
18. Mei S., Ma H., Chen X. Anticancer and anti-inflammatory properties of mangiferin: A review of its molecular mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;149:111997. DOI: 10.1016/j.fct.2021.111997.
19. Saha S., Sadhukhan P., Sil P. C. Mangiferin: A xanthonoid with multipotent anti-inflammatory potential. *BioFactors*. 2016;42(5):459–474. DOI: 10.1002/biof.1292.

20. Adin S. N., Gupta I., Aqil M., Mujeeb M., Ahad A. BBD Driven Optimization of Extraction of Therapeutically Active Xanthanoid Mangiferin from Mangifera indica L. Leaves and its Antioxidant Activity. *Pharmacognosy Research*. 2022;15(1):84–93. DOI: 10.5530/097484900279.
21. Khurana R. K., Kaur R., Kaur M., Kaur R., Kaur J., Kaur H., Singh B. Exploring and validating physicochemical properties of mangiferin through GastroPlus® software. *Future Science OA*. 2017;3(1):FSO167. DOI: 10.4155/fsoa-2016-0055.
22. Morozkina S. N., Nhung Vu T. H., Generalova Y. E., Snetkov P. P., Uspenskaya M. V. Mangiferin as new potential anti-cancer agent and mangiferin-integrated polymer systems–a novel research direction. *Biomolecules*. 2021;11(1):79. DOI: 10.3390/biom11010079.
23. Kim D. H., Jeong E. W., Baek Y., Lee H. G. Development of propolis extract-loaded nanoparticles with chitosan and hyaluronic acid for improving solubility and stability. *LWT*. 2023;181:114738. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.114738.
24. Wu T., Han W., Han Y., Ma L., Li M., Sun Y., Liua B., Tian B., Fu Q. Fabrication and characterization of zein-sodium alginate complex nanoparticles as an effective naringenin delivery system: Physicochemical stability, solubility, antioxidant activity. *Journal of Molecular Liquids*. 2023;386:122569. DOI: 10.1016/j.molliq.2023.122569.
25. Fallacara A., Baldini E., Manfredini S., Vertuani S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers*. 2018;10(7):701. DOI: 10.3390/polym10070701.
26. Falbo F., Spizzirri U.G., Restuccia D., Aiello F. Natural Compounds and Biopolymers-Based Hydrogels Join Forces to Promote Wound Healing. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):271. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010271.
27. Bayer I. S. Hyaluronic Acid and Controlled Release: A Review. *Molecules*. 2020;25(11):2649. DOI: 10.3390/molecules25112649.
28. Jabbari F., Babaeipour V., Saharkhiz S. Comprehensive review on biosynthesis of hyaluronic acid with different molecular weights and its biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;240:124484. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124484.
29. Snetkov P., Zakharova K., Morozkina S., Olekchnovich R., Uspenskaya M. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers*. 2020;12(8):1800. DOI: 10.3390/polym12081800.
30. Chi Y., Huang Y., Kang Y., Dai G., Liu Z., Xu K., Zhong W. The effects of molecular weight of hyaluronic acid on transdermal delivery efficiencies of dissolving microneedles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2022;168:106075. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.106075.
31. Lee J. H., Tachibana T., Wadamori H., Yamana K., Kawasaki R., Kawamura S., Isozaki H., Sakuragi M., Akiba I., Yabuki A. Drug-Loaded Biocompatible Chitosan Polymeric Films with Both Stretchability and Controlled Release for Drug Delivery. *ACS Omega*. 2023;8(1):1282–1290. DOI: 10.1021/acsomega.2c06719.
32. Raveendran R. L., Anirudhan T. S. Development of Macroscopically Ordered Liquid crystalline hydrogel from Biopolymers with robust Antibacterial activity for controlled drug delivery applications. *Polymer Chemistry*. 2021;12(27):3992–4005. DOI: 10.1039/D1PY00610J.
33. Shirvan A. R., Hemmatinejad N., Bahrami S. H., Bashari A. A comparison between solvent casting and electrospinning methods for the fabrication of neem extract-containing buccal films. *Journal of Industrial Textiles*. 2022;51(1_suppl):311S–335S. DOI: 10.1177/15280837211027785.
34. Filippova N. I., Teslev A. A. Application of mathematical modeling in the evaluation of *in vitro* drug release. *Drug development & registration*. 2017;4:218–226. (In Russ.)
35. Sjöholm E., Mathiyalagan R., Rajan Prakash D., Lindfors L., Wang Q., Wang X., Ojala S., Sandler N. 3D-Printed Veterinary Dosage Forms–A Comparative Study of Three Semi-Solid Extrusion 3D Printers. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1239. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121239.
36. Herold S. E., Kyser A. J., Orr M. G., Mahmoud M. Y., Lewis W. G., Lewis A. L., Steinbach-Rankins J. M., Frieboes H. B. Release Kinetics of Metronidazole from 3D Printed Silicone Scaffolds for Sustained Application to the Female Reproductive Tract. *Biomedical Engineering Advances*. 2023;5:100078. DOI: 10.1016/j.bea.2023.100078.
37. Yoo J., Won Y.-Y. Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2020;6(11):6053–6062. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.0c01228.
38. Huang X., Brazel C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2001;73(2–3):121–136. DOI: 10.1016/s0168-3659(01)00248-6.
39. Bakhrushina E. O., Sakharova P. S., Konogorova P. D., Pyzhov V. S., Kosenkova S. I., Bardakov A. I., Zubareva I. M., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. Jr. Burst Release from In Situ Forming PLGA-Based Implants: 12 Effectors and Ways of Correction. *Pharmaceutics*. 2024;16(1):115. DOI: 10.3390/pharmaceutics16010115.
40. Yarce C. J., Pineda D., Correa C. E., Salamanca C. H. Relationship between Surface Properties and In Vitro Drug Release from a Compressed Matrix Containing an Amphiphilic Polymer Material. *Pharmaceuticals*. 2016;9(3):34. DOI: 10.3390/ph9030034.
41. Strankowska J., Grzywińska M., Łęgowska E., Józefowicz M., Strankowski M. Transport Mechanism of Paracetamol (Acetaminophen) in Polyurethane Nanocomposite Hydrogel Patches—Cloisite® 30B Influence on the Drug Release and Swelling Processes. *Materials*. 2024;17(1):40. DOI: 10.3390/ma17010040.
42. Danyuo Y., Ani C. J., Salifu A. A., Obayemi J. D., Dozie-Nwachukwu S., Obanawu V. O., Akpan U. M., Odusanya O. S., Abade-Abugre M., McBagonluri F., Soboyejo W. O. Anomalous Release Kinetics of Prodigiosin from Poly-N-Isopropyl-Acrylamid based Hydrogels for The Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Scientific Reports*. 2019;9(1):3862. DOI: 10.1038/s41598-019-39578-4.
43. De Jesús Martín-Camacho U., Rodríguez-Barajas N., Sánchez-Burgos J. A., Pérez-Larios A. Weibull β value for the discernment of drug release mechanism of PLGA particles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023;640:123017. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123017.
44. Ritger P. L., Peppas N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*. 1987;5(1):37–42. DOI: 10.1016/0168-3659(87)90035-6.
45. Papadopoulou V., Kosmidis K., Vlachou M., Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;309(1–2):44–50. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.044.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.12

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1773

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка методики определения паропроницаемости для пленкообразующих аэродисперсных систем

М. М. Шумкова✉, М. В. Помыткина, А. А. Ананян, Г. Пуя, М. М. Агабалян, Е. О. Бахрушина

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:** Шумкова Марина Михайловна. **E-mail:** shumkovamm@gmail.com

ORCID: М. М. Шумкова – https://orcid.org/0000-0002-4448-2588;
М. В. Помыткина – https://orcid.org/0000-0002-6380-1302;
А. А. Ананян – https://orcid.org/0009-0008-3418-5003;
Г. Пуя – https://orcid.org/0009-0009-6112-7420;
М. М. Агабалян – https://orcid.org/0009-0004-6988-6222;
Е. О. Бахрушина – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346.

Статья поступила: 28.02.2024 **Статья принята в печать:** 25.02.2025 **Статья опубликована:** 28.02.2025

Резюме

Введение. Пленкообразующие аэродисперсные системы (ПАС) являются лекарственными формами, образующими *in situ* пленку при распылении. Одной из ключевых особенностей ПАС является частичная паропроницаемость – частный случай окклюзии. Для оценки паропроницаемости данных систем используются различные методики определения фактора окклюзии, однако на данный момент в исследованиях описаны разрозненные подходы, что не позволяет гармонизировать результаты исследований и описать оптимумы для данного параметра.

Цель. Разработка методики определения паропроницаемости ПАС, измерение фактора окклюзии, а также изучение наиболее значимых факторов, влияющих на точность определения данной характеристики.

Материалы и методы. Определение паропроницаемости проводилось с использованием специальной установки, представляющей собой ячейку с водой с закрепленной над ней мембраной, на которую наносился модельный состав ПАС. В качестве ячеек использовались мерные цилиндры объемом 25 мл (Россия) или пенициллиновые флаконы объемом 10 мл с гладким горлом (Россия), в качестве мембран для нанесения ПАС – мембраны для стерилизующей фильтрации (нейлон, ЭПМ.К, ООО НПП «Технофильтр», Россия) и Sartopure® PP3 (полипропилен, Sartorius Stedim Biotech, Германия), диализный мешок MEMBRA-CEL® (ацетат целлюлозы, Viskase Companies, Inc., США). В качестве герметиков, используемых для изолирования воздушных потоков вокруг мембраны, – Parafilm M, С-силикон ZetaPlus L Intro Kit (Zhermack, Польша, Италия), стержневой термоклей Master Hand (Union Source Co., Ltd., Китай), УФ-отверждаемый материал «УНИРЕСТ» (ООО «СтомаДент», Россия). Сравнительный анализ материалов и методов проводился на модельном образце ПАС, содержащем 0,5 % (м/о) Kollicoat® MAE 100P (BASF, Германия), 3 % (м/о) Soluplus® (BASF, Германия), 2 % (м/о) Kollisolv® PEG-400 (BASF, Германия), 70%-й спирт этиловый (СОАО «Ферейн», Беларусь).

Результаты и обсуждение. Комбинация Parafilm M и герметиков показала высокую эффективность герметизации. Для синтетических мембран окклюзионный фактор варьировался в зависимости от типа мембраны от 9,35 ± 3,58 до 16,86 ± 6,09, что отражает низкую или среднюю степень окклюзии модельного состава ПАС и согласуется с опубликованными данными.

Заключение. В ходе исследования удалось разработать оптимизированную методику определения паропроницаемости для ПАС. Было отмечено, что необходим рационализированный подбор мембран, учет вероятности абсорбции влаги мембранами, способ герметизации и калибровки ячейки, уровни температуры и влажности, давление пара.

Ключевые слова: окклюзия, окклюзия пленок, паропроницаемость, пленкообразующий спрей, пленкообразующие аэродисперсные системы

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

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина – руководство исследованием, редакционные замечания, утверждение текста статьи к публикации. М. М. Шумкова, А. А. Ананян, М. В. Помыткина – разработка дизайна исследования, оценка результатов исследования, редактирование текста статьи. М. М. Шумкова, М. В. Помыткина – написание текста статьи. М. М. Агабалян, Г. Пуя – выполнение экспериментальной части исследования.

© Шумкова М. М., Помыткина М. В., Ананян А. А., Пуя Г., Агабалян М. М., Бахрушина Е. О., 2025
© Shumkova M. M., Pomytkina M. V., Ananian A. A., Pouya G., Agabalyan M. M., Bakhrushina E. O., 2025

Благодарность. Благодарим Е. Новожилову и Д. Белоусова за комментарии по улучшению статьи, Silgan Dispersing Systems Hemer, Sartorius, ООО НПП «Технофильтр» за предоставление спреев и мембран.

Для цитирования: Шумкова М. М., Помыткина М. В., Ананян А. А., Пуя Г., Агабалян М. М., Бахрушина Е. О. Разработка методики определения паропроницаемости для пленкообразующих аэродисперсных систем. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):181–192. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1773

Development of water vapor permeability determination methodology for spray film-forming systems

Marina M. Shumkova✉, Maria V. Pomytkina, Arsen A. Ananian, Ghazaleh Pouya, Margarita M. Agabalyan, Elena O. Bakhrushina

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:** Marina M. Shumkova. **E-mail:** shumkovamm@gmail.com

ORCID: Marina M. Shumkova – https://orcid.org/0000-0002-4448-2588;
Maria V. Pomytkina – https://orcid.org/0000-0002-6380-1302;
Arsen A. Ananian – https://orcid.org/0009-0008-3418-5003;
Ghazaleh Pouya – https://orcid.org/0009-0009-6112-7420;
Margarita M. Agabalyan – https://orcid.org/0009-0004-6988-6222;
Elena O. Bakhrushina – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346.

Received: 28.02.2024 **Accepted:** 25.02.2025 **Published:** 28.02.2025

Abstract

Introduction. Spray film-forming systems (SFFSs) are dosage forms that form an *in situ* film when sprayed. One of the key features of SFFSs is partial vapor permeability, a special case of occlusion. Various methods assess vapor permeability by determining the occlusion factor, but disparate approaches in studies prevent harmonizing results and identifying optimal parameters.

Aim. Development of a methodology for determining the vapor permeability of spray film-forming systems, measuring the occlusion factor and studying the most significant factors affecting the accuracy of determining this characteristic.

Materials and methods. Determination of vapor permeability was carried out using a special setup, consisting of a cell with water and a membrane fixed over it, on which the model composition was applied. Measurement cylinders of 25 ml (Russia) or penicillin vials with a smooth neck of 10 ml (Russia), membranes for filtration and dialysis (nylon, EPM.K, LLC RME "Technofilter", Russia), dialysis bags MEMBRA-CEL® (cellulose acetate, Viskase Companies, Inc., USA) and Sartopure® PP3 (polypropylene, Sartorius Stedim Biotech, Germany) were used. As sealants to isolate airflow around the membrane Parafilm M, C-silicone ZetaPlus L Intro Kit (Zhermack, Poland, Italy), hotmelt adhesive Master Hand (Union Source Co., Ltd., China), UV-curable material "UNIREST" (LLC "StomaDent", Russia) were used. Comparative analysis of materials was carried out on a model composition containing 0.5 % (m/o) Kollicoat® MAE 100P (BASF, Germany), 3 % (m/o) Soluplus® (BASF, Germany), 2 % (m/o) Kollisolv® PEG-400 (BASF, Germany), 70 % ethyl alcohol (SOJSC "Ferein", Belarus).

Results and discussion. The combination of Parafilm M and the presented sealants showed high performance. Synthetic membrane occlusion factor for the model substance varied depending on the membrane type from 9.35 ± 3.58 to 16.86 ± 6.09, reflecting low-medium degree of occlusion.

Conclusion. In this study optimized techniques for determining the vapor permeability for SFFS were developed. It was observed that rationalized membrane selection, consideration of the probability of moisture absorption by the membranes, method of sealing and cell calibrations, temperature and humidity levels, and vapor pressure were necessary.

Keywords: occlusion potential, film occlusion, water-vapor permeability, film-forming spray, film-forming systems

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

Contribution of the authors. Elena O. Bakhrushina – research supervision, editorial comments, approval of the text of the article for publication. Marina M. Shumkova, Arsen A. Ananian, Maria V. Pomytkina – development of the research design, evaluation of the research results, editing of the text of the article. Marina M. Shumkova, Maria V. Pomytkina – writing the text of the article. Margarita M. Agabalyan, Ghazaleh Pouya – fulfillment of the experimental part of the study.

Acknowledgment. We thank E. Novozhilova and D. Belousov for comments on improving the article, Silgan Dispersing Systems Hemer, Sartorius, LLC RME "Technofilter" for providing sprays and membranes.

For citation: Shumkova M. M., Pomytkina M. V., Ananian A. A., Pouya G., Agabalyan M. M., Bakhrushina E. O. Development of water vapor permeability determination methodology for spray film-forming systems. *Drug development & registration*. 2025;14(1):181–192. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1773

ВВЕДЕНИЕ

Пленкообразующие аэродисперсные системы (ПАС) представляют собой инновационный метод доставки лекарственных веществ (ЛВ), при котором частицы твердых фармацевтических агентов в составе растворов или суспензий распыляются наружно или местно и формируют так называемую лекарственную пленку.

Одной из ключевых характеристик ПАС является окклюзия, в основе которой лежит покрытие кожи материалами, предотвращающими попадание влаги, воздуха, внешних раздражителей и патогенов на поверхность кожи [1]. Создавая барьер на поверхности раны, ПАС могут обеспечивать оптимальную влажность и защищать рану от внешних загрязнений. Тест на окклюзию позволяет оценить способность ПАС поддерживать влажность и создавать подходящую среду для заживления ран или терапии кожных заболеваний [2, 3]. Также в современных исследованиях подчеркивается влияние и значимость окклюзии для усиления проницаемости кожного барьера для активных фармацевтических субстанций, что играет немаловажную роль в траснсдермальной доставке компонентов лекарственных средств. Данный механизм усиления проницаемости связан с набуханием корнеоцитов, вызванным задержкой воды, и разрушением корнеодесмосомальных связей, что приводит к усилению проницаемости и позволяет уменьшить количество активаторов всасывания в составе лекарственной формы [4].

Однако большинство исследователей, изучающих свойства и параметры ПАС, проводят оценку параметра окклюзии при помощи нестандартизированных методик, поскольку стандартизованные методы используют пленку, полученную методом выливания или экструзии [5], что нерелевантно для пленок, полученных методом распыления, ввиду различий в морфологии пленок [6–9]. При построении дизайна исследования по анализу паропроницаеомости остается открытым множество вопросов. Так, например, при распылении ПАС образуются довольно тонкие пленки, которые трудно отделить от субстрата или закрепить на стандартизированных приборах для определения параметра окклюзии, значительно разнятся условия экспериментов, а также используемые методы. В то же время прежние нормативные документы более не используются, а малообоснованные и нестандартизованные вариации подходов к исследованию окклюзии множатся [1, 7, 9]. В результате не представляется возможным гармонизировать результаты исследований и описать оптимумы для данного параметра, что является серьезным препятствием в процессе фармацевтической разработки ПАС.

Таким образом, **целью данного исследования** является подбор оптимальных материалов, параметров и методов измерения окклюзии ПАС, то есть разработка методики определения паропроницаемости и измерение наиболее доступного из численных параметров – фактора окклюзии, а также изучение наиболее значимых факторов, влияющих на точность определения данной характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа различных методик исследования паропроницаемости использовался модельный состав (МС) пленкообразующего спрея, содержащий 0,5 % (м/о) Kollicoat® MAE 100P (BASF, Германия), 3 % (м/о) Soluplus® (BASF, Германия), 2 % (м/о) Kollisolv® PEG-400 (BASF, Германия), 70%-й спирт этиловый (СОАО «Ферейн», Беларусь). Технология изготовления заключалась в последовательном смешении компонентов в течение 60 мин без нагревания с использованием магнитной мешалки C-MAG HS 10 digital (IKA, Германия) при температуре 22 °C. Раствором наполняли спреи Mark II™ Pump (Silgan Dispersing Systems Hemer GmbH, Германия) на 0,15 мл с насадкой «throat short».

Целевая установка (рисунок 1) для проведения эксперимента по определению паропроницаемости состояла из следующих элементов:

- Мембраны – материала, служащего подложкой (или матрицей), на поверхность которого наносят модельный состав.
- Модельного состава – пленкообразующей аэродисперсной системы, находящейся в форме спрея, которая наносится на мембрану с целью анализа свойств паропроницаемости пленки, формируемой при распылении (подобные системы имеют недостаточную прочность для отделения от поверхности, на которую их наносят). Распыление МС производилось перпендикулярно с расстояния 10 см на цельную мембрану по 0,15 мл. Время высыхания пленки составляло 30 мин.
- Ячейки – цельной конструкции, имеющей отверстие определенной площади в верхней части. В качестве ячеек для оценки паропроницаемости использовали стеклянные мерные цилиндры объемом 25 мл (Россия).
- Герметизирующего материала – средства, которое используется для закрепления мембраны с целью изоляции зоны, через которую проходит пар, по размеру отверстия ячейки, а также для исключения иных воздушных путей, через которые также может проходить пар.
- Подготовленной ячейки – мерного цилиндра, наполненного водой, предварительно нагретой до температуры 32 °C, на котором при помощи герметизирующего материала закреплена мембрана с нанесенным на ее поверхность модельным составом.
- Камеры – любой окружающей подготовленную ячейку конструкции, которая является основной внешней средой, контактирующей с ячейкой. В качестве камеры использовался суховоздушный шкаф FED 53 (BINDER, Германия), нагретый до

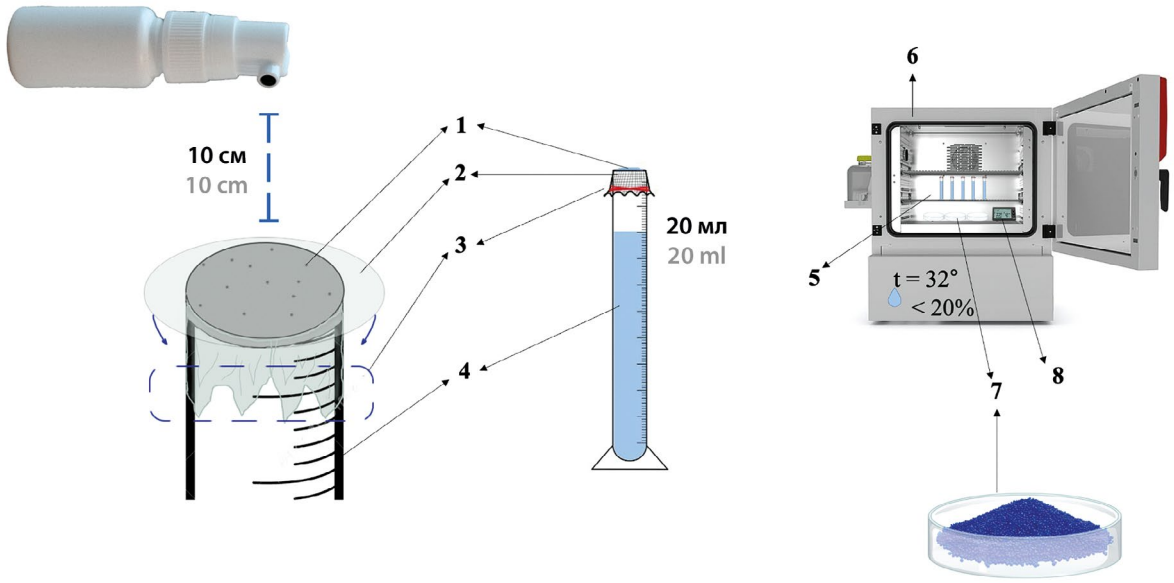


Рисунок 1. **Целевая установка для проведения эксперимента по определению паропроницаемости.**

1 – модельный состав; 2 – мембрана; 3 – герметизирующий материал; 4 – ячейка; 5 – подготовленная ячейка; 6 – камера; 7 – силикагель для осушения камеры; 8 – термогигрометр

Figure 1. **Target construction for the experiment on vapor permeability determination.**

1 – model composition; 2 – membrane; 3 – sealing material; 4 – cell; 5 – prepared cell; 6 – chamber; 7 – silica gel for drying the chamber; 8 – thermohygrometer

температуры 32 °C. Дно камеры наполняли осушенным силикагелем, влажность поддерживалась на уровне ниже 20 % и контролировалась с помощью термогигрометра RGK TH-10 (RGK, Россия).

Анализ материалов для герметизации

Для анализа материалов для герметизации использовались флаконы пенициллиновые объемом 10 мл с гладким горлом (рисунок 2). В качестве самих герметизирующих материалов использовались ZetaPlus L Intro Kit (С-силикон) (Zhermack, Польша, Италия), пломбировочный материал УФ-отверждения «УНИРЕСТ» с отверждением 2 мин (ООО «СтомаДент», Россия), стержневой термоклей Master Hand (Union Source Co., Ltd., Китай), состоящий из этилвинилацетата, смол и парафинового воска с температурой плавления 80 °C, Parafilm M (APTACA Spa, Италия). Каждый флакон наполняли 10 мл воды очищенной, герметизировали (С-силикон / стержневой термоклей / пломбировочный материал) с Parafilm M или без него таким образом, чтобы мембрана в просвете ячейки имела доступ для проникновения пара, а зона вокруг просвета ячейки была изолирована и при этом не создавалось воздушных путей, позволяющих расширить площадь газообмена. В качестве контроля использовался флакон без использования других материалов, но с зоной, изолированной Parafilm M вокруг просвета (в таком случае в складках Parafilm M образовывались неизолированные воздушные пути). Для определения паропроницаемости способности герметиков, служащих для изоляции рабочей зоны просвета ячейки, для определения фактора окклюзии производилось взвешивание в контрольных точках: 0, 24 и 48 ч с использованием аналитических весов ME104 (METTLER TOLEDO, Швейцария).

Рисунок 2. **Флакон, используемый для анализа герметизирующих материалов**

Figure 2. **Vial used to analyze sealant materials**

Анализ мембран для ПАС

В качестве мембран для нанесения МС использовались: мембрана для стерилизующей фильтрации (нейлон, ЭПМ.К, ООО НПП «Технофильтр», Россия),

Таблица 1. Характеристика используемых мембран

Table 1. Characterisation of the membranes used

Мембрана Membrane	**Материал** Material	**Размер пор (мкм или кДа)** Pore size (μm or kDa)	**Использование с неводными растворителями** Compatibility with non-aqueous solvents	**Ранее использовали для *in-vitro*-тестов ПАС** Previously used for in vitro testing of SFFS	**Ссылки** References
PA	Полиамид Polyamide	0,45	+	+	[10]
PP	Полипропилен Polypropylene	0,45	+	+	[11]
M-Cel	Регенерированная целлюлоза Regenerated cellulose	12–14	+	–	*

Примечание. PA – MMK-0,45-142; PP – Sartopure PP3; M-Cel – диализный мешок MEMBRA-CEL®.

* MEMBRA-CEL® dialysis membranes. Available at: https://www.viskase.com/products/applied-technologies/membra-cel/ Accessed: 28.02.2024.

Note. PA – MMK-0,45-142; PP – Sartopure PP3; M-Cel – MEMBRA-CEL® dialysis bag.

* MEMBRA-CEL® dialysis membranes. Available at: https://www.viskase.com/products/applied-technologies/membra-cel/ Accessed: 28.02.2024.

диализный мешок MEMBRA-CEL® с диаметром пор 12–14 кДа (ацетат целлюлозы, Viskase® Companies, Inc., США), Sartopure PP3 с размером пор 0,45 мкм (полипропилен, Sartorius Stedim Biotech, Германия) (таблица 1).

До распыления пленки, после распыления пленки и испарения растворителя, а также после смывания пленки и полного высыхания мембраны производилась микроскопия с использованием прямого микроскопа Leica DM4 при увеличении 100x, 40x и 10x в зависимости от особенностей мембраны (толщины и морфологии). Производилась оценка целостности мембран во избежание повреждения растворителем и натяжением при высыхании пленки, а также для оценки равномерности распределения пленки.

Мерные цилиндры наполняли 20 мл воды очищенной. На пять видов мембран наносили модельный состав; контроль осуществлялся в виде мембран без нанесенного МС. Все эксперименты были проведены в трех повторностях. Мембраны закреплялись на мерных цилиндрах, края герметизировали, как описано ранее, с помощью пломбировочного материала УФ-отверждения «УНИРЕСТ» с отверждением 2 мин (ООО «СтомаДент», Россия) и Parafilm M (метод, изображенный на рисунке 2). Через 30 мин взвешивалась масса установки. Взвешивание также производилось в контрольных точках: 0, 24 и 48 ч (аналогично тому, как это производилось при анализе средств для герметизации). Для взвешивания использовали аналитические весы METTLER TOLEDO ME104 первого класса точности (METTLER TOLEDO, Швейцария). Мембраны использовали без дополнительной пробоподготовки.

Обработка результатов

Для выбора формулы расчета окклюзии используют оценку скорости передачи водяного пара (Water-Vapor Transmission Rate), проницаемости поверхности для водяного пара (Water-Vapor Permeance), проницаемости для водяного пара (Water-Vapor Permeability) и оценку фактора окклюзии (Occlusion Factor). Для определения первых трех показателей используется площадь поверхности пленки и ее толщина, что представляется затруднительным в случае использования мембран ввиду их пористой структуры, в связи с чем их использование для анализа ПАС не распространено[1] [11].

Фактор окклюзии (Occlusion Factor) относится к способности материала или состава блокировать испарение влаги с поверхности кожи.

В данном исследовании паропроницаемость ПАС изучалась по величине фактора окклюзии [12]:

$$F(\%) = 100 \cdot \left[\frac{A - B}{A} \right],$$

где F – коэффициент окклюзии; A – потеря воды из стаканов без образцов, г; B – потеря воды из стаканов, содержащих пленку, г.

Все экспериментальные измерения проводились в трех повторностях. Данные выражались как «среднее значение ± стандартное отклонение (SD)». Для анализа данных был использован Python (v. 3.8), библиотеки pandas и seaborn.

[1] MEMBRA-CEL® dialysis membranes. Available at: https://www.viskase.com/products/applied-technologies/membra-cel/ Accessed: 28.02.2024.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За последние десятилетия анализ паропроницаемости пленкообразующих аэродисперсных систем проводился с помощью нестандартизованной методики, которая использовалась в различных вариациях [2, 7–11]. В исследованиях не приведены обоснования выбора тех или иных мембран для нанесения пленки, а также отсутствуют описания методов герметизации мембран, необходимых для изоляции просвета ячейки, на которую они наносятся [7, 9]. Как правило используются модифицированные методики ASTM E96 «Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials» от Американской ассоциации испытаний и материалов (American Society for Testing and Materials, ASTM International). Основная причина подбора мембран для распыления – невозможность отделения распыляемой пленки от поверхности [11–12].

В рамках данного исследования были предложены различные ячейки, камеры и герметизирующие материалы, в том числе ранее не используемые в схожих исследованиях. Каждый из данных объектов был оценен в предварительном исследовании при подготовке вспомогательных материалов (таблица 2).

Анализ средств для герметизации

При закреплении мембраны необходимо изолировать ту ее часть, которая находится вне просвета верхней части ячейки, чтобы ограничить область прохождения пара через мембрану. Поскольку края мембраны в таком случае будут иметь складки, целесообразно изучить также влияние образуемых между складками воздушных путей и возможности их изоляции для более точного определения значений паропроницаемости.

Таблица 2. Оценка применимости вспомогательных материалов

Table 2. Assessment of the applicability of auxiliary materials

	Название Name	**Применимость** Applicability	**Комментарий** Comment
Ячейки Cells	Мерный цилиндр / мерный стакан Measuring cylinder / beaker	++	Стандартизованная доступная система с нанесенными мерными делениями [7, 9, 13] Standardized accessible system with marked divisions [7, 9, 13]
	Чашки Петри Petri dishes	–	Помещались в эксикатор; требуют мембран определенного размера из-за большого диаметра просвета Placed in a desiccator; require membranes of a certain size due to the large lumen diameter
	Флаконы Bottles	+	Высоко стандартизованы, но не подходят по объему для исследования, поскольку объем воды, используемый во флаконах с различными мембранами испаряется менее чем за 24 ч. Могут использоваться с более плотными материалами, чем мембраны и диализные пленки Highly standardized, but not suitable for study volume, since the volume of water used in vials with various membranes evaporates in less than 24 hours. Can be used with denser materials than membranes and dialysis films
	Стандартизованные, изготовленные в лабораторных условиях чаши в соответствии с рекомендациями нормативных документов (локальные и международные фармакопеи, ASTM E96 и др.) Standardized cups manufactured in laboratory conditions in accordance with the recommendations of regulatory documents (local and international pharmacopoeias, ASTM E96, etc.)	–	Могут быть смоделированы определенного объема по потребностям исследования и напечатаны на 3D-принтере. Дорогой метод, требующий определенных параметров 3D-принтера и используемых материалов для печати, а также стандартизации по паропроницаемости самой чаши. Путем подбора параметров печати и материалов возможно добиться высокой степени стандартизации [1] They can be modeled to a certain volume according to research needs and printed on a 3D printer. An expensive method that requires certain parameters of the 3D printer and the printing materials used, as well as standardization of the vapor permeability of the bowl itself. By selecting printing parameters and materials, it is possible to achieve a high degree of standardization [1]

Продолжение таблицы 2

	Название **Name**	**Применимость** **Applicability**	**Комментарий** **Comment**
Камеры Cameras	Эксикатор Desiccator	+	Высоко стандартизованы, поддерживают необходимые уровни влажности и давления пара. Низкая вместимость по количеству образцов; нестабильность системы при открывании ввиду создаваемых механических колебаний системы и смачивания мембран [1] Highly standardized, maintaining the required levels of humidity and steam pressure. Low sample capacity; instability of the system when opening due to the created mechanical vibrations of the system and wetting of the membranes [1]
	Суховоздушный шкаф Dry air cabinet	+	Стандартизованная доступная система со встроенными параметрами нагревания и термометром. Из недостатков – низкий отток влаги из системы [13] Standardized, affordable system with built-in heating parameters and thermometer. Disadvantages include low moisture outflow from the system [13]
	Открытые (комнатные) условия Open (room) conditions	+	Нестандартизованная система с относительно нестабильными термическими и гигроскопическими условиями [7, 9] Non-standardized system with relatively unstable thermal and hygroscopic conditions [7, 9]
	Изготовленная в лабораторных условиях система (установка) с постоянным мониторингом условий Laboratory-manufactured system (installation) with constant monitoring of conditions	–	Камера может быть смоделирована таким образом, чтобы непрерывно определять массу конструкций, влажность и температуру среды, а также давление пара и обеспечивать своевременную смену осушающего элемента. Необходима квалификация установки [8] The chamber can be modeled in such a way as to continuously determine the mass of structures, humidity and temperature of the environment, as well as steam pressure, including ensuring timely change of the drying element. Installation qualification required [8]
Герметизирующие материалы Sealing materials	Parafilm M	++	Материал стандартизован, хорошо изолирует мембрану по площади просвета ячейки, однако образуются незначительные складки, приводящие к образованию воздушных потоков The material is standardized, it insulates the membrane well over the lumen area of the cell, however, minor folds are formed, leading to the formation of air flows
	С-силикон C-silicone	–	Материал стандартизован, хорошо изолирует мембрану по площади просвета ячейки The material is standardized and insulates the membrane well over the cell lumen area
	Двухкомпонентный силикон Two-component silicone	–	Может быть использован со стандартизованными чашами в форме прокладок. Требует моделирования формы для выливания. Может быть использован для систем, собранных в лабораторных условиях Can be used with standardized cup-shaped gaskets. Requires modeling of the pouring mold. Can be used for systems assembled in laboratory conditions

Окончание таблицы 2

	Название **Name**	**Применимость** **Applicability**	**Комментарий** **Comment**
Герметизирующие материалы Sealing materials	Стержневой термоклей Hot melt adhesive rod	++	Материалы имеют различные составы, широко доступны, редко стандартизованы, хорошо изолируют мембрану по площади просвета ячейки, однако неудобны в использовании, плохо открепляются от стекла и пластика и повреждают менее прочные материалы при откреплении, например мембраны или Parafilm M The materials have different compositions, are widely available, are rarely standardized, well isolate the membrane over the lumen area of the cell, but are inconvenient to use, are difficult to detach from glass and plastic and damage less durable materials when detached, for example, membranes or Parafilm M
	УФ-отверждаемый материал УФ-отверждаемый материал	++	Материалы имеют различные составы, стандартизованы, широко доступны, хорошо изолируют мембрану по площади просвета ячейки, однако неудобны в использовании, плохо открепляются от стекла и пластика и повреждают менее прочные материалы при откреплении, например мембраны или Parafilm M The materials have different compositions, are standardized, widely available, well isolate the membrane over the lumen area of the cell, but are inconvenient to use, are difficult to detach from glass and plastic and damage less durable materials when detached, for example, membranes or Parafilm M

Примечание. ++ Высокая применимость. Материал является наиболее подходящим для использования в данном исследовании.

+ Средняя применимость. Материал может быть использован, но также может потребоваться дополнительная адаптация или учет некоторых ограничений.

– Неприменим для данного исследования, но обладает потенциалом для применения в иных схожих исследованиях. Материал имеет ограничения или недостатки, которые могут повлиять на результат.

Note. ++ High applicability. The material is most suitable for use in this study.

+ Average applicability. The material can be used, but additional adaptation or limitations may need to be taken into account.

– Not applicable to this study, but has potential for use in other similar studies. The material has limitations or shortcomings that may affect the results.

Результаты демонстрируют критическую роль герметиков в комбинации с Parafilm M в повышении эффективности герметизации (таблица 3). Эффективность использования герметиков с Parafilm M была следующая (от самого проницаемого герметизирующего материала до самого непроницаемого):

С-силикон > стержневой клей >

пломбирующий (УФ-отверждаемый) материал.

В изученных нами исследованиях использование герметиков практически не описано, несмотря на рекомендации ASTM E96, однако стоит учитывать, что они играют значимую роль в изучении паропроницаемости.

Анализ мембран для ПАС

Для подбора мембран используется теоретический и практический подход. В первую очередь мембрана должна быть совместима с исследуемым составом. Липофильность и гидрофильность могут влиять на распределение модельного состава, и некоторые мембраны могут быть неприменимы для определенных исследуемых составов[1]. Гидрофильные или дифильные мембраны лучше взаимодействуют с полярными молекулами, такими как вода.

[1] Pharmacopeia (USP-50(2)), General Chapters: Filters And Membranes. Available at: https://online.uspnf.com/uspnf/document/2_GUID-96923282-C14E-4714-9FD0-9ABE3BA7704F_10101_en-US?source=Activity. Accessed: 21.10.2024.

Таблица 3. **Эффективность герметизирующих материалов**

Table 3. **Effectiveness of sealing materials**

	PM	PM_UV	PM_GR	PM_CS
F24, %	99,1883 ± 0,0251	99,9815 ± 0,0118	99,9370 ± 0,0085	99,3101 ± 0,8711
F48, %	98,8199 ± 0,2561	99,9283 ± 0,0158	99,9201 ± 0,0069	99,9258 ± 0,0069

Примечание. F24 – фактор окклюзии, рассчитанный на основании данных за 24 ч; F48 – фактор окклюзии, рассчитанный на основании данных за 48 ч; PM – Parafilm M; PM_UV – Parafilm M и пломбировочный материал; PM_GR – Parafilm M и стержневой клей, PM_CS – Parafilm M; C-силикон.

Note. F24 – occlusion factor calculated based on 24 h of study data; F48 – occlusion factor calculated based on 48 h of study data; PM – Parafilm M; PM_UV – Parafilm M and UV curable filler; PM_GR – Parafilm M and glue rod; PM_CS – Parafilm M; C-silicone.

Гидрофильность способствует увлажнению поверхности мембраны, что может увеличивать паропроницаемость. Тем не менее использование мембран ограничивается их коммерческой доступностью, в то время как импортозамещение мембран на российском рынке постепенно развивается. Плотность мембраны должна быть такой, чтобы в рамках 24–48 часов исследования пар проходил с подходящей для исследования скоростью.

Все используемые мембраны показали однородную распределяемость ПАС при микроскопии, а также отсутствие деструкции вследствие воздействия неводных растворителей и натяжения пленки при высыхании (рисунок 3).

На ранних этапах исследования также были оценены подскорлуповые пленки яйца, полученные путем замачивания в воде на 10 мин и последующей обработки соляной кислотой 0,5 М и 1,2 М и отделения от яичной скорлупы, аналогично исследованию Wani et al. (2018) [14]. Несмотря на то, что при микроскопии не было выявлено повреждения пленок вне зависимости от концентрации кислоты, использовавшейся для отделения, фактор окклюзии значительно разнился между повторностями, а сами подскорлуповые пленки были очень хрупкими и легко повреждались при избыточном натяжении с течением времени, поэтому в дальнейшем сравнении подскорлуповая пленка яйца не использовалась.

Диализный мешок и мембрана из нейлона показали схожие факторы окклюзии: от 9,35 ± 3,58 до 16,86 ± 6,09 (рисунок 4). Проницаемость для Sartopore PP3 для 24 и 48 ч составила 21,86 ± 1,47 и 6,32 ± 2,62 соответственно. Это также может быть связано с морфологией мембраны, влиянием на абсорбцию пара внутри ячейки или с содержанием остаточной влаги в мембранах. Полученные экспериментальные данные показывают низкую или среднюю окклюзию, что согласуется с опубликованными ранее результатами мировых исследований.

В схожем исследовании пленка, разработанная Ranade и соавт. (2017), показала фактор окклюзии около 10,35. Авторами использовался мерный стакан

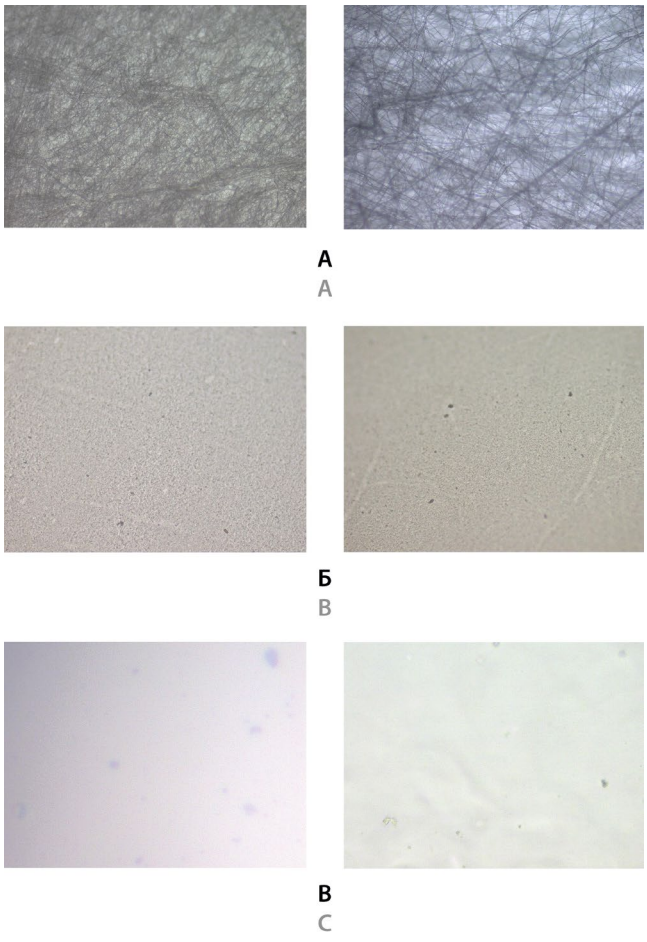


Рисунок 3. **Микроскопия мембран до и после нанесения модельного состава.**

1 – полипропилен, Sartopure PP3 (увеличение 10x); 2 – нейлон, ЭПМ.К (увеличение 40x); 3 – ацетат целлюлозы, MEMBRA-CEL® (увеличение 40x)

Figure 3. **Microscopy of the membranes before and after application of the model composition.**

1 – polypropylene, Sartopure PP3 (10x magnification); 2 – nylon, EPM.K (40x magnification); 3 – cellulose acetate, MEMBRA-CEL® (40x magnification)

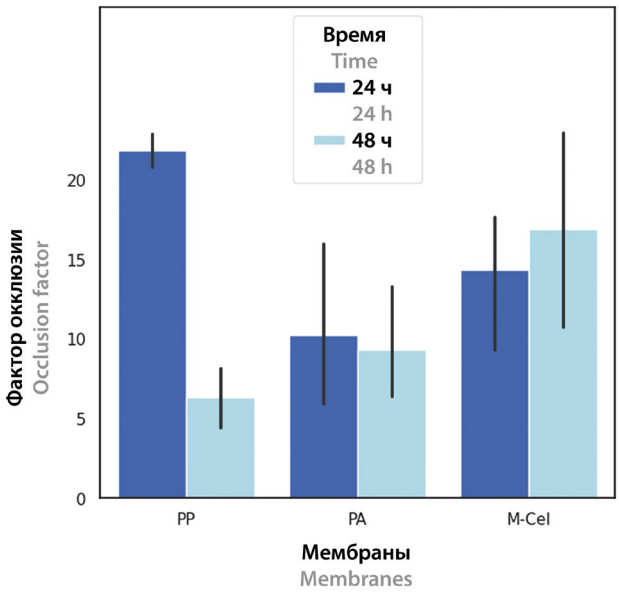


Рисунок 4. Факторы окклюзии при использовании различных мембран.

PP – мембрана Sartopure PP3; PA – мембрана из нейлона; M-Cel – диализный мешок Membra-Cel

Figure 4. Occlusion factors for different types of membranes.

PP – Sartopure PP3 membrane; PA – nylon membrane; M-Cel – dialysis membrane

в качестве ячейки, бумажный фильтр Whatman в качестве мембран, способ герметизации не описывался. Исследование проводилось при комнатной температуре и постоянной влажности на протяжении 48 ч [9].

В исследовании Umar и соавт. (2021) сравнивался фактор окклюзии для ПАС, содержащих разную концентрацию хитозана и пропиленгликоля. Значение фактора окклюзии варьировалось от 12,44 ± 2,97 до 25,26 ± 4,11, а для оптимизированного состава составило 14,57 ± 3,41 % [7].

В исследовании Nitthikan и соавт. (2023) исследовали фактор окклюзии распыляемой пленки, содержащей неводные растворители, с использованием бумажного фильтра Whatman, закрепленного на мерном стакане, при 40 °C в течение 24 ч при влажности 50–55 %. Фактор варьировался от 1,5 до 18,86 и в оптимальном составе достигал 17,67, что рассматривалось как подходящее окклюзионное покрытие для кожи. Герметизация и валидация мембраны также не обсуждались [13].

В случае мембран, традиционно используемых для фильтрации, следует отметить, что мембраны из немодифицированной целлюлозы неустойчивы к воздействию неводных растворителей, таким образом, стандартные бумажные фильтры при теоретическом подходе к подбору не рекомендуются для исследований[1].

Исследование при различных показателях температуры и влажности обсуждалось только в некоторых исследованиях и сильно варьировалось [1, 13]. Повышение температуры увеличивает испарение и приводит к повышению давления водяного пара, что вызывает изменение количества пара, проходящего через пленку. Так, в исследовании Zurdo Schroeder и соавт. измерение температуры проводилось при 25, 32 и 37 °C [1], а влажность снижали до 0 %, тогда как в исследовании Nitthikan и соавт. она достигала 55 % [13]. Осушение воздуха в процессе исследования также может играть значительную роль из-за влияния давления пара в системе. Использование осушенного силикагеля, в том числе индикаторного, может упростить задачу [8].

Таким образом, полученные в обоснованном эксперименте данные согласуются с ранее опубликованными результатами, что подтверждает правильность предложенной методики. Тем не менее возможно улучшение ячейки, например, при помощи 3D-печати, но без воссоздания экспериментальной установки с единовременной оценкой необходимого количества образцов [8]. Также возможен поиск аналогичных методик, не связанных с вычислением фактора окклюзии, однако сопоставимых по доступности [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Паропроницаемость пленок, в том числе распыляемых, для лечения ран и для наружного применения обсуждается в многочисленных исследованиях ввиду неоспоримости ряда преимуществ данной лекарственной формы (антибактериального барьера, обеспечения умеренной увлажненности среды, управляемой газопроницаемости) [15, 16].

Исследования показали, что при определении паропроницаемости необходимо учитывать способ герметизации, калибровку ячейки, условия проведения эксперимента для поддержания уровня влажности, давления пара, температуры, способы вычисления параметров окклюзии, а также проницаемость мембран для пара, так как пар должен проходить с достаточной скоростью.

В качестве ячеек наиболее подходящими являются те, которые надлежащим образом откалиброваны и имеют соответствующий размер сечения отверстия для газообмена, обеспечивающий наглядное испарение влаги через мембраны в течение необхо-

[1] Pharmacopeia (USP-50(2)), General Chapters: Filters And Membranes. Available at: https://online.uspnf.com/uspnf/document/2_GUID-96923282-C14E-4714-9FD0-9ABE3BA7704F_10101_en-US?source=Activity. Accessed: 21.10.2024.

димого времени. Примерами таких ячеек могут служить мерные стаканы, цилиндры, ячейка, изготовленная в соответствии с ASTM E96.

В рамках подбора мембран следует обращать внимание на свойства самой мембраны, совместимость с растворителем, поскольку для ПАС обычно используют неводные растворы, несовместимые с некоторыми материалами. Мембрана также должна быть достаточно прочная и эластичная во избежание образования трещин. Размер пор мембран должен быть таким, чтобы образовывалась однородная пленка. *Ex vivo* мембраны в данной работе не обсуждались, поскольку подлежат значительной валидации и отличаются от модели к модели. Такие свойства, как липофильность и гидрофильность мембран, а также возможность их регенерации после исследования, являются дополнительным возможным вопросом для изучения.

Длительность эксперимента обоснована способом применения лекарственной формы или медицинского изделия и варьируется от 24 до 72 ч.

Среди наиболее важных инструментов для изучения паропроницаемости был выделен влагопоглощающий элемент, в данном случае высушенный силикагель. В качестве элемента, стандартизующего среду, рационально использовать суховоздушный шкаф при температуре 32 или 37 °C.

Тем временем предложенный способ герметизации при помощи комбинации Parafilm M и дополнительных средств для герметизации представляет собой коммерчески доступный метод, обеспечивающий изоляцию ячейки, а также более эффективный, нежели использование Parafilm M в качестве монометода.

Несмотря на то что распыляемые пленки, по-видимому, обладают низкой окклюзией, она может быть критически важна для моделирования терапии при помощи ЛС и медицинских изделий в форме ПАС [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Zurdo Schroeder I., Franke P., Schaefer U. F., Lehr C.-M. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;65(1):111–121. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.07.015.
2. Godse K., Dethe G., Sawant S., Sharma A., Pereira R., Ghate S., Kuvi S., Pawar V., Parekar R., Khalse M., Patel K. Clinical evaluation of the safety and tolerability of film-forming sprays in patients with psoriasis and eczema. *Cureus*. 2024;16(3):e57020. DOI: 10.7759/cureus.57020.
3. Umar A. K., Butarbutar M. E. T., Sriwidodo S., Wathoni N. Film-forming sprays for topical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020;14:2909–2925. DOI: 10.2147/DDDT.S256666.
4. Pünnel L. C., Lunter D. J. Film-forming systems for dermal drug delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13(7):932. DOI: 10.3390/pharmaceutics13070932.
5. Кищенко В. М., Верниковский В. В., Привалов И. М., Шевченко А. М. Пленки в российской медицине и косметологии: история развития, классификация, технология. *Фармация и фармакология*. 2020;8(2):124–132. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-124-132.
6. Потороко И. Ю., Малинин А. В., Цатуров А. В., Кади А. М., Багале У. Биоразлагаемые материалы на основе растительных полисахаридов для упаковки пищевых продуктов. Часть 2: Управление процессами утилизации. *Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии*. 2020;8(4):30–37. DOI: 10.14529/food200404.
7. Umar A. K., Sriwidodo S., Maksum I. P., Wathoni N. Film-forming spray of water-soluble chitosan containing liposome-coated human epidermal growth factor for wound healing. *Molecules*. 2021;26(17):5326. DOI: 10.3390/molecules26175326.
8. Cazón P., Morales-Sanchez E., Velazquez G., Vázquez M. Measurement of the water vapor permeability of chitosan films: a laboratory experiment on food packaging materials. *Journal of Chemical Education*. 2022;99(6):2403–2408. DOI: 10.1021/acs.jchemed.2c00449.
9. Ranade S., Bajaj A., Londhe V., Babul N., Kao D. Fabrication of topical metered dose film forming sprays for pain management. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;100:132–141. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.01.004.
10. Paradkar M., Thakkar V., Soni T., Gandhi T., Gohel M. Formulation and evaluation of clotrimazole transdermal spray. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41(10):1718–1725. DOI: 10.3109/03639045.2014.1002408.
11. Sritharadol R., Nakpheng T., Wan Sia Heng P., Srichana T. Development of a topical mupirocin spray for antibacterial and wound-healing applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(10):1715–1728. DOI: 10.1080/03639045.2017.1339077.
12. Хафизова Л. Н., Мусин И. Н., Ксембаев С. С., Нестеров О. В. Физико-химическое обоснование эффективности сорбента «Целоформ» для защиты и лечения открытой раневой поверхности. *Вестник технологического университета*. 2015;18(9):178–182.
13. Nitthikan N., Leelapornpisid P., Naksuriya O., Intasai N., Kiattisin K. Multifunctional biological properties and topical film forming spray base on *Auricularia polytricha* as a natural polysaccharide containing brown *Agaricus bisporus* extract for skin hydration. *Cosmetics*. 2023;10(5):145.
14. Wani A., Sanghani C., Wani S. Formulation, characterization, and *in vitro* evaluation of novel microemulsion-based spray for topical delivery of isotretinoin. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(10):226–232. DOI: 10.22159/ajpcr.2018.v11i10.27019.
15. Bakhrushina E. O., Shumkova M. M., Sergienko F. S., Novozhilova E. V., Demina N. B. Spray Film-Forming systems as promising topical in situ Systems: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(1):154–169. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.11.014.
16. Alven S., Peter S., Mbese Z., Aderibigbe B. A. Polymer-based wound dressing materials loaded with bioactive agents: potential materials for the treatment of diabetic wounds. *Polymers*. 2022;14(4):724. DOI: 10.3390/polym14040724.
17. Furtado S. C., Srinivasan B., Abraham S. Wound healing concepts: contemporary practices and future perspectives. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2020;12(5):7–15. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i5.38588.

REFERENCES

1. Zurdo Schroeder I., Franke P., Schaefer U. F., Lehr C.-M. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;65(1):111–121. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.07.015.
2. Godse K., Dethe G., Sawant S., Sharma A., Pereira R., Ghate S., Kuvi S., Pawar V., Parekar R., Khalse M., Patel K. Clinical evaluation of the safety and tolerability of film-forming sprays in patients with psoriasis and eczema. *Cureus*. 2024;16(3):e57020. DOI: 10.7759/cureus.57020.
3. Umar A. K., Butarbutar M. E. T., Sriwidodo S., Wathoni N. Film-forming sprays for topical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020;14:2909–2925. DOI: 10.2147/DDDT.S256666.
4. Pünnel L. C., Lunter D. J. Film-forming systems for dermal drug delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13(7):932. DOI: 10.3390/pharmaceutics13070932.
5. Kishchenko V. M., Vernikovsky V. V., Privalov I. M., Shevchenko A. M. Films in russian medicine and cosmetology: development history, classification, technology. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(2):124–132. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-124-132.
6. Potoroko I. Yu., Malinin A. V., Tsaturov A. V., Kadi A. M., Bagale U. Biodegradable materials based on plant polysaccharides for food packaging. Part 2: Management recycling processes. *South Ural State University Bulletin. Series: Food and Biotechnology*. 2020;8(4):30–37. (In Russ.) DOI: 10.14529/food200404.
7. Umar A. K., Sriwidodo S., Maksum I. P., Wathoni N. Film-forming spray of water-soluble chitosan containing liposome-coated human epidermal growth factor for wound healing. *Molecules*. 2021;26(17):5326. DOI: 10.3390/molecules26175326.
8. Cazón P., Morales-Sanchez E., Velazquez G., Vázquez M. Measurement of the water vapor permeability of chitosan films: a laboratory experiment on food packaging materials. *Journal of Chemical Education*. 2022;99(6):2403–2408. DOI: 10.1021/acs.jchemed.2c00449.
9. Ranade S., Bajaj A., Londhe V., Babul N., Kao D. Fabrication of topical metered dose film forming sprays for pain management. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;100:132–141. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.01.004.
10. Paradkar M., Thakkar V., Soni T., Gandhi T., Gohel M. Formulation and evaluation of clotrimazole transdermal spray. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41(10):1718–1725. DOI: 10.3109/03639045.2014.1002408.
11. Sritharadol R., Nakpheng T., Wan Sia Heng P., Srichana T. Development of a topical mupirocin spray for antibacterial and wound-healing applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(10):1715–1728. DOI: 10.1080/03639045.2017.1339077.
12. Khafizova L. N., Musin I. N., Ksembaev S. S., Nesterov O. V. Physico-chemical substantiation of the effectiveness of the sorbent "Celoform" for the protection and treatment of open wound surfaces. *Bulletin of the Technological University*. 2015;18(9):178–182. (In Russ.)
13. Nitthikan N., Leelapornpisid P., Naksuriya O., Intasai N., Kiattisin K. Multifunctional biological properties and topical film forming spray base on *Auricularia polytricha* as a natural polysaccharide containing brown *Agaricus bisporus* extract for skin hydration. *Cosmetics*. 2023;10(5):145.
14. Wani A., Sanghani C., Wani S. Formulation, characterization, and *in vitro* evaluation of novel microemulsion-based spray for topical delivery of isotretinoin. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(10):226–232. DOI: 10.22159/ajpcr.2018.v11i10.27019.
15. Bakhrushina E. O., Shumkova M. M., Sergienko F. S., Novozhilova E. V., Demina N. B. Spray Film-Forming systems as promising topical in situ Systems: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(1):154–169. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.11.014.
16. Alven S., Peter S., Mbese Z., Aderibigbe B. A. Polymer-based wound dressing materials loaded with bioactive agents: potential materials for the treatment of diabetic wounds. *Polymers*. 2022;14(4):724. DOI: 10.3390/polym14040724.
17. Furtado S. C., Srinivasan B., Abraham S. Wound healing concepts: contemporary practices and future perspectives. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2020;12(5):7–15. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i5.38588.

Обзорная статья / Review article

УДК 549.67; 615.453.8

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1920

Check for updates

CC BY 4.0

Цеолиты и цеолитоподобные имидазольные каркасы в фармации (обзор)

Е. О. Бахрушина✉, Н. О. Белявский, В. Н. Кузина, А. И. Ходенок, Н. Б. Демина, Г. В. Раменская

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

ORCID: Е. О. Бахрушина – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346;
Н. О. Белявский – https://orcid.org/0009-0002-8522-2456;
В. Н. Кузина – https://orcid.org/0000-0003-0236-8389;
А. И. Ходенок – https://orcid.org/0000-0001-8326-3292;
Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791;
Г. В. Раменская – https://orcid.org/0000-0001-8779-3573.

Статья поступила: 30.08.2024 **Статья принята в печать:** 06.03.2025 **Статья опубликована:** 07.03.2025

Резюме

Введение. Одним из примеров новых полимеров для систем направленной доставки являются цеолиты (ZEO) и цеолитоподобные имидазольные каркасы (ZIF). ZEO, обладающие высокой пористостью, адсорбционной способностью и физико-химической стабильностью, активно используются в промышленности, экологии, фармации и биомедицине. ZIF, как тип металлоорганического каркаса, отличаются высокой термической и химической устойчивостью, биосовместимостью и регулируемой пористостью, что делает их перспективными для доставки лекарств. Оба полимера благодаря своим свойствам открывают новые возможности для создания таргетных препаратов с пролонгированным действием и минимальными побочными эффектами. Цель данного обзора – охарактеризовать ZEO и ZIF как перспективные полимеры для систем направленной доставки и рассмотреть их основные свойства.

Текст. В статье рассмотрены строение и методы анализа цеолитов и цеолитоподобных имидазольных каркасов, способы их синтеза, механизм действия, области применения полимеров в качестве систем направленной доставки.

Заключение. В обзоре показано, что химические и физические свойства полимеров ZEO и ZIF позволяют разрабатывать эффективные системы направленной доставки лекарственных средств, применяемых в онкологии, офтальмологии, стоматологии и ортопедии. Низкая цитотоксичность, регулируемая загрузка пор полимеров и эффективность внутриклеточного таргетирования подтверждают перспективность использования ZEO и ZIF в медицине.

Ключевые слова: цеолиты, цеолитоподобные имидазольные каркасы, металлоорганические каркасы, синтез цеолитов, системы доставки, полимеры

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

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина, Н. О. Белявский, В. Н. Кузина, Н. Б. Демина разработали методологию и концепцию исследования. Н. О. Белявский, Е. О. Бахрушина, В. Н. Кузина, занимались сбором и анализом литературных данных. Е. О. Бахрушина Н. О. Белявский, А. И. Ходенок участвовали в написании текста статьи. Е. О. Бахрушина, В. Н. Кузина, Н. Б. Демина занимались обработкой данных. А. И. Ходенок занималась созданием иллюстративного материала. Г. В. Раменская руководила работой. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Бахрушина Е. О., Белявский Н. О., Кузина В. Н., Ходенок А. И., Демина Н. Б., Раменская Г. В. Цеолиты и цеолитоподобные имидазольные каркасы в фармации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):193–221. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1920

© Бахрушина Е. О., Белявский Н. О., Кузина В. Н., Ходенок А. И., Демина Н. Б., Раменская Г. В., 2025
© Bakhrushina E. O., Belyavsky N. O., Kuzina V. N., Khodenok A. I., Demina N. B., Ramenskaya G. V., 2025

Zeolites and zeolite imidazole frameworks in pharmacy (review)

Elena O. Bakhrushina✉, Nikita O. Belyavsky, Vera N. Kuzina, Angelina I. Khodenok, Natalia B. Demina, Galina V. Ramenskaya

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:** Marina M. Shumkova. **E-mail:** bachrauschenh@mail.ru

ORCID: Elena O. Bakhrushina – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346;
Nikita O. Belyavsky – https://orcid.org/0009-0002-8522-2456;
Vera N. Kuzina – https://orcid.org/0000-0003-0236-8389;
Angelina I. Khodenok – https://orcid.org/0000-0001-8326-3292;
Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791;
Galina V. Ramenskaya – https://orcid.org/0000-0001-8779-3573.

Received: 30.08.2024 **Accepted:** 06.03.2025 **Published:** 07.03.2025

Abstract

Introduction. One example of new polymers for target delivery systems are zeolites (ZEO) and zeolite imidazole frameworks (ZIF). ZEO are actively used in industry, ecology, pharmacy and biomedicine, having high porosity, adsorption capacity and physico-chemical stability. ZIF, as a type of metal-organic framework, are characterized by high thermal and chemical resistance, biocompatibility and adjustable porosity, which makes them promising for drug delivery. Both polymers, due to their properties, open up new opportunities for the creation of targeted drugs with prolonged action and minimal side effects. The purpose of this review is to characterize ZEO and ZIF as promising polymers for targeted delivery systems and to consider their basic properties.

Text. The article discusses the structure and methods of analysis of zeolites and zeolite imidazole frameworks, methods of their synthesis, mechanism of action, and applications of polymers as directed delivery systems.

Conclusion. The review shows that the chemical and physical properties of ZEO and ZIF polymers make it possible to develop effective targeted drug delivery systems used in oncology, ophthalmology, dentistry and orthopedics. Low cytotoxicity, regulated polymer pore loading and the effectiveness of intracellular targeting confirm the prospects of using ZEO and ZIF in medicine.

Keywords: zeolites, zeolite imidazole frameworks, metal-organic frameworks, synthesis of zeolite, delivery systems, polymers

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

Contribution of the authors. Elena O. Bakhrushina, Nikita O. Belyavsky, Vera N. Kuzina, Natalia B. Demina developed the concept and research methodology. Nikita O. Belyavsky, Elena O. Bakhrushina, Vera N. Kuzina, were engaged in the collection and analysis of literature data. Elena O. Bakhrushina, Nikita O. Belyavsky, Angelina I. Khodenok participated in writing the text of the article. Elena O. Bakhrushina, Vera N. Kuzina, Natalia B. Demina were engaged in data processing. Angelina I. Khodenok was engaged in the creation of illustrative material. Galina V. Ramenskaya supervised the work. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Bakhrushina E. O., Belyavsky N. O., Kuzina V. N., Khodenok A. I., Demina N. B., Ramenskaya G. V. Zeolites and zeolite imidazole frameworks in pharmacy. *Drug development & registration*. 2025;14(1):193–221. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1920

ВВЕДЕНИЕ

Системы направленной доставки лекарств – современное решение для лечения целого ряда социально значимых заболеваний, подразумевающее направленную (таргетную) доставку активной молекулы в орган или ткань-мишень. Системы направленной доставки должны обладать высокой эффективностью и не уступающей ей безопасностью, в связи с чем первоочередной проблемой при их разработке является поиск «контейнера» – полимерной или иной системы, обеспечивающей направленную доставку лекарственного вещества и его контролируемое высвобождение в заданном дизайном эксперимента локусе. В качестве подобных систем с начала XX века рассматриваются дендримеры, фуллерены, липосомы, моноклональные тела, металлические наночастицы и др. Однако несмотря на разнообра-

зие рассматриваемых систем, необходимость в новых полимерах для доставки активных ингредиентов, подходящих по ряду жестких требований, остается очень высокой. На протяжении нескольких десятилетий неснижающийся интерес научного сообщества касается биополимеров, к которым относятся производные, извлекаемые как из сырья растительного и животного происхождения, так и из минерального происхождения. Примерами таких полимеров являются **цеолиты** (ZEO) и **цеолитоподобные имидазольные каркасы** (ZIF).

ZEO были впервые обнаружены в XVIII веке шведским минералогом А. Ф. Кренстедом, однако нашли свое применение только в начале XX века – в промышленности, охране окружающей среды, фармации и биомедицине. Сегодня используемые ZEO существуют как в виде природных минералов, так и в виде искусственно полученных материалов.

Основными элементами ZEO являются кислород, кремний и алюминий. Их структура состоит из трехмерного каркаса из силиката $[SiO_4]^{4-}$ и алюмината $[AlO_4]^{5-}$ – тетраэдров, соединенных общими атомами кислорода [1]. ZEO обладают высокой пористостью и адсорбционной способностью. Они характеризуются повышенной ионообменной способностью, физико-химической стабильностью, термостойкостью, гидротермальной стабильностью и биосовместимостью. Кроме того, ZEO обладают каналами и/или полостями, соединенными каналами, которые придают им уникальную структурную особенность по сравнению с другими алюмосиликатными и кристаллическими материалами.

ZIF, в свою очередь, представляют собой тип металлоорганического каркаса, который имеет нано-/микропористые структуры, состоящие из ионов металлов и органических звеньев [2]. По сравнению с другими металлоорганическими каркасами ZIF обладают более высокой термической, химической и водной стабильностью, биосовместимостью, способностью к биологическому разложению [3–4].

Металлоорганические каркасы считаются многообещающим классом материалов для доставки лекарств благодаря своей постоянной структуре, высокой площади поверхности и пористости, а также регулируемому размеру пор, что помогает загружать в них необходимое количество лекарственного компонента. Так, ZIF-8 стабилен в физиологических условиях и распадается в кислых средах, что может быть использовано для создания *pH-чувствительных* систем доставки лекарств. Высвобождение лекарственного компонента происходит при определенных pH или нагревании за счет разрыва слабой координационной связи.

Все вышеперечисленное делает ZEO и ZIF перспективным материалами для доставки лекарственных средств. Целенаправленная доставка к клеткам-мишеням лекарств позволяет уменьшить или полностью убрать побочные эффекты многих лекарственных средств, таких как противоопухолевые препараты, нестероидные противовоспалительные средства и др. Кроме этого, высвобождение лекарственных средств идет постепенно, что позволяет говорить о пролонгированном их действии.

Цель данного обзора – охарактеризовать ZEO и ZIF как перспективные полимеры для создания систем направленной доставки, рассмотреть их химические, физические и физико-химические свойства, провести обзор разработок таргетных препаратов на их основе.

Был проведен обзор статей, включающих в себя оригинальные научные исследования и литературные обзоры. В качестве источников информации использованы публикации из международной базы данных PubMed и российской научной электронной библиотеки «КиберЛенинка».

Поиск информации в базе данных PubMed осуществлялся с использованием ключевых слов: «drug delivery systems» and «zeolite» (413 результатов); «zeolite» and «pH sensitive» (368 результатов); «ZIF» (6,182 результата); «MOF» and «drug» (2,149 результатов).

В электронной библиотеке «КиберЛенинка» были использованы поисковые запросы: «цеолиты» и «синтез» (1000 результатов); «цеолиты» и «лекарства» (99 результатов); «цеолиты» и «терапия» (362 результата). В ходе анализа не было введено ограничений по показателям «дата публикации» и «бесплатный доступ к полному тексту публикации». Выбранные в качестве источников публикации относились к различным изданиям, вышедшим в период с 1926 по 2024 год.

ZEO: строение и методы анализа

ZEO – это пористые минеральные структуры природного (около 70 описанных структур из более 1000 месторождений) или синтетического происхождения (более 260 наименований) [5–7], поры и полости которых могут обмениваться водой, ионами и полярными молекулами с окружающей средой, придавая ZEO уникальные ионообменные свойства и абсорбционную способность [8].

Они обладают высокой химической, термической стабильностью и биосовместимостью. Благодаря данным свойствам ZEO нашли широкое применение в разнообразных отраслях, включая медицину и фармацию [9].

Химический состав ZEO в упрощенном виде может быть представлен формулой:

$$[Mx/n][(ALO_2)x\,(SiO_2)y]z\,H_2O,$$

где *M* – катионы с валентностью *n* (обычно это Na^+, K^+, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+}); *z* – число молекул адсорбированной воды, а отношение *y/x* может изменяться в широких пределах от 1 в случае низкокремнистых ZEO A и X до бесконечности, как это имеет место в случае кристаллических силикалитов [10].

Молекулярная структура ZEO состоит из структурных первичных тетраэдрических элементов [8], которые соединены при помощи общих атомов кислорода (рисунок 1).

ZEO являются кристаллогидратированными алюмосиликатами, характеризующимися трехмерным анионным каркасом, который образует соединения с щелочными и щелочноземельными металлами [11]. ZEO классифицируются на основе структуры их пор, размера пор и химического состава кремнезема и алюминия [12].

В зависимости от содержания в молекуле ZEO алюминия или кремния меняются ее свойства: так, если в молекуле больше соединений кремния, то она более химически и термически стабильна и обладает низкой полярностью, реагирует с катионами, обладающими низкой зарядовой плотностью (одновалентными катионами). С увеличением количества алюминия снижается химическая и термическая стабильность, повышается гидрофильность поверхности и соединение начинает реагировать с катионами с более высокой валентностью [9, 13].

Структурная комиссия Международной ассоциации цеолитов (IZA) классифицирует ZEO на основе соотношения Si : Al на ZEO с низким содержанием кремния (молярное соотношение Si : Al = 1 : 2; массовое соотношение $SiO_2 : Al_2O_3$ = 1,18 : 2,35), ZEO со средним содержанием кремния (молярное соотношение Si : Al = 3 : 10; массовое соотношение $SiO_2 : Al_2O_3$ = 3,53 : 11,76) и ZEO с высоким содержанием кремнезема (молярное соотношение Si : Al > 10; массовое соотношение $SiO_2 : Al_2O_3$ > 11,76). ZEO с низким молярным соотношением Si : Al являются гидрофильными, в то время как ZEO с высоким соотношением Si : Al являются гидрофобными [7, 14, 15].

Ионообменное взаимодействие предполагает, что сорбция ионов металлов из растворов с ZEO происходит посредством образования комплексов металлов с ОН-группами на поверхности ZEO (рисунок 2):

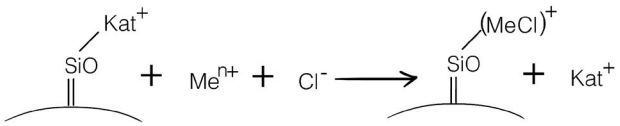


Рисунок 2. Реакция образования комплексов металлов на поверхности ZEO

Figure 2. Reaction of formation of metal complexes on the surface of ZEO

Также было установлено, что комплексы металлов с ZEO восстанавливаются водой, что свидетельствует о наличии слабых ван-дер-ваальсовых взаимодействий (межмолекулярных) между ионами металла и ZEO.

В анализе состава и структуры ZEO используют различные современные физико-химические методы: так, для исследования фазово-минерального состава ZEO используют рентгенофазовый анализ (РФА) [16], а для изучения структуры – инфракрасную спектроскопию (ИК) и масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS), рентгенофлуоресцентную спектроскопию, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) [17–18], электронно-парамагнитный резонанс (ЭПР) с помощью спин-зонда, с подтверждением просвечивающей электронной микроскопией (ПЭМ) [19–20], оптическую эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES) [21–23], рентгеновскую дифракцию (XRD) [24], сканирующую электронную микроскопию, энергодисперсионную спектроскопию для определения минералов в образце [25–26], рамановскую спектроскопию [25, 27].

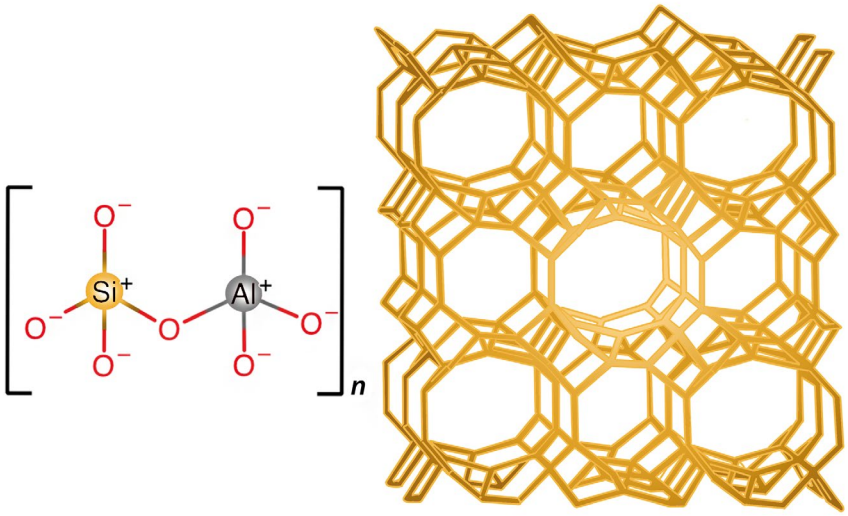


Рисунок 1. Строение ZEO

Figure 1. Structure ZEO

ZIF: строение и методы анализа

Металлоорганические каркасы представляют собой материалы координационного каркаса с пористой структурой, образующейся в результате координации ионов металлов или металлических кластеров и органических лигандов.

За счет своего строения они имеют следующие преимущества:

1. Точную пространственную структуру – их можно определить методами монокристаллической или поликристаллической дифракции благодаря высокосимметричной кристаллической решетке.
2. Высокую прочность и высокую удельную площадь поверхности (вплоть до 1000–10 000 м^2/г) [28].
3. Наличие в составе различных ионов металлов и органических лигандов; легко проектируемые структуры.
4. Наличие одинарной связи σ в структуре органического лиганда, что придает металлоорганическим каркасам определенную степень гибкости.
5. Способность к легкой модификации за счет модификации металлического центра и органических линкеров, что придает металлоорганическим каркасам различные свойства.

Цеолит-имидазольные каркасы (ZIF) – особый класс металлоорганических каркасов, они образуются путем самосборки структур M-IM-M, где M обозначает тетраэдрически скоординированные ионы металлов; эти ионы металлов включают кобальт (Co), медь (Cu) и цинк (Zn), в то время как IM представляет имидазольный лиганд [29]. Структура M-IM-M, ориентированная под углом 145°, играет решающую роль в создании топологии, подобной ZEO (рисунок 3) [30–31].

Наибольший интерес для ученых, изучающих использование данных полимеров в доставке лекарственных средств, представляет ZIF-8. Хотя структурно они имеют схожесть с ZEO, ZIF привлекают больше внимания научного сообщества из-за большей площади поверхности, постоянной пористости, различной топологии и высокой термостабильности.

ZIF-8 получают путем сополимеризации Zn с 2-метилимидазолом. Функциональной группой в линкере ZIF-8 является неполярная –CH_3-группа. ZIF с неполярными функциональными группами могут адсорбировать и удерживать неполярные молекулы, тогда как полярные функциональные группы обеспечивают специфическую сорбцию полярных молекул. Металлоорганические каркасы на основе цинка были выбраны как потенциальные наноносители лекарств, поскольку ионы цинка обладают низкой токсичностью [32].

Для анализа ZIF используются различные физико-химические методы: УФ-спектрофометрию, инфракрасная спектроскопия поглощения с преобразованием Фурье, рентгеновская дифракционная спектроскопия [33], ЯМР [34–39], термогравиметрический анализ [40], сканирующая электронная микроскопия (SEM) и просвечивающая электронная микроскопия (TEM) [33].

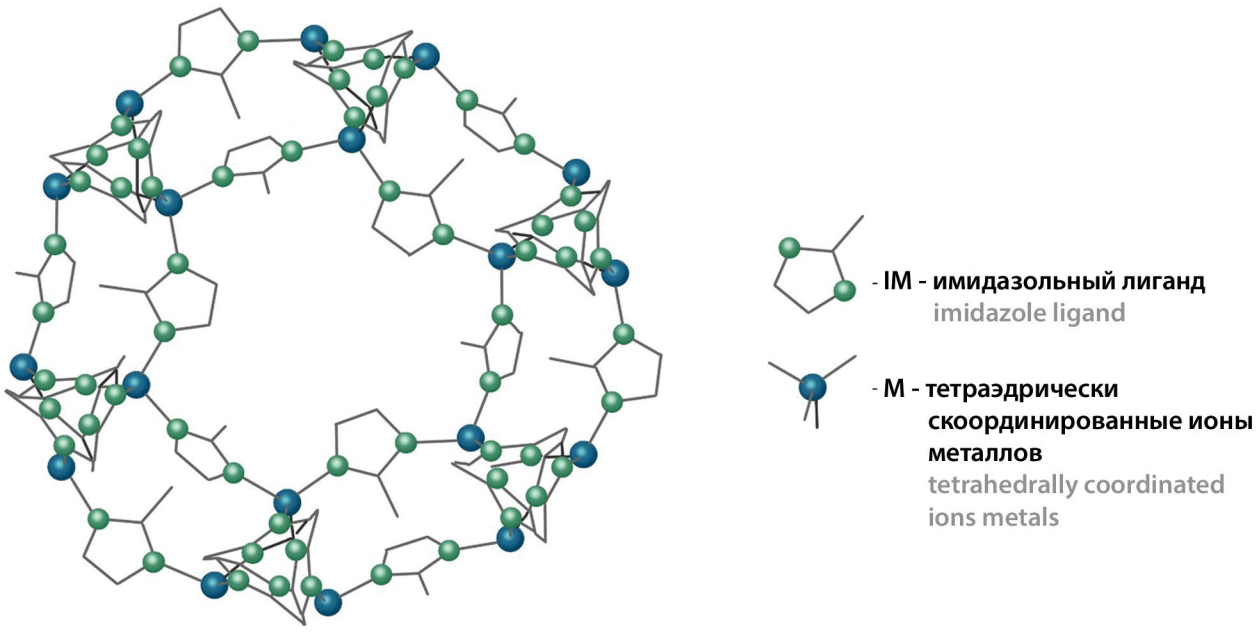


Рисунок 3. **Цеолит-имидазольные каркасы (ZIF-8)**

Figure 3. **Zeolit-imidazole frame (ZIF-8)**

Синтез ZEO и ZIF

При применении природных ZEO необходимо учитывать содержание в них различных минералов и примесей – многие из них необходимо если не убрать полностью, то привести их содержание к минимуму. К таким примесям можно отнести тяжелые металлы, которые могут оказывать нежелательные биологические эффекты при высоком содержании. Сопутствующие минералы также могут вызывать снижение эффекта и приводить к развитию побочного действия. Негативное влияние могут оказывать и биологические примеси, такие как плесень, бактерии и дрожжи.

При этом важно отметить, что в мировых нормативных базах недостаточно на сегодняшний день требований для стандартизации ZEO. В работе G. Cerri и др. проводили очистку клиноптилолита для соответствия требованиям японской, американской и европейской фармакопеям. ZEO и требуемые для них показатели качества не указаны в вышеупомянутых фармакопеях, поэтому исследования проводились в соответствии с техническими условиями на бентонит – полимер, схожий по структуре с цеолитами и используемый для их синтеза [41].

В течение последних десятилетий налажен синтез ZEO, обладающих заданными полезными свойствами и не содержащих большинства примесей. Однако некоторые природные ZEO не удается получать синтетически, вероятнее всего, это связано со сложностью воссоздания в лабораторных условиях природных процессов их получения.

Методы получения синтетических ZEO в основном повторяют природные геохимические процессы: очень часто это происходит в условиях гидротермальной кристаллизации в щелочной среде как в лабораторных, так и в промышленных масштабах. Были воссозданы отдельные природные ZEO и созданы абсолютно новые ZEO. Международная ассоциация цеолитов (IZA) присвоила трехбуквенные коды синтетическим цеолитовым каркасам [4–43].

Основное отличие синтеза ZEO от традиционного ковалентного синтеза заключается в том, что каркас ZEO формируется за счет слабых ионных, гидрофобных и водородных взаимодействий. Эти связи кинетически обратимы в отличие от сильных ковалентных [44–45]. Синтетические цеолиты имеют ряд преимуществ перед природными: возможность получения цеолита с заданными свойствами, с контролируемой морфологией под конкретное лекарственное средство [46] и получения продуктов с меньшим количеством примесей, таких как растворители, непрореагировавшие реагенты и продукты полусинтеза.

В синтезе ZEO можно выделить следующие этапы (рисунок 4):

1. *Приготовление смеси, содержащей все специфические компоненты*, соответствующие структуре каждого ZEO (это различные алюмосиликатные источники), что обеспечивает начальные процессы полимеризации.

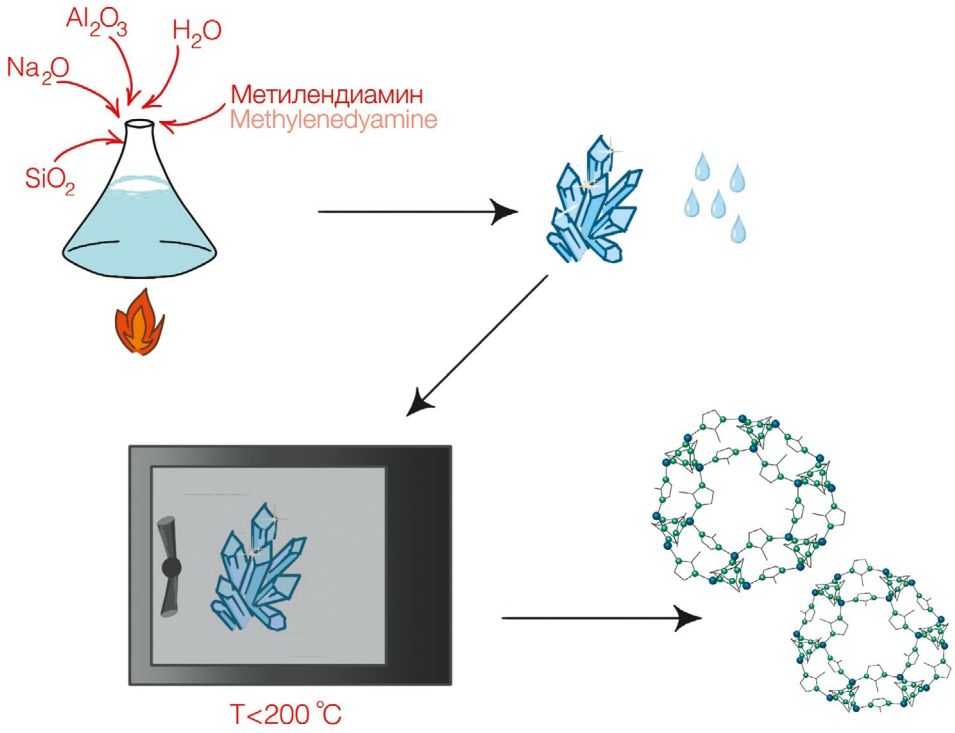


Рисунок 4. Синтез ZEO

Figure 4. Synthesis ZEO

Например, один из способов получения NaY включает приготовление водной смеси из оксидов натрия, кремнезема и алюминия, содержащей 1–5,0 М фенилендиамина, нагревание смеси до температуры кристаллизации, выдержку при этой температуре до получения кристаллов и отделение кристаллов от раствора. Мольные соотношения оксидов в смеси составляют: Na_2O/SiO_2 – 1,6 : 2,2; SiO_2/Al_2O_3 – 1,5 : 5; H_2O/Na_2O – 70 : 150 [47].

ZEO, предназначенные для использования в процессах адсорбции, имеют низкий модуль (мольное отношение Si : Al < 2,8) и делятся на типы A, X и Y (соответственно Si : Al ~ 1; 1,2; 2,4). Размер катиона, содержащегося в ZEO, определяет размер «входного окна» и влияет на область его применения [48–49].

Первые синтетические ZEO полностью изготавливались из неорганических материалов с использованием солей и гидроксидов различных щелочных и щелочноземельных металлов (Na, Ca, Sr, K, Ba). Новым подходом в синтезе ZEO явилось использование органических катионов, которые также называются темплатами или структурообразующими агентами. Первыми такими катионами были тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, тетрапропиламмоний. Позже специалисты Mobil Oil Company получили два новых коммерчески важных ZEO: ZEO-бета и ZSM-5, которые были получены с катионами тетраэтиламмония и тетрапропиламмония соответственно. И ZEO-бета, и ZSM-5 являются первыми синтетическими цеолитами, полученными с отношением Si/Al выше 5 [50].

Другим распространенным способом получения ZEO является их синтез из метакаолина, в котором соотношение Si : Al составляет 1 : 1, что отвечает силикатному модулю ZEO LTA. Для сокращения времени синтеза и уменьшения количества жидкой фаза используется механохимическая активация [51].

2. *Гидротермальная обработка* в автоклаве при определенной температуре и в течение определенного времени, чтобы обеспечить образование зародышей и рост кристаллов ZEO под действием минерализующих агентов и структурообразующего агента. Высокое перенасыщение смеси предшественников приводит к спонтанному зародышеобразованию и контролируемому процессу кристаллизации в низкотемпературных гидротермальных условиях (ниже 200 °C) [52].

Оптимизация различных параметров, таких как температурный режим, перемешивание и соотношение Si/Al, среди прочего позволяет синтезировать различные структуры ZEO [53–54].

3. *Промывание водой, очистка и высушивание*. К числу факторов, которые надо учитывать при синтезе ZEO, следует отнести химические и физические параметры. К химическим параметрам относят: состав исходной смеси (гель/суспензия), их мольные соотношения, тип растворителя, темплатов, добавок и наличие затравок. Среди физических условий, влияющих на процесс синтеза, выделяют: последовательность смешивания исходных соединений, старение, тип нагрева (обычный, микроволновый, ультразвуковой), время нагрева, статические/ротационные реакторы и скорости охлаждения, процесс кристаллизации ZEO [52].

Среди типов нагрева выделяют микроволновый, который имеет ряд преимуществ: быстрый и равномерный нагрев исходной системы, что приводит к ускорению зародышеобразования и образованию более мелких частиц с равномерным распределением размеров; сокращение времени синтеза; повышение выхода и чистоты продукта.

Альтернативой классической схеме синтеза ZEO может быть его получение в системах гидрогеля. Производство ZEO в гидрогелевых системах проходит следующим образом: зародыши ZEO образуются в твердой части системы, в то время как каркас ZEO распространяется в сетку геля до тех пор, пока кристаллиты не высвободятся из твердой матрицы и не начнут развиваться в маточном растворе. Таким образом, можно считать, что производство ZEO через систему гидрогеля происходит в три этапа:

1. Зарождение нуклеации на границе раздела «гель –жидкость».
2. Рост и высвобождение зачатков структур ZEO из матрицы геля.
3. Рост зачатков ZEO в маточном растворе до получения конечного, полностью кристаллического цеолитового продукта [55] (рисунок 5).

Диаметр конечных цеолитовых материалов можно регулировать путем тщательного и систематического контроля химического состава исходного геля, что способствует образованию твердых ZEO ультрамалых, нанометровых или микрометровых, размеров с равномерным распределением частиц по размерам. Для синтеза кристаллов ZEO применяют закрытые системы, в которых компоненты исходного геля взаимодействуют друг с другом так, что эта реакция в конечном итоге приводит к зародышеобразованию и дальнейшему росту кинетически наиболее выгодной фазы. Существует обратная зависимость между процессом зародышеобразования и размером кристаллов, так что увеличение количества зародышей приводит к уменьшению конечного размера кристаллитов [56].

При синтезе ZEO, используемых для доставки лекарственных веществ, очень часто поверхности ZEO модифицируют в зависимости от природы носимого вещества. Такие модификации осуществляют с использованием поверхностно-активных веществ (ПАВ). Пример такой модификации можно представить на примере адсорбции на клиноптилолите, модифицированном ПАВ, сульфаметоксазола и метронидазола. Эти вещества являются разными по полярности соединениями. Результаты показали, что

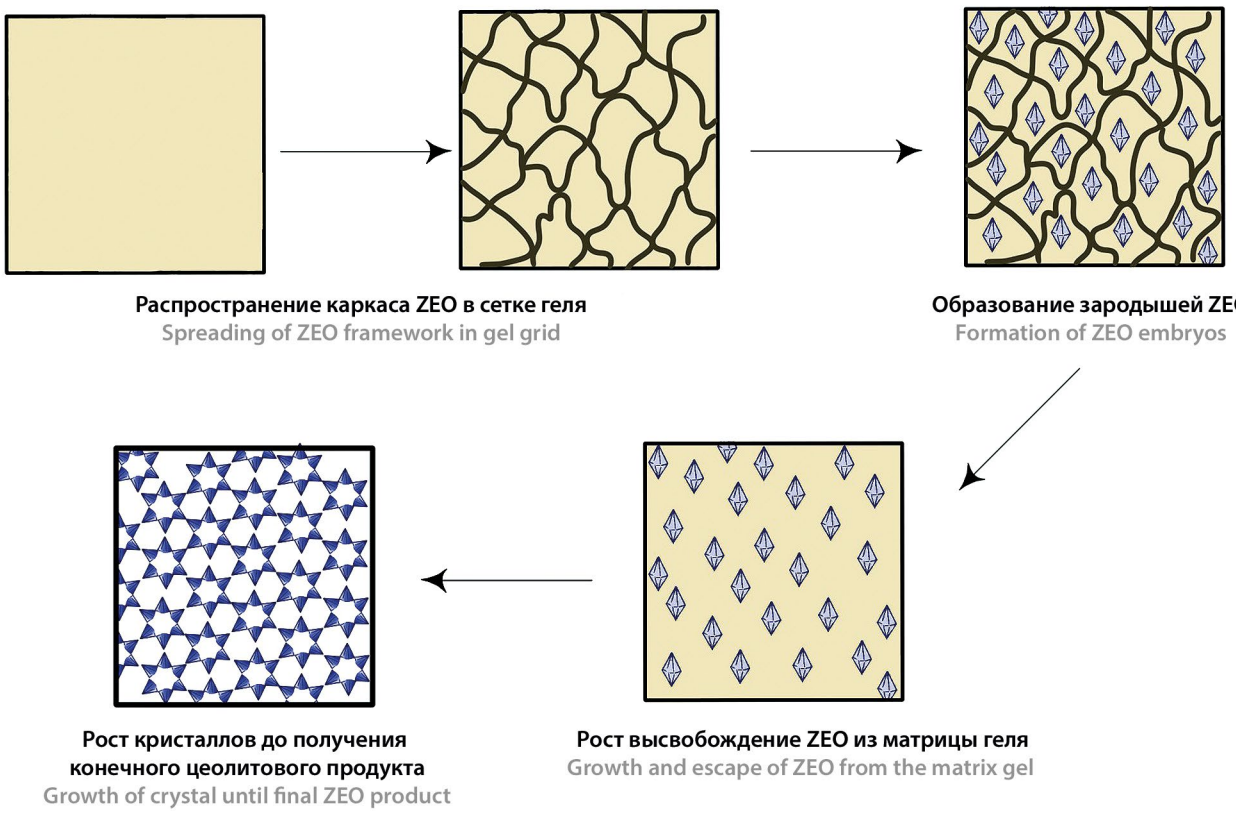


Рисунок 5. Производство ZEO через систему гидрогеля

Figure 5. Production ZEO through a hydrogel system

адсорбция сульфаметоксазола (менее полярного вещества) была усилена присутствием амфифильной молекулы. С другой стороны, поглощение метронидазола не зависело от присутствия поверхностно-активного вещества [57]. Следовательно, использование поверхностно-активного вещества также может влиять на природу взаимодействий лекарственного средства и ZEO, что может быть очень полезно для оптимизации процесса высвобождения лекарственного средства [58].

Синтез ZIF, которые представляют собой семейство микропористых металлоорганических каркасов, осуществляют сольвогидротермальным методом (рисунок 6), включая микроволновое нагревание, механохимическим, сонохимическим методами синтеза, золь-гель-синтезом, диффузионным методом и другими [59–60].

Было установлено, что, используя один и тот же метод, но изменяя параметры и условия, можно получить различные металлоорганические каркасы с различными морфологическими свойствами, различной формой и размером частиц и их распределением [72, 75]. Такими переменными являются: концентрация реагентов, порядок их добавления, концентрация растворителя, pH, перемешивание реакционной смеси во время реакции, добавление вспомогательных лигандов, время реакции [64–65, 67, 69, 75].

Механизм взаимодействия ZEO и ZIF

Механизм действия ZEO обусловлен их главной особенностью – наличием больших полостей и каналов, заполненных молекулами воды и ионами с большой подвижностью, что обеспечивает возможность ионного обмена, обратимой дегидратации и адсорбции. Поры и полости ZEO могут обмениваться водой, ионами и полярными молекулами с окружающей средой, придавая ZEO уникальные ионообменные свойства и абсорбционную способность [8]. Поглощение может происходить как на внешней, так и на внутренней поверхности материала и определяется способностью молекул проникать в микропоры [5].

К подвижным обменным ионам относятся катионы щелочных и щелочноземельных металлов (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} и Ba^{2+}), которые находятся в каналах. Ионы Si^{4+} и Al^{3+} являются тетраэдрическими (каркасными), в обычных условиях не обмениваются [76]. Но было установлено, что в кислой среде с увеличением времени контакта ZEO с раствором катиона металла происходит процесс частичного деалюминирования, без разрушения каркаса [77].

Механизм адсорбции ZIF недостаточно изучен, но многие ученые сходятся на том, что основными процессами являются образование водородных и координационных связей между линкерами, металлами

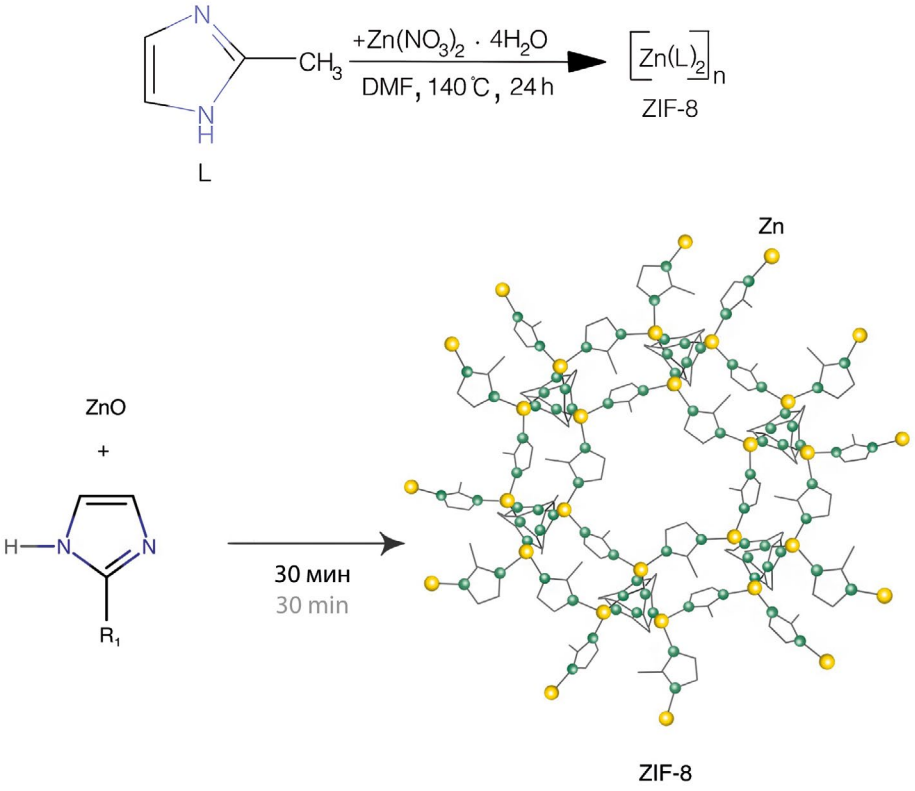


Рисунок 6. Процесс сольвотермического синтеза ZIF-8

Figure 6. Process of solvothermic synthesis ZIF-8

и сорбируемыми веществами. Также известны механизмы электростатического взаимодействия «сорбент – сорбат», ионообменное взаимодействие, комплексообразование с функциональными группами каркаса, кислотно-основное взаимодействие по Льюису. Наличие атомов азота в ароматическом ядре имидазолсодержащих органических линкеров в совокупности с другими отличительными чертами металлоорганических каркасов (высокая удельная поверхность, контролируемый в широком диапазоне размер пор) способствует хемосорбции на данных материалах [78].

В частности, известны механизмы электростатического взаимодействия «сорбент – сорбат» [79], образование водородных связей [30, 33], накопление на ZIF-8 в основном за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий [80], кислотно-основное взаимодействие по Льюису [81], комплексообразование с функциональными группами каркаса [82] и ионообменное взаимодействие [33, 81].

Наиболее широко описанные взаимодействия/механизмы собраны на рисунке 7.

Местами взаимодействия могут быть как металл, так и кластеры, а также линкеры. Функционализация линкеров с такими группами, как гидроксильные, тиоловые или амидные, является хорошо изученной и последовательной стратегией для повышения адсорбционной способности и/или селективности [81].

Для металлоорганических каркасов характерен феномен «дыхания», который представляет собой явление структурного перехода при воздействии внешних раздражителей. Благодаря гибкости этих молекул в кислой среде они открывают выход для адсорбированных веществ, которые ранее были захвачены координационным полимером [83]. Этот феномен важен для доставки лекарств, поскольку обеспечивает адсорбцию и диффузию крупных молекул. Изгиб каркаса ZIF-8 при «дыхании» – это процесс, при котором движение/скручивание имидазольных линкеров в сети обеспечивает большее открытие кристаллических окон пор, вызывая расширение или сужение пор, непосредственно влияя на адсорбированную нагрузку и диффузию молекул [34].

ZIF особенно привлекли внимание как pH-чувствительные носители лекарственных средств из-за их высокой способности загружать лекарственные средства и биоразлагаемости [84]. Хотя ZIF остаются стабильными в воде и водном растворе NaOH, их каркас быстро распадается в кислых растворах [85–86]. Это указывает на то, что чувствительность ZIF к pH может помочь в разработке систем доставки лекарств на основе ZIF [85].

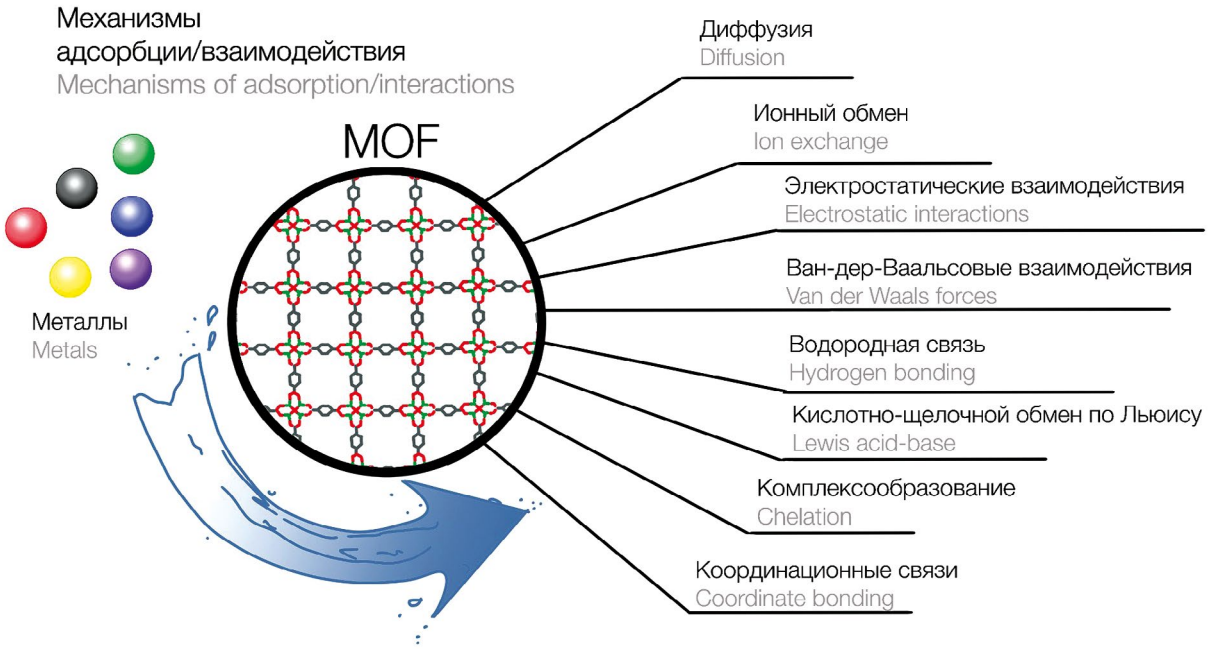


Рисунок 7. Механизмы адсорбции металлоорганических каркасов (МОК)

Figure 7. Adsorption mechanisms of metal-organic frames (MOF)

Модульная технология, используемая при синтезе металлоорганических каркасов, позволяет точно регулировать их физические характеристики и химические свойства [87]. ZIF-8 действует как защитный барьер для ферментов, белков и лекарств от деградации, вызванной температурой, растворителями и протеолитическими агентами [88]. Их пористая структура и способность регулировать размер и форму пор делают металлоорганические каркасы идеальными носителями для лекарств. Следовательно, их использование рассматривается как перспективный вариант создания систем доставки лекарств [89–90].

ZEO и ZIF как ионообменные материалы

ZEO и ZIF являются представителями ионообменных материалов. В основе ионообменного процесса на ZEO важную роль играют следующие свойства ZEO и металла: отрицательный заряд каркаса ZEO и малые по размеру положительно заряженные катионы, которые обладают хорошей подвижностью в гидратированном состоянии. В связи с тем, что внекаркасные катионы металлов в катионных формах ZEO относительно слабо связаны с цеолитным каркасом, они часто легко обмениваются в водных растворах на другие типы металлов [10].

Исходя из этих свойств, можно сделать заключение, что компенсирующие заряд противоионы могут замещаться на протоны или другие катионы (рисунок 8).

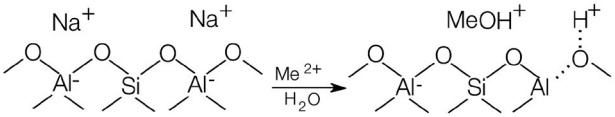


Рисунок 8. Реакция обмена катионов металлов в катионных формах ZEO в водных растворах

Figure 8. The exchange reaction of metal cations of ZEO in cationic forms in aqueous solutions

Отрицательный заряд поверхности ZEO способствует адсорбции полярных заряженных частиц [91].

Очень важным фактором при исследовании механизма взаимодействия ZEO с раствором, содержащим ионы металлов, является изменение водородного показателя исходного раствора при статической сорбции. Так, например, при контакте сточной воды с ZEO происходит повышение pH с 3,5 до 5,5. Так как изменение pH воды связано с изменением соотношения ионов OH^- и H^+, то можно предположить, что в основе механизма сорбции лежит процесс хемосорбции. Сдвиг водородного показателя в большую сторону свидетельствует о количественном увеличении ионов OH^-.

Сила адсорбции иона металла зависит как от радиуса атома, так и от заряда иона. Чем больше радиус атома при одинаковых зарядах, тем лучше адсорбируется катион, и чем больше заряд иона, тем сильнее ион притягивается к отрицательно заряженной поверхности [77].

В механизме взаимодействия катионов металлов с ZEO, кроме ионообменного механизма, нельзя исключать и образование прочных химических связей по донорно-акцепторному механизму. При данном механизме донорами будут выступать ZEO с атомами кислорода, которые имеют неподеленную электронную пару, а акцепторами являются свободные d-орбитали металлов, катионы которых сорбируются [92].

Провести границу между физической и химической адсорбцией практически невозможно. Как правило, физическая адсорбция предшествует химической. Оба эти процесса представлены комплексом сложных взаимодействий раствора, сорбента и сорбируемого металла [77].

Ионообменный механизм не является основным для ZIF. Во многих случаях за высокую адсорбционную способность металлоорганических каркасов отвечает более одного механизма, которые были рассмотрены выше. Наиболее выражен данный механизм в адсорбции ими тяжелых металлов [93].

ZEO и ZIF как системы направленной доставки

ZEO и ZIF благодаря своей пористой структуре и настраиваемым свойствам, которые могут быть модифицированы различными материалами, могут использоваться в качестве систем доставки. Их пористая структура позволяет загружать и выгружать различные молекулы, такие как терапевтические агенты, фотосенсибилизаторы, биологические макромолекулы, контрастные вещества для МРТ, радиофармацевтические препараты, флуорофоры ближнего инфракрасного диапазона и микропузырьки [6]. Данные средства доставки позволят повысить специфичность и эффективность лекарственных средств и в то же время могут снизить побочное действие лекарств на здоровые клетки и ткани организма [94].

Благодаря пористой природе и присущим ZEO и ZIF свойствам, чувствительным к pH, соединения могут захватывать различные лекарственные средства, к примеру противоопухолевые, а также препараты, применяемые в стоматологии [95–96], антибактериальные средства [97–99], и избирательно высвобождать их в месте доставки.

К основным преимуществам этих материалов относятся: низкая цитотоксичность, которая может ограничивать нежелательное воздействие на нормальные клетки/ткани [100]; регулируемая, высокая «грузоподъемность», что благоприятствует увеличению загрузки пор ZEO; улучшенная специфичность и эффективность внутриклеточного нацеливания, что благоприятствует применению их для доставки лекарств [56].

Ниже будут рассмотрены примеры использования ZEO и ZIF как систем доставки лекарственных средств.

Доставка противоопухолевых препаратов

Несмотря на достигнутые успехи в лечении опухолей, традиционные способы доставки лекарственных средств по-прежнему сталкиваются с недостатками, которые связаны с низкой специфичностью и высокой токсичностью в отношении здоровых тканей [101–102].

ZEO и ZIF широко используются в качестве средств доставки лекарственных средств для повышения специфичности и эффективности традиционных лекарственных средств.

Они изучаются как наноплатформы, несущие лекарственные средства, чувствительные к pH. Так, они способны захватывать противоопухолевые препараты и высвобождать их в кислое окружение опухоли. В литературе известно значительное количество статей, освещающих использование ZEO/ZIF в качестве систем доставки лекарств, таких как доксорубицин, 5-фторурацил, куркумин, цисплатин [103-131].

Наночастицы цеолитов и цеолитоподобных комплексов в последние годы все чаще применяются в персонализированой терапии (тераностике), включающей лечение и диагностику опухолей, благодаря своей эффективности в инкапсуляции как визуализирующих агентов, так и терапевтических препаратов [108]. Для большей эффективности системы доставки на основе ZEO и ZIF подвергаются различного рода модификациям. В литературе описаны модификации ZIF-8 с помощью оксида марганца [104], сульфида меди, висмута и редкоземельных элементов [106], серицина шелка [107], полупроводникового фотокаталитического агента, который индуцирует локальный градиент pH в ответ на внешнее электромагнитное излучение [105], и др.

Для модификации цеолитов и цеолитоподобных каркасов могут быть использованы также белки и биополимеры [120].

Исходя из материалов проанализированных публикаций, можно выделить факторы, которые повышают специфичность терапевтической платформы на основе ZIF-8. К таким факторам относятся:

- ✓ воздействие лазера ближнего инфракрасного диапазона и кислой среды, что увеличило скорость высвобождения терапевтического агента (доксорубицина) с 21 до 78 % [85];
- ✓ ИК-лазерные воздействия при изменении pH и при ультразвуковой стимуляции, что позволило повысить терапевтическую эффективность в глубоких участках опухолей [113];
- ✓ размер металлоорганических каркасов [114–116].

ZEO в доставке лекарственных средств для наружного и внутреннего применения

Цеолитоподобные комплексы, как и другие неорганические алюмосиликаты, успешно применяются наружно, при лечении заболеваний, требующих реализации локального антибактериального эффекта,

например акне, ожогов, различных раневых поверхностей [132]. Усиление фармакологического эффекта наступает не только из-за возможностей загрузки и модифицированного высвобождения активного ингредиента из системы доставки, как было описано ранее, но и из-за собственных антибактериальных свойств цеолитоподобных комплексов и ионов, их модифицирующих. Так, ZEO, модифицированный цинка оксидом, в процессе своего нахождения *in vivo* выделял катионы цинка, которые могут действовать как адъювант при заживлении ран и оказывать антимикробное действие [121, 132].

Существует множество исследований, посвященных пероральному применению цеолитоподобных комплексов [140–163]. Во многих исследованиях ученым удавалось достигать высвобождения нулевого порядка (контролируемое высвобождение) для ряда активных соединений из комплексов ZEO [140–143]. Также за счет использования ZEO удается увеличивать биодоступность – в работах [144–145] описано улучшение растворимости нифедипина и индометацина.

pH-зависимое высвобождение, обеспечиваемое ZEO/ZIF, может быть востребовано при разработке кишечнорастворимых препаратов. Так, в работе [147] экстракт акации катеху в системе доставки на основе клиноптилолита инкапсулировался в кислой среде желудка, что позволяло ему модифицированно высвобождаться в кишечнике. Целый ряд исследований посвящен пероральной доставке в комплексах ZEO нестероидных противовоспалительных средств [148–150, 154, 156–159]. Исследования растворения *in vitro* показали, что высвобождение этих препаратов в цеолитных комплексах также зависит от pH: продемонстрировано иминимальное высвобождение лекарства в желудке по сравнению с кишечником.

Необходимо также отметить, что в отличие от многих других систем направленной доставки ZEO характеризуются высокой степенью загрузки лекарственного средства. В исследованиях [110, 149] загрузка систем доставки на их основе достигала 90–96 %, при этом высвобождение оставалось длительным. Так, в исследовании [149] высвобождение доксирубицина из наночастиц-эллипсоидов на основе ZEO и хитозана за 20 часов составляло менее 50 %.

Доставка лекарств в костной пластике

ZIF-8 использовался для получения биосовместимого материала для имплантации, который позволяет высвобождать лекарство от остеопороза – ризедронат. Слой ZIF-8 и лекарственное средство равномерно распределяли по поверхности титанового сплава. Препарат высвобождался небольшими дозами в течение 16 часов. Таким образом возможно изготовление титанового имплантата, покрытого биосовместимым слоем каркаса из ZIF-8, который способствует остеоинтеграции на границе раздела «кость – имплантат». ZIF-8 на поверхности титанового сплава высвобождает лекарство под воздействием жидкостей организма непосредственно в очаге заболевания [160].

Инфекция, связанная с костным имплантатом, является одной из основных проблем в ортопедии и может даже привести к отторжению имплантата. Для решения данной проблемы синтезировали наночастицы ZIF-8 с левофлоксацином, которые далее были нанесены на модифицированные коллагеном подложки методом катодного электрофореза. Для уменьшения гидролиза, для замедленного высвобождения левофлоксацина и Zn^{2+}, на модифицированные подложки нанесли многослойные слои желатина и хитозана, образующие хелатирующий эффект. Изготовленные образцы способствовали адгезии, пролиферации и дифференцировке остеобластов *in vitro*. Более того, образцы продемонстрировали сильную антибактериальную активность против *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* за счет гидролиза наночастиц ZIF-8, тем самым создавая минимально щелочную микросреду [161].

Вопрос создания каркаса с подходящими механическими и биологическими свойствами, эффективным формированием кости в области дефекта и устойчивостью к антибактериальным препаратам остается актуальным в наше время. На основе ZSM-5 было разработано новое альгинатное покрытие с ванкомицином. Важность альгинатного покрытия для микроструктуры, механических и клеточных свойств каркаса ZSM-5 было доказано тем, что наблюдалось трехкратное увеличение прочности при сжатии каркасов с покрытием по сравнению с каркасами без покрытия ZSM-5. Антибиотик ванкомицин проявил антибактериальную активность в отношении золотистого стафилококка (*S. aureus*) [162].

Применение в стоматологии

ZEO и ZIF используются также в различных областях стоматологии, таких как восстановительная стоматология, эндодонтия, протезирование зубов, имплантология, пародонтология, ортодонтия и хирургия полости рта.

В своем составе ZEO могут содержать металлы в разных формах (серебро, цинк, кальций) и за счет высвобождения этих металлов оказывать антибактериальное и противовоспалительное действие. Серебро может присутствовать в различных формах, это могут быть ионы серебра, заряженные кластеры серебра и наноионы металлического серебра [163].

Цинковые ZEO включают цинккатионные ZEO и цинкоксидные ZEO. Антибактериальные свойства таких ZEO обусловлены высвобождением ионов цинка [164]. Образование активных форм кислорода, включая перекись водорода, гидроксильные радикалы и супероксидные ионы [165], также способствует усилению антибактериальных свойств цинковых цеолитов.

ZEO кальция имеет стабильный размер частиц и форму молекулярного сита и стабильно выделяет ионы кальция. В полости рта ZEO кальция может доставлять ионы кальция к поверхности зуба, восстанавливать гидроксиапатитовую структуру дентина и эмали и заполнять промежутки, где происходит деминерализация твердых тканей из-за кислоты, вырабатываемой бактериями, демонстрируя таким образом потенциал реминерализации [166].

Ким и его коллеги использовали цеолит в качестве носителя хлоргексидина, который вводили в коммерческий стоматологический стеклоиономерный цемент. Таким образом были улучшены антимикробные свойства цемента [167]. Sinanen Zeomic, коммерциализированный в 1984 году как Zeomic®, представляет собой цеолитовый материал, легированный серебром и, согласно коммерческим спецификациям, способный выделять катионы Ag^+. Этот противомикробный коммерческий агент использовался в некоторых исследованиях в стоматологии [168].

ZEO, наполненный катионами Ag^+, является хорошей добавкой к минеральному триоксидному агрегату (MTA) [169], являющемуся цементом. Было установлено, что MTA, легированный Ag/ZEO, обладает более высокой антимикробной активностью, чем MTA, обработанный хлоргексидином [170].

Включению ZEO в титановые сплавы, которые широко используются в стоматологических и ортопедических имплантатах, посвящен ряд работ [171–172]. Также известны исследования, в которых используется ZIF, который сохраняет способность к остеоинтеграции, описанной для цеолитовых покрытий [171], а высвобождение катионов Zn^{2+} придает титановому сплаву антимикробные свойства [173].

Токсичность

Исходя из всех положительных свойств ZEO, можно отметить, что обладают большим потенциалом для фармацевтического применения [5, 174–177]. При разработке новых материалов для создания новых лекарственных средств основным из параметров является цитотоксичность. Некоторые ZEO обладают нежелательной цитотоксичностью, но в некоторых случаях эта цитотоксичность может быть полезной для лечения опухолей (антипролиферативный и проапоптотический эффекты) [175], то есть, как и ряд других параметров, возможная цитотоксичность цеолита должна изучаться в каждом конкретном случае [5].

Следует отметить, что несколько природных видов ZEO обладают цитотоксическим действием, которое оказывает пагубное влияние на человеческий организм [5, 175]. Одним из самых известных токсичных цеолитов является эрионит, разновидность природного волокнистого цеолита, который вызывает рак легких и злокачественную мезотелиому [18, 24–25, 178–180].

Эрионит в 1987 году был внесен в список канцерогенов класса 1 Международным агентством по исследованию рака [19, 181]. В настоящее время он классифицирован как наиболее канцерогенный минерал [19] с возможной генетической передачей восприимчивости к эриониту аутосомно-доминантным способом [178, 181]. Эрионит образует хрупкие, похожие на шерсть, волокнистые массы в полостях горных пород и проявляет свойства, сходные со свойствами асбеста, при развитии злокачественной мезотелиомы у людей [25, 175, 178, 183]. Кроме того, известно, что вдыхание эрионита вызывает и неонкологические заболевания, такие как фиброз плевры и стимулирование выработки аутоантител [184].

На основе воздействия минеральных волокон на биологические системы несколько авторов объясняют токсичность волокон синергетическим эффектом многочисленных факторов, таких как размер волокон, форма кристаллов, реакционная способность поверхности, способность генерировать активные формы кислорода (АФК), биологическая стойкость и химический состав, площадь поверхности, способность к взаимодействию, структура, суммарный заряд, дзета-потенциал и микротопография [19, 25].

Наибольший интерес ученых вызвало изучение токсического действия эрионита на клеточные мембраны. В частности, в модели проверки токсичности эрионита и офретита были использованы клеточные линии моноцитов человека U937. По данным исследованиям было установлено, что волокна эрионита быстро внедрялись в мембрану, главным образом в виде агрегатов, и были обнаружены и в цитозоле, и в ядре [19]. Эрионит классифицируют по преобладанию в нем катионов калия, натрия и кальция [21, 185–186]. В результате исследования было установлено, что волокна, богатые натрием и калием, уже через 24 часа, а богатые кальцием – чуть позже индуцировали некроз клеток. Токсическое действие волокнистых цеолитов связано с морфологией волокон, химическим распределением участков, структурными вариациями и образованием агрегатов [19].

Кроме вышесказанного, в механизме токсичности эрионита значительную роль играет его способность к сегрегации с Fe (II) и Fe (III) и его связью с железом в природных месторождениях [21, 184, 187]. Для Fe (II) и Fe (III) были предложены различные пути поглощения Fe волокнами эрионита, при этом предполагается, что первый является преимущественно ионообменным, а второй в основном закреплен на поверхности [21]. Одна из теорий токсического действия эрионита связана со способностью накапливать железо на поверхности, что вызывает образование цитотоксичных гидроксильных радикалов [188–189]. Но, с другой стороны, также есть исследования, где показано, что волокна эрионита на самом деле могут не содержать структурного Fe^{3+}, но содержать Fe^{3+}, связанные с примесями, богатыми железом [190].

Кроме эрионита, другими подтипами волокнистых цеолитов, которые могут пагубно влиять на человеческий организм, вызывая изменения в клеточной структуре и в функциях митохондрий, являются сколецит (менее токсичный) и офретит [19].

Несмотря на достижения в методах изготовления, функционализации и биомедицинском применении цеолитных наночастиц, механизм их токсичности по-прежнему остается расплывчатым.

Некоторые исследователи выразили обеспокоенность по поводу цитотоксического воздействия цеолитных наночастиц на множество еще недостаточно изученных клеточных линий.

На токсичность цеолитов сильное влияние оказывают размер, форма и состав цеолитных частиц. Так, микроразмерные цеолиты Linde типа L (LTL) и Linde типа A (LTA) проявляют минимальную цитотоксичность, но с изменением формы кристаллов и глиноземистого компонента изменяются токсические эффекты цеолитов. Наноразмерные LTL и LTA из чистого кремнезема со сферической морфологией нетоксичны, в то время как LTL и LTA кубической формы, содержащие оксид алюминия, токсичны [100, 191]. В то же время не установлено влияние различий в поверхностном заряде наноцеолитов на их токсичность [100].

Сообщалось, что функционализация цеолитов может демонстрировать различные уровни цитотоксичности в зависимости от присутствия алюминия, а аминная модификация цеолитов может значительно повысить их цитотоксичность [192].

С внедрением методов синтеза озабоченность по поводу цитотоксичности сместилась в сторону наноразмерных материалов. Было продемонстрировано, что ZEO микромасштабов безопасны и нетоксичны, в то время как наночастицы ZEO еще не были полностью изучены на предмет их цитотоксичности [193].

Клиноптилолит – природный ZEO, который не проявляет токсического действия и может применяться в терапевтических целях. Данный цеолит не обладает токсичностью, но отдельные авторы выделяют побочные эффекты клиноптилолита. В частности, он снижал жизнеспособность клеток и синтез ДНК и усиливал клеточный апоптоз на моделях *in vitro* [194]. Клиноптилолит снижает функциональность ключевых белков, участвующих в выживании клеток и апоптозе в линиях опухолевых клеток. Это действие на линии опухолевых клеток объясняется абсорбционной и ионообменной способностью клиноптилолита, которая может изменять концентрацию ионов кальция и влиять на Ca-зависимые молекулярные сигналы [175].

Низкой цитотоксичностью обладают и другие ZEO, например наночастицы цеолита Y для цисплатина [195], цеолиты LTL и EMT (сверхмалых размеров 8–18 нм) [196], ZSM-5, цеолит A и фожазит NaX [197].

При рассмотрении ZEO для применения в биомедицине важно дифференцировать определенные типы цеолитов с известными токсическими и канцерогенными эффектами от других типов цеолитов (например, клиноптилолита) с терапевтическими, противовоспалительными, антипролиферативными и проапоптотическими свойствами [94].

В СССР, а затем и в Российской Федерации накоплен достаточный клинический опыт перорального применения ZEO в качестве энтеросорбентов [197]. Сегодня в мире известен ряд биологически активных добавок и пищевых добавок, основанных на ZEO. Производителями они позиционируются как полностью безопасные, не накапливающиеся в организме [198]. В разные годы были проведены доклинические и клинические исследования для природного ZEO Холинского месторождения, доказывающие отсутствие его канцерогенности, острой и хронической токсичности, а также энтеросорбирующее и адаптогенное действие. При этом авторы отмечают, что эти сведения по безопасности не могут быть применены к другим цеолитам, для которых вопросы эффективности и безопасности необходимо изучать в дальнейшем [199].

По данным Clinical Trails, в 2015–2020 годах в Европейском союзе проводились три клинических исследования для перорального натурального PMA-цеолита клиноптилолита (Panaceo International GmbH, Австрия). Согласно опубликованным в 2022 году результатам исследований, PMA-цеолит не повышал уровни металлических частиц в крови, что подтверждает стабильность материала в кишечнике при пероральном приеме. Особенно это актуально для свинца или алюминия, которые входят в структуру природного клиноптилолита, и их экстракция из материала в кровь испытуемых не была обнаружена. Результаты долгосрочных исследований, проводившихся в течение четырех лет, наряду с данными об общей безопасности клиноптилолитовых материалов, таких как PMA-цеолит, могут быть использованы для изучения возможности применения этих природных материалов в качестве перспективных будущих микро- или наноантиоксидантных устройств для защиты организма от токсичности, вызванной загрязнителями окружающей среды [200].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре был продемонстрирован потенциал полимеров ZEO и ZIF в качестве перспективных материалов для создания систем направленной доставки лекарственных средств. Их химические, физические и физико-химические свойства позволяют использовать полимеры в разработке высокоэффективных таргетных препаратов в различных областях медицины: онкологии, офтальмологии, стоматологии, ортопедии и др. Преимущественные свойства материалов, такие как низкая цитотоксичность, величина и регулируемость загрузки пор ZEO, специфичность и эффективность внутриклеточного таргетирования, свидетельствуют о потенциале применения ZEO и ZIF в направленной доставке лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moshoeshoe M., Nadiye-Tabbiruka M. S., Obuseng V. A. Review of the Chemistry, Structure, Properties and Applications of Zeolites. *American Journal of Materials Science*. 2017;7:196–221.
2. Furukawa H., Cordova K. E., O'Keeffe M., Yaghi O. M. The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks. *Science*. 2013;341(6149):1230444. DOI: 10.1126/science.1230444.
3. Tanaka S., Tanaka Y. A. Simple Step toward Enhancing Hydrothermal Stability of ZIF-8. *ACS Omega*. 2019;4(22):19905–19912. DOI: 10.1021/acsomega.9b02812.
4. Kermanian M., Nadri S., Mohammadi P., Iravani S., Ahmadi N., Alinezhad V., Shokrgozar M.-A., Haddad M., Mostafavi E., Maleki A. Zeolitic imidazolate frameworks: From bactericidal properties to tissue regeneration. *Journal of Controlled Release*. 2023;359:326–346. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.06.002.
5. Bacakova L., Vandrovcova M., Kopova I., Jirka I. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. *Biomaterials science*. 2018;6(5)974–989.
6. Yazdi M. K., Zarrintaj P., Hosseiniamoli H., Mashhadzadeh A. H., Saeb M. R., Ramsey J. D., Ganjali M. R., Mozafari M. Zeolites for theranostic applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(28):5992–6012. DOI: 10.1039/d0tb00719f.
7. Cadar O., Senila M., Hoaghia M.-A., Scurtu D., Miu I., Levei E. A. Effects of Thermal Treatment on Natural Clinoptilolite-Rich Zeolite Behavior in Simulated Biological Fluids. *Molecules*. 2020;25(11):2570. DOI: 10.3390/molecules25112570.
8. Mastinu A., Kumar A., Maccarinelli G., Bonini S. A., Premoli M., Aria F., Gianoncelli A., Memo M. Zeolite clinoptilolite: Therapeutic virtues of an ancient mineral. *Molecules*. 2019;24(8)1517. DOI: 10.3390/molecules24081517.
9. Li L. J., Chu C.-H., Yu O. Y. Application of Zeolites and Zeolitic Imidazolate Frameworks in Dentistry – A Narrative Review. *Nanomaterials*. 2023;13(22):2973. DOI: 10.3390/nano13222973.
10. Серых А. И. Формирование, природа и физико-химические свойства катионных центров в каталитических системах на основе высококремнеземных цеолитов. Дис. ... д. хим. н. Москва; 2014. 47 с. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/formirovanie-priroda-i-fiziko-khimicheskie-svoistva-kationnykh-tsentrov-v-kataliticheskikh-s. Ссылка активна на 30.08.2024.
11. Noviello M., Gattullo C. E., Faccia M., Paradiso V. M., Gambacorta G. Application of natural and synthetic zeolites in the oenological field. *Food Research International*. 2021;150:110737.
12. Pérez-Botella E., Valencia S., Rey F. Zeolites in Adsorption Processes: State of the Art and Future Prospects. *Chemical Reviews*. 2022;122(24):17647–17695. DOI: 10.1021/acs.chemrev.2c00140.
13. Wan Y., Xu W., Ren X., Wang Y., Dong B., Wang L. Microporous frameworks as promising platforms for antibacterial strategies against oral diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:628. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00628.
14. Cheong Y.-W., Wong K.-L., Ooi B. S., Ling T. C., Khoerunnisa F., Ng E.-P. Effects of synthesis parameters on crystallization behavior of K-MER zeolite and its morphological properties on catalytic cyanoethylation reaction. *Crystals*. 2020;10(2):64. DOI: 10.3390/cryst10020064.
15. Jiang N., Shang R., Heijman S. G. J., Rietveld L. C. High-silica zeolites for adsorption of organic micro-pollutants in water treatment: A review. *Water Research*. 2018;144:145–161. DOI: 10.1016/j.watres.2018.07.017.
16. Абдулмалек К. Х., Морозова Н. Н., Муртазин Н. Ф. Исследование фазово-минерального состава цеолитовых пород методом рентгенофазового анализа. *Известия Казанского государственного архитектурно-строительного университета*. 2019;2(48):219–228.
17. Кульпина Ю. Н., Прокофьев В. Ю., Гордина Н. Е., Хмылова О. Е., Петухова Н. В., Газахова С. И. Использование ИК-спектроскопии для изучения структуры низкомодульных цеолитов. *Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология*. 2017;60(5):44–50.
18. Patel J. P., Brook M. S., Kah M., Hamilton A. Global geological occurrence and character of the carcinogenic zeolite mineral, erionite: A review. *Frontiers in Chemistry*. 2022;10:1066565. DOI: 10.3389/fchem.2022.1066565.
19. Cangiotti M., Salucci S., Battistelli M., Falcieri E., Mattioli M., Giordani M., Ottaviani M. F. EPR, TEM and cell viability study of asbestiform zeolite fibers in cell media. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018;161:147–155. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.10.045.
20. Cangiotti M., Battistelli M., Salucci S., Falcieri E., Mattioli M., Giordani M., Ottaviani M. F. Electron paramagnetic resonance and transmission electron microscopy study of the interactions between asbestiform zeolite fibers and model membranes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2017;80(3):171–187. DOI: 10.1080/15287394.2016.1275901.
21. Ballirano P., Pacella A., Cremisini C., Nardi E., Fantauzzi M., Atzei D., Rossi A., Cametti G. Fe (II) segregation at a specific crystallographic site of fibrous erionite: A first step toward the understanding of the mechanisms inducing its carcinogenicity. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2015;211:49–63.
22. Bloise A., Barca D., Gualtieri A. F., Pollastri S., Belluso E. Trace elements in hazardous mineral fibres. *Environmental Pollution*. 2016;216:314–323. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.06.007.
23. Elizalde-González M. P., Mattusch J., Wennrich R., Morgenstern P. Uptake of arsenite and arsenate by clinoptilolite-rich tuffs. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2001;46(2–3):277–286.
24. Beaucham C., King B., Feldmann K., Harper M., Dozier A. Assessing occupational erionite and respirable crystalline silica exposure among outdoor workers in Wyoming, South Dakota, and Montana. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2018;15(6):455–465. DOI: 10.1080/15459624.2018.1447116.
25. Giordani M., Mattioli M., Ballirano P., Pacella A., Cenni M., Boscardin M., Valentini L. Geological occurrence, mineralogical characterization, and risk assessment of potentially carcinogenic erionite in Italy. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2017;20(2):81–103. DOI: 10.1080/10937404.2016.1263586.
26. Pacella A., Ballirano P., Cametti G. Quantitative chemical analysis of erionite fibres using a micro-analytical SEM-EDX method. *European Journal of Mineralogy*. 2016;28(2):257–264. DOI: 10.1127/ejm/2015/0027-2497.
27. Croce A., Musa M., Allegrina M., Rinaudo C., Baris Y. I., Dogan A. U., Carbone M. Micro-Raman spectroscopy identifies crocidolite and erionite fibers in tissue sections. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2013;44(10):1440–1445.

28. Furukawa H., Cordova K. E., O'Keeffe M., Yaghi O. M. The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks. *Science*. 2013;341(6149):1230444. DOI: 10.1126/science.1230444.
29. Banerjee R., Phan A., Wang B., Knobler C., Furukawa H., O'Keeffe M., Yaghi O. M. High-throughput synthesis of zeolitic imidazolate frameworks and application to CO_2 capture. *Science*. 2008;319(5865):939–943.
30. Moggach S. A., Bennett T. D., Cheetham A. K. The effect of pressure on ZIF-8: increasing porepressure and the formation of a high-pressure phase at 1.47 GPa. *Angewandte Chemie*. 2009;121(38):7221–7223.
31. Fairen-Jimenez D., Moggach S. A., Wharmby M. T., Wright P.A., Parsons S., Düren T. Opening the gate: framework flexibility in ZIF-8 explored by experiments and simulations. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(23):8900–8902. DOI: 10.1021/ja202154j.
32. Sameni M., Moradbeigi P., Hosseini S., Ghaderian S. M. H., Jajarmi V., Miladipour A. H., Basati H., Abbasi M., Salehi M. ZIF-8 Nanoparticle: A Valuable Tool for Improving Gene Delivery in Sperm-Mediated Gene Transfer. *Biological Procedures Online*. 2024;26:4. DOI: 10.1186/s12575-024-00229-2.
33. Zhou L., Li N., Owens G., Chen Z. Simultaneous removal of mixed contaminants, copper and norfloxacin, from aqueous solution by ZIF-8. *Chemical Engineering Journal*. 2019;362:628–637. DOI: 10.1016/j.cej.2019.01.068.
34. de Moura Ferraz L. R., Gonçalves Alves Tabosa A. É., Souza da Silva Nascimento D. D., Silva Ferreira A., de Albuquerque Wanderley Sales V., Rodrigues Silva J. Y., Alves Júnior S., Araújo Rolim L., de Souza Pereira J. J., Rolim-Neto P. J. ZIF-8 as a promising drug delivery system for benznidazole: development, characterization, in vitro dialysis release and cytotoxicity. *Scientific Reports*. 2020;10:16815. DOI: 10.1038/s41598-020-73848-w.
35. Wallbridge S. P., Archer S., Elsegood M. R. J., Wagner J. L., Christie J. K., Dann S. E. An investigation into the adsorption mechanism of *n*-butanol by ZIF-8: a combined experimental and *ab initio* molecular dynamics approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2023;25:19911–19922.
36. Butova V. V., Polyakov V. A., Bulanova, Soldatov M. A., Yahia I. S., Zahran H. Y., Abd El-Rehim A. F., Garni H. E., Aboraia A. M., Soldatov A. V. MW synthesis of ZIF-65 with a hierarchical porous structure. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2020;293:109685.
37. Butova V. V., Budnik A. P., Bulanova E. A., Soldatov A. V. New microwave-assisted synthesis of ZIF-8. *Mendeleev Communications*. 2016;26(1):43–44.
38. Cravillon J., Schröder C.A., Bux H., Rothkirch A., Caro J., Wiebcke M. Formate modulated solvothermal synthesis of ZIF-8 investigated using time-resolved *in situ* X-ray diffraction and scanning electron microscopy. *CrystEngComm*. 2012;14(2):492–498.
39. Jung B. K., Jun J. W., Hasan Z., Jhung S. H. Adsorptive removal of *p*-arsanilic acid from water using mesoporous zeolitic imidazolate framework-8. *Chemical Engineering Journal*. 2015;267:9–15.
40. Порываев А. С. Исследование МОКП ZIF-8 методом ЭПР спектроскопии с использованием инкапсулированного спинового зонда. Дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск; 2021. 139 с. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/issledovanie-mokp-zif-8-metodom-epr-spektroskopii-s-ispolzovaniem-inkapsulirovannogo-spinovo. Ссылка активна на 30.08.2024.
41. Cerri G., Farina M., Brundu A., Daković A., Giunchedi P., Gavini E., Rassu G. Natural zeolites for pharmaceutical formulations: Preparation and evaluation of a clinoptilolite-based material. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2016;223:58–67.
42. Vinaches P., Bernardo-Gusmão K., Pergher S. B. C. An Introduction to Zeolite Synthesis Using Imidazolium-Based Cations as Organic Structure-Directing Agents. *Molecules*. 2017;22:1307.
43. Hao J., Milašin I.S., Eken Z. B., Mravak-Stipetic M., Pavelić K., Ozer F. Effects of Zeolite as a Drug Delivery System on Cancer Therapy: A Systematic Review. *Molecules*. 2021;26:6196.
44. Anthony J. L., Davis M. E. Assembly of Zeolites and Crystalline Molecular Sieves. In: Adachi M., Lockwood D. J., editors. Self-Organized Nanoscale Materials. New York: Springer Science; 2006. P. 159–185.
45. Souza I. M. S., García-Villén F., Viseras C., Perger S. B. C. Zeolites as Ingredients of Medicinal Products. *Pharmaceutics*. 2023;15(5):1352. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051352.
46. Datt A., Ndiege N., Larsen S. C. Development of porous nanomaterials for applications in drug delivery and imaging. In: Nagarajan R., editor. Nanomaterials for Biomedicine. Washington: American Chemical Society; 2012. P. 239–258.
47. Казанцева Л. К., Сереткин Ю. В. Способ получения Цеолита NaY. Патент РФ на изобретение № RU2476378C1. 25.07.2011. Доступно по: https://patents.google.com/patent/RU2476378C1/ru. Ссылка активна на 30.08.2024.
48. Арипова М. Х., Кадиров О. Ш., Тиллаев С. У., Худайназаров Ж. О. У., Файзиева Ф. М., Рузиева Ф. О. Получение низкомодульных синтетических цеолитов на основе местного сырья. *Universum: химия и биология*. 2022;92(2–1):65–70.
49. Прокофьев В. Ю., Гордина Н. Е., Константинова Е. М., Храмцова А. П. Способ получения синтетического гранулированного цеолита NaP. Патент РФ на изобретение № 2652210. 10.07.2017.
50. Сахаутдинов Р. А., Соколова В. В. О синтезе цеолитов. *Научный лидер*. 2022;67(22):46–49.
51. Гордина Н. Е., Прокофьев В. Ю. Получение синтетического LTA цеолита из механоактивированных смесей метакаолина. *Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология*. 2013;56(10):79–84.
52. Zaarour M., Dong B., Naydenova I., Retoux R., Mintova S. Progress in zeolite synthesis promotes advanced applications. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2014;189:11–21.
53. Corma A., Garcia H. Supramolecular host-guest systems in zeolites prepared by ship-in-a-bottle synthesis. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2004;2004(6):1143–1164.
54. Cundy C. S., Cox P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: history and development from the earliest days to the present time. *Chemical reviews*. 2003;103(3):663–702.
55. Kumar S., Wang Z., Penn R. L., Tsapatsis M. A structural resolution cryo-TEM study of the early stages of MFI growth. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(51):17284–17286. DOI: 10.1021/ja8063167.
56. Derakhshankhah H., Jafari S., Sarvari S., Barzegari E., Moakedi F., Ghorbani M., Varnamkhasti B. S., Jaymand M., Izadi Z., Tayebi L. Biomedical applications of zeolitic nanoparticles, with an emphasis on medical interventions. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:363–386. DOI: 10.2147/IJN.S234573.

57. Farías T., de Ménorval L. C., Zajac J., Rivera A. Adsolubilization of drugs onto natural clinoptilolite modified by adsorption of cationic surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;76(2):421–426.
58. Nezamzadeh-Ejhieh A., Tavakoli-Ghinani S. Effect of a nano-sized natural clinoptilolite modified by the hexadecyltrimethyl ammonium surfactant on cephalexin drug delivery. *Comptes Rendus Chimie*. 2014;17(1):49–61. DOI: 10.1016/j.crci.2013.07.009.
59. Lee Y. R., Jang M. S., Cho H. Y., Kwon H. J., Kim S., Ahn W. S. ZIF-8: a comparison of synthesis methods. *Chemical Engineering Journal*. 2015;271:276–280.
60. Wang Q., Sun Y., Li S., Zhang P., Yao Q. Synthesis and modification of ZIF-8 and its application in drug delivery and tumor therapy. *RSC Advances*. 2020;10(62):37600–37620. DOI: 10.1039/d0ra07950b.
61. Chen W., Du L., Wu C. Hydrothermal synthesis of MOFs. In: Yang J., Yang Y.-W. Metal-Organic frameworks for Biomedical Applications. Amsterdam: Elsevier; 2020. P. 141–57.
62. Thomas-Hillman I., Laybourn A., Dodds C., Kingman S. W. Realising the environmental benefits of metal–organic frameworks: recent advances in microwave synthesis. *Journal of Materials Chemistry A*. 2018;6(25):11564–11581.
63. Дейко Г. С., Кравцов Л. А., Давшан Н. А., Исаева В. И., Кустов Л. М. Сорбция ионов свинца на композитах на основе цеолитоподобных имидазолатных каркасов ZIF-8 и ZIF-67 и альгината кальция. *Журнал физической химии*. 2022;96(8):1180–1187.
64. Park K. S., Ni Z., Côté A. P., Choi J. Y., Huang R., Uribe-Romo F. J., Chae H. K., O'Keeffe M., Yaghi O. M. Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(27):10186–10191. DOI: 10.1073/pnas.0602439103.
65. Chen W., Sun L., Li Q., Huo L., Zhao H. Defect-rich MoS_2/r-GO hybrid via microwave-assisted solvothermal process for efficient electrocatalytic hydrogen evolution. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2020;45(3):22459–22468. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2020.06.114.
66. Красников А. А., Львова Е. С., Курзина И. А. Синтез и исследование физико-химических свойств цеолитоподобных имидазолатных каркасов. *Вестник Томского государственного университета. Химия*. 2020;19:37–44.
67. Wijaya C. J., Ismadji S., Aparamarta H. W., Gunawan S. Facile and Green Synthesis of Starfruit-Like ZIF-L, and Its Optimization Study. *Molecules*. 2021;26(15):4416. DOI: 10.3390/molecules26154416.
68. Nurain A. S. Z., Wan S. W. N., Norhaniza Y., Mohd Y. M. Z., Rafidah H., Fauzi I. A. Synthesis of zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) using different solvents for lead and cadmium adsorption. *Applied Nanoscience*. 2023;13(6):4005–4019.
69. Shahsavari M., Mohammadzadeh Jahani P., Sheikhshoaie I., Tajik S., Aghaei Afshar A., Askari M. B., Salarizadeh P., Di Bartolomeo A., Beitollahi H. Green Synthesis of Zeolitic Imidazolate Frameworks: A Review of Their Characterization and Industrial and Medical Applications. *Materials*. 2022;15(2):447.
70. Sun B., He Y., Peng R., Chu S., Zuo J. Air-flow Impacting for Continuous, Highly Efficient, Large-Scale Mechanochemical Synthesis: a Proof-Of-Concept Study. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2016;4:2122–2128.
71. Gugin N. Y., Villajos J. A., Dautain O., Maiwald M., Emmerling F. Optimizing the Green Synthesis of ZIF-8 by Reactive Extrusion Using *In Situ* Raman Spectroscopy. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2023;11(13):5175–5183.
72. Stock N., Biswas S. Synthesis of metal-organic frameworks (MOFs): routes to various MOF topologies, morphologies, and composites. *Chemical Reviews*. 2012;112(2):933–969. DOI: 10.1021/cr200304e.
73. Cho H.-Y., Kim J., Kim S.-N., Ahn W.-S. High yield 1-L scale synthesis of ZIF-8 via a sonochemical route. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013;169:180–184. DOI: 10.1016/j.micromeso.2012.11.012.
74. Haider J., Shahzadi A., Akbar M. U., Hafeez I., Shahzadi I., Khalid A., Ashfaq A., Ahmad S. O. A., Dilpazir S., Imran M. Ikram M., Ali G., Khan M., Khan Q., Maqbool M. A review of synthesis, fabrication, and emerging biomedical applications of metal-organic frameworks. *Biomaterials Advances*. 2022;140:213049. DOI: 10.1016/j.bioadv.2022.213049.
75. Kukkar P., Kim K.-H., Kukkar D., Singh P. Recent advances in the synthesis techniques for zeolitic imidazolate frameworks and their sensing applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 2021;446:214109.
76. Макаров А. В., Синеговская Л. М., Корчевин Н. А. Физико-химические исследования процесса адсорбции ионов тяжелых металлов на модифицированных алюмосиликатах. *iPolytech Journal*. 2013;73(2):147–154.
77. Лухнева О. Л., Чикин А. Ю., Пройдакова О. А. Природа взаимодействия ионов металлов с минеральными сорбентами в процессе доочистки сточных вод гальванических цехов. *iPolytech Journal*. 2010;45(5):194–197.
78. Deyko G. S., Kravtsov L. A., Davshan N. A., Isaeva V. I., Kustov L. M. Sorption of lead ions on ZIF-8 and ZIF-67 zeolite imidazolate frameworks and calcium alginate composites. *Russian Journal of Physical Chemistry*. 2022;96(8):1728–1735.
79. Jung B. K., Jun J. W., Hasan Z., Jhung S. H. Adsorptive removal of *p*-arsanilic acid from water using mesoporous zeolitic imidazolate framework-8. *Chemical Engineering Journal*. 2015;267:9–15.
80. Haghi A., Raissi H., Hashemzadeh H., Farzad F. Designing a high-performance smart drug delivery system for the synergetic co-absorption of DOX and EGCG on ZIF-8. *RSC Advances*. 2020;10(72):44533–44544.
81. Manousi N., Giannakoudakis D. A., Rosenberg E., Zachariadis G. A. Extraction of Metal Ions with Metal-Organic Frameworks. *Molecules*. 2019;24(24):4605.
82. Дейко Г. С., Кравцов Л. А., Давшан Н. А., Исаева В. И., Кустов Л. М. Сорбция ионов свинца на композитах на основе цеолитоподобных имидазолатных каркасов ZIF-8 и ZIF-67 и альгината кальция. *Журнал физической химии*. 2022;96(8):1180–1187.
83. Zhuang J., Kuo C.-H., Chou L.-Y., Liu D.-Y., Weerapana E., Tsung C.-K. Optimized metal-organic-framework nanospheres for drug delivery: evaluation of small-molecule encapsulation. *ACS Nano*. 2014;8(3):2812–2819. DOI: 10.1021/nn406590q.
84. Wu Q., Niu M., Chen X., Tan L., Fu C., Ren X., Ren J., Li L., Xu K., Zhong H. Biocompatible and biodegradable zeolitic imidazolate framework/polydopamine nanocarriers for dual stimulus triggered tumor thermo-chemotherapy. *Biomaterials*. 2018;162:132–143.

85. Chen B., Yang Z. Zeolitic imidazolate framework materials: Recent progress in synthesis and applications. *Journal of Materials Chemistry A*. 2014;2:16811–16831.
86. Xie R., Yang P., Peng S., Cao Y., Yao X., Guo S., Yang W. A phosphorylcholine-based zwitterionic copolymer coated ZIF-8 nanodrug with a long circulation time and charged conversion for enhanced chemotherapy. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8:6128–6138.
87. Deria P., Mondloch J. E., Karagiaridi O., Bury W., Hupp J. T., Farha O. K. Beyond post-synthesis modification: evolution of metal–organic frameworks via building block replacement. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(16):5896–5912.
88. Abdelhamid H. N. Zeolitic Imidazolate Frameworks (ZIF-8) for Biomedical Applications: A Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2021;28(34):7023–7075. DOI: 10.2174/0929867328666210608143703.
89. Keskin S., Kızılel S. Biomedical applications of metal organic frameworks. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2011;50(4):1799–1812.
90. Singh R., Prasad A., Kumar B., Kumari S., Sahu R. K., Hedau S. T. Potential of dual drug delivery systems: MOF as hybrid nano-carrier for dual drug delivery in cancer treatment. *ChemistrySelect*. 2022;7(36):e202201288.
91. Дьячкова Т. Ю., Макарова И. А., Ваганова Е. С., Давыдова О. А., Мосунова Т. В. Сорбционная очистка растворов от ионов тяжелых металлов с применением цеолита, модифицированного углеродными нанотрубками. *Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Химия*. 2019;11(2):16–27.
92. Макаров А. В. Адсорбция тяжелых металлов модифицированными цеолитами. *Современные технологии и научно-технический прогресс*. 2013;1:25.
93. Manousi N., Giannakoudakis D. A., Rosenberg E., Zachariadis G. A. Extraction of metal ions with metal–organic frameworks. *Molecules*. 2019;24(24):4605.
94. Hao J., Stavljenić Milašin I., Batu Eken Z., Mravak-Stipetic M., Pavelić K., Ozer F. Effects of Zeolite as a Drug Delivery System on Cancer Therapy: A Systematic Review. *Molecules*. 2021;26(20):6196. DOI: 10.3390/molecules26206196.
95. Saravanan M., Kumar V., Padmanabhan T. V., Banu F. Viscoelastic properties and antimicrobial effects of soft liners with silver zeolite in complete dental prosthesis wearers: an in vivo study. *The International Journal of Prosthodontics*. 2015;28(3):265–269. DOI: 10.11607/ijp.3740.
96. Pourhajibagher M., Bahador A. Enhanced reduction of polymicrobial biofilms on the orthodontic brackets and enamel surface remineralization using zeolite-zinc oxide nanoparticles-based antimicrobial photodynamic therapy. *BMC Microbiol*. 2021;21(1):273. DOI: 10.1186/s12866-021-02324-w.
97. Hajipour M. J., Fromm K. M., Ashkarran A. A., Jimenez de Aberasturi D., de Larramendi I. R., Rojo T., Serpooshan V., Parak W. J., Mahmoudi M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. 2012;30(10):499–511. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
98. Alswat A. A., Ahmad M. B., Saleh T. A., Hussein M. Z. B., Ibrahim N. A. Effect of zinc oxide amounts on the properties and antibacterial activities of zeolite/zinc oxide nanocomposite. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2016;68:505–511. DOI: 10.1016/j.msec.2016.6.028.
99. Alswat A. A., Ahmad M. B., Saleh T. A. Preparation and characterization of zeolite\zinc oxide-copper oxide nanocomposite: antibacterial activities. *Colloid and Interface Science Communications*. 2017;16:19–24.
100. Kihara T., Zhang Y., Hu Y., Mao Q., Tang Y, Miyake J. Effect of composition, morphology and size of nanozeolite on its in vitro cytotoxicity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011;111(6):725–730. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.01.017.
101. Yang F., Wen X., Ke Q.-F., Xie X.-T., Guo Y.-P. pH-responsive mesoporous ZSM-5 zeolites/chitosan core-shell nanodisks loaded with doxorubicin against osteosarcoma. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;85:142–153. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.024.
102. Lei Z., Tang Q., Ju Y., Lin Y., Bai X., Luo H., Tong Z. Block copolymer@ZIF-8 nanocomposites as a pH-responsive multi-steps release system for controlled drug delivery. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2020;31(6):695–711. DOI: 10.1080/09205063.2020.1713451.
103. Hao J., Stavljenić Milašin I., Batu Eken Z., Mravak-Stipetic M., Pavelić K., Ozer F. Effects of Zeolite as a Drug Delivery System on Cancer Therapy: A Systematic Review. *Molecules*. 2021;26:6196. DOI: 10.3390/molecules26206196.
104. Tan C., Wu J., Wen Z. Doxorubicin-Loaded MnO_2@Zeolitic Imidazolate Framework-8 Nanoparticles as a Chemophotothermal System for Lung Cancer Therapy. *ACS Omega*. 2021;6(20):12977–12983. DOI: 10.1021/acsomega.0c05922.
105. Sharsheeva A., Iglin, V. A., Nesterov P. V., Kuchur O. A., Garifullina E., Hey-Hawkins E., Ulasevich S. A., Skorb E. V., Vinogradov A. V., Morozov M. I. Light-controllable systems based on TiO(2)-ZIF-8 composites for targeted drug release: Communicating with tumour cells. *Current Gene Therapy*. 2019;7:6810–6821.
106. Kang Y., Yu X., Fan X., Aodenggerile, Zhao S., Tu C., Yan Z., Wang R., Li W., Qiu H. Tetramodal Imaging and Synergistic Cancer Radio-Chemotherapy Enabled by Multiple Component-Encapsulated Zeolitic Imidazolate Frameworks. *ACS Nano*. 2020;14:4336–4351.
107. Li X., Hou S., Chen J., He C.-E., Gao Y.-E., Lu Y., Jia D., Ma X., Xue P., Kang Y., Xu Z. Engineering silk sericin decorated zeolitic imidazolate framework-8 nanoplatform to enhance chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021;200:111594. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.111594.
108. Guo H., Mukwaya V., Wu D., Xiong S., Dou H. Acid-Responsive Decomposable Nanomedicine Based on Zeolitic Imidazolate Frameworks for Near-Infrared Fluorescence Imaging/Chemotherapy Combined Tumor Theranostics. *Pharmaceutics*. 2024;16(6):823. DOI: 10.3390/pharmaceutics16060823.
109. Adhikari C., Das A., Chakraborty A. Zeolitic imidazole framework (ZIF) nanospheres for easy encapsulation and controlled release of an anticancer drug doxorubicin under different external stimuli: a way toward smart drug delivery system. Mol. *Pharmaceutics*. 2015;12:3158–3166.
110. Wen X., Yang F., Ke Q.-F., Xie X.-T., Guo Y.-P. Hollow mesoporous ZSM-5 zeolite/chitosan ellipsoids loaded with doxorubicin as pH-responsive drug delivery systems against osteosarcoma. *Journal of Materials Chemistry B*. 2017;5:7866–7875.
111. Khatamian M., Divband B., Farahmand-Zahed F. Synthesis and characterization of Zinc (II)-loaded Zeolite/Graphene oxide nanocomposite as a new drug carrier. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*. 2016;66:251–258.

112. Abasian P., Radmansouri M., Habibi Jouybari M., Ghasemi M. V., Mohammadi A., Irani M., Jazi F. S. Incorporation of magnetic NaX zeolite/DOX into the PLA/chitosan nanofibers for sustained release of doxorubicin against carcinoma cells death in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;121:398–406.
113. Zheng L., Zhang Y., Lin H., Kang S., Li Y., Sun D., Chen M., Wang Z., Jiao Z., Wang Y. Ultrasound and Near-Infrared Light Dual-Triggered Upconversion Zeolite-Based Nanocomposite for Hyperthermia-Enhanced Multimodal Melanoma Therapy via a Precise Apoptotic Mechanism. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020;12:32420–32431.
114. deKrafft K. E., Xie Z., Cao G., Tran S., Ma L., Zhou O. Z., Lin W. Iodinated Nanoscale Coordination Polymers as Potential Contrast Agents for Computed Tomography. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48(52):9901–9904. DOI: 10.1002/anie.200904958.
115. Yan L., Chen X., Wang Z., Zhang X., Zhu X., Zhou M., Chen W., Huang L., Roy V. A. L., Yu P. K. N. Zhu G., Zhang W. Size Controllable and Surface Tunable Zeolitic Imidazolate Framework-8-Poly(acrylic acid sodium salt) Nanocomposites for pH Responsive Drug Release and Enhanced in Vivo Cancer Treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017;9(38):32990–33000.
116. Duan D., Liu H., Xu M., Chen M., Han Y., Shi Y., Liu Z. Size-Controlled Synthesis of Drug-Loaded Zeolitic Imidazolate Framework in Aqueous Solution and Size Effect on Their Cancer Theranostics in Vivo. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018;10(49):42165–42174. DOI: 10.1021/acsami.8b17660.
117. Longley D. B., Harkin D. P., Johnston P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2013;3(5):330–338. DOI: 10.1038/nrc1074.
118. Cao Y., Jiang Z., Li Y., Wang Y., Yang Y., Akakuru O. U., Li J., Wu A. Tandem post-synthetic modification of a zeolitic imidazolate framework for CXCR4-overexpressed esophageal squamous cell cancer imaging and therapy. *Nanoscale*. 2020;12:12779-12789.
119. Jiang Z., Li Y., Wei Z., Yuan B., Wang Y., Akakuru O. U., Li Y., Li J., Wu A. Pressure-induced amorphous zeolitic imidazole frameworks with reduced toxicity and increased tumor accumulation improves therapeutic efficacy *In vivo*. *Bioactive Materials*. 2021;6(3):740–748.
120. Pandey A., Kulkarni S., Vincent A. P., Nannuri S. H., George S. D., Mutalik S. Hyaluronic acid-drug conjugate modified core-shell MOFs as pH responsive nanoplatform for multimodal therapy of glioblastoma. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;588:119735. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119735.
121. Xiao X., Liang S., Zhao Y., Huang D., Xing B., Cheng Z., Lin J. Core-shell structured 5-FU-ZIF-90-ZnO as a biodegradable nanoplatform for synergistic cancer therapy. *Nanoscale*. 2020;12:3846–3854.
122. Vilaça N., Amorim R., Machado A. F., Parpot P., Pereira M. F., Sardo M., Rocha J., Fonseca A. M., Neves I. C., Baltazar F. Potentiation of 5-fluorouracil encapsulated in zeolites as drug delivery systems for in vitro models of colorectal carcinoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;112:237–244.
123. Sagir T., Huysal M., Durmus Z., Kurt B. Z., Senel M., Isık S. Preparation and in vitro evaluation of 5-fluorouracil loaded magnetite-zeolite nanocomposite (5-FU-MZNC) for cancer drug delivery applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;77:182–190.
124. Abd-Elsatar A. G., Farag M. M., Youssef H. F., Salih S. A., Mounier M. M., El-Meliegy E. Different zeolite systems for colon cancer therapy: Monitoring of ion release, cytotoxicity and drug release behavior. *Progress in Biomaterials*. 2019;8(2):101–113. DOI: 10.1007/s40204-019-0115-8.
125. Imran M., Ullah A., Saeed F., Nadeem M., Arshad M .U., Suleria H. Cucurmin anticancer, & antitumor perspectives: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58:1271–1293.
126. Zheng M., Liu S., Guan X., Xie Z. One-Step Synthesis of Nanoscale Zeolitic Imidazolate Frameworks with High Curcumin Loading for Treatment of Cervical Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015;7:22181–22187.
127. Xing Y., Jiang Z., Akakuru O. U., He Y., Li A., Li J., Wu A. Mitochondria-targeting zeolitic imidazole frameworks to overcome platinum-resistant ovarian cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;189:110837.
128. Amorim R., Vilaça N., Martinho O., Reis R. M., Sardo M., Rocha J., Fonseca A. M., Baltazar F., Neves I. C. Zeolite Structures Loading with an Anticancer Compound as Drug Delivery Systems. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2012;116:25642–25650.
129. Kannen H., Nomura S., Hazama H., Kaneda Y., Fujino T., Awazu K. Enhancement of Ionization Efficiency Using Zeolite in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Multiple Drugs in Cancer Cells (Mass Spectrometry of Multiple Drugs in Cells Using Zeolite). *Mass Spectrometry*. 2020;9(1):A0091. DOI: 10.5702/massspectrometry.A0091.
130. Martinho O., Vilaça N., Castro P. J., Amorim R., Fonseca A. M., Baltazar F., Reis R. M., Neves I. C. In vitro and in vivo studies of temozolomide loading in zeolite structures as drug delivery systems for glioblastoma. *RSC Advances*. 2015;5:28219–28227.
131. Khojaewa V., Lopatin O., Zelenikhin P., Ilinskaya O. Zeolites as Carriers of Antitumor Ribonuclease Binase. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:442. DOI: 10.3389/fphar.2019.00442.
132. Souza I. M. S., García-Villén F., Viseras C., Pergher S. B. C. Zeolites as Ingredients of Medicinal Products. *Pharmaceutics*. 2023;15(5):1352. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051352.
133. Guo Y. P., Long T., Song Z. F., Zhu Z. A. Hydrothermal Fabrication of ZSM-5 Zeolites: Biocompatibility, Drug Delivery Property, and Bactericidal Property. *Journal of Biomedical Materials Research – Part B Applied Biomaterials*. 2014;102:583–591.
134. Yassue-Cordeiro P. H., Zandonai C. H., Genesi B. P., Lopes P. S., Sanchez-Lopez E., Garcia M. L., Fernandes-Machado N. R. C., Severino P., Souto E. B., da Silva C. F. Development of Chitosan/Silver Sulfadiazine/Zeolite Composite Films for Wound Dressing. *Pharmaceutics*. 2019;11:535.
135. Szegedi Á., Popova M., Trendafilova I., Trif L., Mihály J., Makk J., Mavrodinova V. Bicomponent Drug Formulation for Simultaneous Release of Ag and Sulfadiazine Supported on Nanosized Zeolite Beta. *Nano-Structures & Nano-Objects*. 2020;24:100562.
136. Moradi S., Barati A., Tonelli A. E., Hamedi H. Effect of Clinoptilolite on Structure and Drug Release Behavior of Chitosan/Thyme Oil Γ-Cyclodextrin Inclusion Compound Hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*. 2021;138:49822.
137. Kocaaga B., Kurkcuoglu O., Tatlier M., Batirel S., Guner F. S. Low-Methoxyl Pectin–Zeolite Hydrogels Controlling Drug Release Promote In Vitro Wound Healing. *Journal of Applied Polymer Science*. 2019;136:47640.

138. Kocaaga B., Kurkcuoglu O., Tatlier M., Dinler-Doganay G., Batirel S., Güner, F. S. Pectin–Zeolite-Based Wound Dressings with Controlled Albumin Release. *Polymers*. 2022;14:460.
139. Youssefi Azarfam M., Nasirinezhad M., Naeim H., Zarrintaj P., Saeb M. A Green Composite Based on Gelatin/Agarose/Zeolite as a Potential Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Journal of Composites Science*. 2021;5(5):125. DOI: 10.3390/jcs5050125.
140. Wise A. J., Sefy J. S., Barbu E., O'Malley A. J., van der Merwe S. M., Cox P. A. Zero-Order and Prolonged Release of Atenolol from Microporous FAU and BEA Zeolites, and Mesoporous MCM-41: Experimental and Theoretical Investigations. *Journal of Controlled Release*. 2020;327:140–149. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.027.
141. Souza I. M. S., Sainz-Díaz C. I., Viseras C., Pergher S. B. C. Adsorption Capacity Evaluation of Zeolites as Carrier of Isoniazid. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2020;292:109733. DOI: 10.1016/j.micromeso.2019.109733.
142. Souza I. M. S., Borrego-Sánchez A., Sainz-Díaz C. I., Viseras C., Pergher S. B. C. Study of Faujasite Zeolite as a Modified Delivery Carrier for Isoniazid. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;118:111365. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111365.
143. Souza I. M. S., Borrego-Sánchez A., Rigoti E., Sainz-Díaz C. I., Viseras C., Pergher S. B. C. Experimental and Molecular Modelling Study of Beta Zeolite as Drug Delivery System. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2021;321:111152. DOI: 10.1016/j.micromeso.2021.111152.
144. Karavasili C., Kokove L., Kontopoulou I., Eleftheriadis G. K., Bouropoulos N., Fatouros D. G. Dissolution Enhancement of the Poorly Soluble Drug Nifedipine by Co-Spray Drying with Microporous Zeolite Beta. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016;35:91–97.
145. Karavasili C., Amanatiadou E. P., Kontogiannidou E., Eleftheriadis G. K., Bouropoulos N., Pavlidou E., Kontopoulou I., Vizirianakis I. S., Fatouros D. G. Comparison of Different Zeolite Framework Types as Carriers for the Oral Delivery of the Poorly Soluble Drug Indomethacin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;528:76–87.
146. Kontogiannidou E., Karavasili C., Kouskoura M. G., Filippousi M., Van Tendeloo G., Andreadis I. I., Eleftheriadis G. K., Kontopoulou I., Markopoulou C. K., Bouropoulos N. In Vitro and Ex Vivo Assessment of Microporous Faujasite Zeolite (NaX-FAU) as a Carrier for the Oral Delivery of Danazol. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;51:177–184.
147. Yaneva Z., Ivanova D., Popov N. Clinoptilolite Microparticles as Carriers of Catechin-Rich Acacia Catechu Extracts: Microencapsulation and In Vitro Release Study. *Molecules*. 2021;26:1655.
148. Rimoli M. G., Rabaioli M. R., Melisi D., Curcio A., Mondello S., Mirabelli R., Abignente E. Synthetic Zeolites as a New Tool for Drug Delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008;87(1):156–164. DOI: 10.1002/jbm.a.31763.
149. Khodaverdi E., Soleimani H. A., Mohammadpour F., Hadizadeh F. Synthetic Zeolites as Controlled-Release Delivery Systems for Anti-Inflammatory Drugs. *Chemical Biology & Drug Design*. 2016;87:849–857.
150. Khodaverdi E., Honarmandi R., Alibolandi M., Baygi R. R., Hadizadeh F., Zohuri G. Evaluation of synthetic zeolites as oral delivery vehicle for anti-inflammatory drugs. *The Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2014;17(5):337–343.
151. Datt A., Fields D., Larsen S. C. An experimental and computational study of the loading and release of aspirin from zeolite HY. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2012;116(40):21382–21390. DOI: 10.1021/jp3067266.
152. Dyer A., Morgan S., Wells P., Williams C. The Use of Zeolites as Slow Release Anthelmintic Carriers. *Journal of Helminthology*. 2000;74:137–141.
153. Sandomierski M., Zielińska, M., Voelkel, A. Calcium Zeolites as Intelligent Carriers in Controlled Release of Bisphosphonates. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;578:119117.
154. Neolaka Y. A. B., Darmokoesoemo H., Adu A. A., Lawa Y., Naat J., Riwu A. A. P., Bui M. F., Wila E. C., Fahirah M. A., Budiastant T. A. Study of Mordenite Natural Zeolite Type Modified by Cu(II) Cation as an Oral Safe Drug Carrier for Ibuprofen and Meloxicam. *Journal of Molecular Liquids*. 2022;352:118734.
155. Nezamzadeh-Ejhieh A., Tavakoli-Ghinani S. Effect of a Nano-Sized Natural Clinoptilolite Modified by the Hexadecyltrimethyl Ammonium Surfactant on Cephalexin Drug Delivery. *Comptes Rendus Chimie*. 2014;17:49–61.
156. de Gennaro B., Catalanotti L., Cappelletti P., Langella A., Mercurio M., Serri C., Biondi M., Mayol L. Surface Modified Natural Zeolite as a Carrier for Sustained Diclofenac Release: A Preliminary Feasibility Study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;130:101-109.
157. Krajišnik D., Daković A., Malenović A., Kragović M., Milić J. Ibuprofen Sorption and Release by Modified Natural Zeolites as Prospective Drug Carriers. *Clay Minerals*. 2015;50:11–22.
158. Pasquino R., Di Domenico M., Izzo F., Gaudino D., Vanzanella V., Grizzuti N., de Gennaro B. Rheology-Sensitive Response of Zeolite-Supported Anti-Inflammatory Drug Systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2016;146:938–944.
159. Izzo F., Mercurio M., de Gennaro B., Aprea P., Cappelletti P., Daković A., Germinario C., Grifa C., Smiljanic D., Langella A. Surface Modified Natural Zeolites (SMNZs) as Nanocomposite Versatile Materials for Health and Environment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2019;182:110380.
160. Sandomierski M., Jakubowski M., Ratajczak M., Voelkel A. Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8) modified titanium alloy for controlled release of drugs for osteoporosis. *Scientific Reports*. 2022;12(1):9103. DOI: 10.1038/s41598-022-13187-0.
161. Li Y., Cai Y., Chen T., Bao X. Zeolites: A series of promising biomaterials in bone tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:1066552. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1066552.
162. Aslani Z., Nazemi N., Rajabi N., Kharaziha M., Bakhsheshi-Rad H. R., Kasiri-Asgarani M., Najafinezhad A., Ismail A. F., Sharif S., Berto F. Antibacterial Activity and Cell Responses of Vancomycin-Loaded Alginate Coating on ZSM-5 Scaffold for Bone Tissue Engineering Applications. *Materials*. 2022;15(14):4786. DOI: 10.3390/ma15144786.
163. Chebbi M., Azambre B., Cantrel L., Huvé M., Albiol T. Influence of structural, textural and chemical parameters of silver zeolites on the retention of methyl iodide. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2017;244:137–150.
164. Singh S. Zinc oxide nanoparticles impacts: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods.* 2019;29:300–311.

165. Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Kaus N. H. M., Ann L. C., Bakhori S. K. M., Hasan H., Mohamad D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*. 2015;7:219–242.
166. Buchwald Z., Sandomierski M., Voelkel A. Calcium-Rich 13X Zeolite as a Filler with Remineralizing Potential for Dental Composites. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2020;6(7):3843–3854. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.0c00450.
167. Kim H.-J., Son J. S., Kim K.-H., Kwon T.-Y. Antimicrobial Activity of Glass Ionomer Cement Incorporated with Chlorhexidine-Loaded Zeolite Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016;16(2):1450–1453. DOI: 10.1166/jnn.2016.11915.
168. Nikawa H., Yamamoto T., Hamada T., Rahardjo M. B., Murata H., Nakanoda S. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2008;24:350–357. DOI: 10.1111/j.1365-2842.1997.tb00339.x.
169. Çinar Ç., Odabaş M., Gürel M. A., Baldağ I. The effects of incorporation of silver-zeolite on selected properties of mineral trioxide aggregate. *Dental Materials Journal*. 2013;32(6):872–876. DOI: 10.4012/dmj.2012-314.
170. Ghatole K., Patil A., Giriyappa R. H., Singh T. V., Jyotsna S. V., Rairam S. Evaluation of Antibacterial Efficacy of MTA with and without Additives Like Silver Zeolite and Chlorhexidine. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016;10(6):11–14. DOI: 10.7860/JCDR/2016/18014.7913.
171. Bedi R. S., Beving D. E., Zanello L. P., Yan Y. Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(8):3265–3271. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.04.019.
172. Zhang X., Chen J., Pei X., Wang J., Wan Q., Jiang S., Huang C., Pei X. Enhanced Osseointegration of Porous Titanium Modified with Zeolitic Imidazolate Framework-8. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017;9:25171–25183. DOI: 10.1021/acsami.7b07800.
173. Chen J., Zhang X., Huang C., Cai H., Hu S., Wan Q., Pei X., Wang J. Osteogenic activity and antibacterial effect of porous titanium modified with metal-organic framework films. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2016;105:834–846. DOI: 10.1002/jbm.a.35960.
174. Kraljević Pavelić S., Simović Medica J., Gumbarević D., Filošević A., Pržulj N., Pavelić K. Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1350. DOI: 10.3389/fphar.2018.01350.
175. Mastinu A., Kumar A., Maccarinelli G., Bonini S. A., Premoli M., Aria F., Gianoncelli A., Memo M. Zeolite Clinoptilolite: Therapeutic Virtues of an Ancient Mineral. *Molecules*. 2019;24(8):1517. DOI: 10.3390/molecules24081517.
176. Pavelić K., Hadžija M., Bedrica L., Pavelić J., Đikić I., Katić M., Kralj M., Bosnar M. H., Kapitanović S., Poljak-Blaži M., Križanac Š., Stojković R., Jurin M., Subotić B., Čolić M. Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *Journal of Molecular Medicine*. 2001;78:708–720. DOI: 10.1007/s001090000176.
177. Pavelic K., Katic M., Sverko V., Marotti T., Bosnjak B., Balog T., Stojkovic R., Radacic M., Colic M., Poljak-Blazi M. Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic ability. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2002;128(1):37–44. DOI: 10.1007/s00432-001-0301-6.
178. Demirer E., Ghattas C. F., Radwan M. O., Elamin E. M. Clinical and prognostic features of erionite-induced malignant mesothelioma. *Yonsei Medical Journal*. 2015;56(2):311–323. DOI: 10.3349/ymj.2015.56.2.311.
179. Attanoos R. L., Churg A., Galateau-Salle F., Gibbs A. R., Roggli V. L. Malignant Mesothelioma and Its Non-Asbestos Causes. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2018;142(6):753–760. DOI: 10.5858/arpa.2017-0365-RA.
180. Iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: World health organization; 1987. 449 p.
181. Dogan A. U., Baris Y. I., Dogan M., Emri S., Steele I., Elmishad A. G., Carbone M. Genetic predisposition to fiber carcinogenesis causes a mesothelioma epidemic in Turkey. *Cancer Research*. 2006;66(10):5063–5068. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4642.
182. Patel J. P., Brook M. S. Erionite asbestiform fibres and health risk in Aotearoa/New Zealand: A research note. *New Zealand Geographer*. 2021;77(2):123–129.
183. Fach E., Kristovich R., Long J. F., Waldman W. J., Dutta P. K., Williams M. V. The effect of iron on the biological activities of erionite and mordenite. *Environment International*. 2003;29(4):451–458. DOI: 10.1016/S0160-4120(02)00193-9.
184. Dogan A. U., Dogan M. Re-evaluation and re-classification of erionite series minerals. *Environmental Geochemistry and Health*. 2008;30(4):355–366. DOI: 10.1007/s10653-008-9163-z.
185. Kshirsagar P., Miranda-Avilés R., Loza-Aguirre I., Li Y., Alquiza M. J. P. Y., Moncada-Sánchez C. D., Hernández-Jiménez A. Erionite series minerals in felsic volcanic rocks of southern Mesa Central, Guanajuato, Mexico. *Environmental Earth Sciences*. 2021;80(19):1–21.
186. Reid G., Klebe S., van Zandwijk N., George A. M. Asbestos and Zeolites: from A to Z via a Common Ion. *Chemical Research in Toxicology*. 2021;34(4):936–951. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00286.
187. Waris G., Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*. 2006;5(1):14. DOI: 10.1186/1477-3163-5-14.
188. Pacella A., Cremisini C., Nardi E., Montereali M. R., Pettiti I., Giordani M., Ballirano P. Different erionite species bind iron into the structure: A potential explanation for fibrous erionite toxicity. *Minerals*. 2018;8(2):36.
189. Gualtieri A. F., Gandolfi N. B., Passaglia E., Pollastri S., Mattioli M., Giordani M., Gualtieri M. L. Is fibrous ferrierite a potential health hazard? Characterization and comparison with fibrous erionite. *American Mineralogist: Journal of Earth and Planetary Materials*. 2018;103(7):1044-1055.
190. Ahali Abadeh Z., Saviano G., Ballirano P., Santonicola M. G. Curcumin-loaded zeolite as anticancer drug carrier: Effect of curcumin adsorption on zeolite structure. *Pure and Applied Chemistry*. 2020;92(3):461–471. DOI: 10.1515/pac-2018-1213.
191. Derakhshankhah H., Jafari S., Sarvari S., Barzegari E., Moakedi F., Ghorbani M., Varnamkhasti B. S., Jaymand M., Izadi Z., Tayebi L. Biomedical Applications of Zeolitic Nanoparticles, with an Emphasis on Medical Interventions. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:363–386. DOI: 10.2147/IJN.S234573.
192. Lehman S. E., Larsen S. C. Zeolite and mesoporous silica nanomaterials: greener syntheses, environmental applications and biological toxicity. *Environmental Science: Nano*. 2014;1(3):200–213.

193. Katic M., Bosnjak B., Gall-Troselj K., Dikic I., Pavelic K. A clinoptilolite effect on cell media and the consequent effects on tumor cells *in vitro*. *Frontiers in Bioscience*. 2006;11(2):1722–1732. DOI: 10.2741/1918.
194. Zakeri N., Rezaie H. R., Javadpour J., Kharaziha M. Effect of pH on cisplatin encapsulated zeolite nanoparticles: Release mechanism and cytotoxicity. *Materials Chemistry and Physics*. 2021;273:124964.
195. Mintova S., Burtea C., Hébert C. Corona protein composition and cytotoxicity evaluation of ultra-small zeolites synthesized from template free precursor suspensions. *Toxicology Research*. 2013;2(4):270–279.
196. Abd-Elsatar A. G., Farag M. M., Youssef H. F., Salih S. A., Mounier M. M., El-Meliegy E. Different zeolite systems for colon cancer therapy: monitoring of ion release, cytotoxicity and drug release behavior. *Progress in Biomaterials*. 2019;8(2):101–113. DOI: 10.1007/s40204-019-0115-8.
197. Паничев А. М., Кулаков Ю. В., Гульков А. Н. Применение цеолитов в медицине. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2003;(4):21–24.
198. Гайдаш А. А., Апчел В. Я., Ивченко Е. В., Белый В. И., Бакакин В. В. Влияние цеолитовых туфов на организм при пероральном поступлении. *Вестник российской военно-медицинской академии*. 2016;1(53):115–123.
199. Цеолиты. Эволюция знаний. Экспериментальные и клинические исследования БАД серии «Литовит». Том 2. Новосибирск: «ЭКОР-книга»; ЗАО НПФ «НОВЬ»; 2011. 175 с.
200. Kraljević Pavelić S., Saftić Martinović L., Simović Medica J., Žuvić M., Perdija Ž., Krpan D., Eisenwagen S., Orct T., Pavelić K. Clinical Evaluation of a Defined Zeolite-Clinoptilolite Supplementation Effect on the Selected Blood Parameters of Patients. *Frontiers in Medicine*. 2022;9:851782. DOI: 10.3389/fmed.2022.851782.

REFERENCES

1. Moshoeshoe M., Nadiye-Tabbiruka M. S., Obuseng V. A. Review of the Chemistry, Structure, Properties and Applications of Zeolites. *American Journal of Materials Science*. 2017;7:196–221.
2. Furukawa H., Cordova K. E., O'Keeffe M., Yaghi O. M. The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks. *Science*. 2013;341(6149):1230444. DOI: 10.1126/science.1230444.
3. Tanaka S., Tanaka Y. A. Simple Step toward Enhancing Hydrothermal Stability of ZIF-8. *ACS Omega*. 2019;4(22):19905–19912. DOI: 10.1021/acsomega.9b02812.
4. Kermanian M., Nadri S., Mohammadi P., Iravani S., Ahmadi N., Alinezhad V., Shokrgozar M.-A., Haddad M., Mostafavi E., Maleki A. Zeolitic imidazolate frameworks: From bactericidal properties to tissue regeneration. *Journal of Controlled Release*. 2023;359:326–346. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.06.002.
5. Bacakova L., Vandrovcova M., Kopova I., Jirka I. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. *Biomaterials science*. 2018;6(5)974–989.
6. Yazdi M. K., Zarrintaj P., Hosseiniamoli H., Mashhadzadeh A. H., Saeb M. R., Ramsey J. D., Ganjali M. R., Mozafari M. Zeolites for theranostic applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(28):5992–6012. DOI: 10.1039/d0tb00719f.
7. Cadar O., Senila M., Hoaghia M.-A., Scurtu D., Miu I., Levei E. A. Effects of Thermal Treatment on Natural Clinoptilolite-Rich Zeolite Behavior in Simulated Biological Fluids. *Molecules*. 2020;25(11):2570. DOI: 10.3390/molecules25112570.
8. Mastinu A., Kumar A., Maccarinelli G., Bonini S. A., Premoli M., Aria F., Gianoncelli A., Memo M. Zeolite clinoptilolite: Therapeutic virtues of an ancient mineral. *Molecules*. 2019;24(8)1517. DOI: 10.3390/molecules24081517.
9. Li L. J., Chu C.-H., Yu O. Y. Application of Zeolites and Zeolitic Imidazolate Frameworks in Dentistry – A Narrative Review. *Nanomaterials*. 2023;13(22):2973. DOI: 10.3390/nano13222973.
10. Serykh A. I. Formation, nature and physicochemical properties of cationic centers in catalytic systems based on high-silica zeolites. [Dissertation.] Moscow; 2014. 47 p. Available at: https://www.dissercat.com/content/formirovanie-priroda-i-fiziko-khimicheskie-svoistva-kationnykh-tsentrov-v-kataliticheskikh-s. Accessed: 30.08.2024. (In Russ.)
11. Noviello M., Gattullo C. E., Faccia M., Paradiso V. M., Gambacorta G. Application of natural and synthetic zeolites in the oenological field. *Food Research International*. 2021;150:110737.
12. Pérez-Botella E., Valencia S., Rey F. Zeolites in Adsorption Processes: State of the Art and Future Prospects. *Chemical Reviews*. 2022;122(24):17647–17695. DOI: 10.1021/acs.chemrev.2c00140.
13. Wan Y., Xu W., Ren X., Wang Y., Dong B., Wang L. Microporous frameworks as promising platforms for antibacterial strategies against oral diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:628. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00628.
14. Cheong Y.-W., Wong K.-L., Ooi B. S., Ling T. C., Khoerunnisa F., Ng E.-P. Effects of synthesis parameters on crystallization behavior of K-MER zeolite and its morphological properties on catalytic cyanoethylation reaction. *Crystals*. 2020;10(2):64. DOI: 10.3390/cryst10020064.
15. Jiang N., Shang R., Heijman S. G. J., Rietveld L. C. High-silica zeolites for adsorption of organic micro-pollutants in water treatment: A review. *Water Research*. 2018;144:145–161. DOI: 10.1016/j.watres.2018.07.017.
16. Abdulmalek K. H., Morozova N. N., Murtazin N. F. Study of phase-mineral composition of zeolite rocks by X-ray phase analysis. *News of the Kazan State University of Architecture and Engineering*. 2019;2(48):219–228. (In Russ.)
17. Kulpina Yu. N., Prokofiev V. Yu., Gordina N. E., Khmylova O. E., Petukhova N. V., Gazakhova S. I. Use of IR spectroscopy to study the structure of low-modulus zeolites. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya*. 2017;60(5):44–50. (In Russ.)
18. Patel J. P., Brook M. S., Kah M., Hamilton A. Global geological occurrence and character of the carcinogenic zeolite mineral, erionite: A review. *Frontiers in Chemistry*. 2022;10:1066565. DOI: 10.3389/fchem.2022.1066565.
19. Cangiotti M., Salucci S., Battistelli M., Falcieri E., Mattioli M., Giordani M., Ottaviani M. F. EPR, TEM and cell viability study of asbestiform zeolite fibers in cell media. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018;161:147–155. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.10.045.
20. Cangiotti M., Battistelli M., Salucci S., Falcieri E., Mattioli M., Giordani M., Ottaviani M. F. Electron paramagnetic resonance and transmission electron microscopy study of the interactions between asbestiform zeolite fibers and model membranes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2017;80(3):171–187. DOI: 10.1080/15287394.2016.1275901.

21. Ballirano P., Pacella A., Cremisini C., Nardi E., Fantauzzi M., Atzei D., Rossi A., Cametti G. Fe (II) segregation at a specific crystallographic site of fibrous erionite: A first step toward the understanding of the mechanisms inducing its carcinogenicity. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2015;211:49–63.
22. Bloise A., Barca D., Gualtieri A. F., Pollastri S., Belluso E. Trace elements in hazardous mineral fibres. *Environmental Pollution*. 2016;216:314–323. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.06.007.
23. Elizalde-González M. P., Mattusch J., Wennrich R., Morgenstern P. Uptake of arsenite and arsenate by clinoptilolite-rich tuffs. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2001;46(2–3):277–286.
24. Beaucham C., King B., Feldmann K., Harper M., Dozier A. Assessing occupational erionite and respirable crystalline silica exposure among outdoor workers in Wyoming, South Dakota, and Montana. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2018;15(6):455–465. DOI: 10.1080/15459624.2018.1447116.
25. Giordani M., Mattioli M., Ballirano P., Pacella A., Cenni M., Boscardin M., Valentini L. Geological occurrence, mineralogical characterization, and risk assessment of potentially carcinogenic erionite in Italy. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2017;20(2):81–103. DOI: 10.1080/10937404.2016.1263586.
26. Pacella A., Ballirano P., Cametti G. Quantitative chemical analysis of erionite fibres using a micro-analytical SEM-EDX method. *European Journal of Mineralogy*. 2016;28(2):257–264. DOI: 10.1127/ejm/2015/0027-2497.
27. Croce A., Musa M., Allegrina M., Rinaudo C., Baris Y. I., Dogan A. U., Carbone M. Micro-Raman spectroscopy identifies crocidolite and erionite fibers in tissue sections. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2013;44(10):1440–1445.
28. Furukawa H., Cordova K. E., O'Keeffe M., Yaghi O. M. The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks. *Science*. 2013;341(6149):1230444. DOI: 10.1126/science.1230444.
29. Banerjee R., Phan A., Wang B., Knobler C., Furukawa H., O'Keeffe M., Yaghi O. M. High-throughput synthesis of zeolitic imidazolate frameworks and application to CO_2 capture. *Science*. 2008;319(5865):939–943.
30. Moggach S. A., Bennett T. D., Cheetham A. K. The effect of pressure on ZIF-8: increasing porepressure and the formation of a high-pressure phase at 1.47 GPa. *Angewandte Chemie*. 2009;121(38):7221–7223.
31. Fairen-Jimenez D., Moggach S. A., Wharmby M. T., Wright P.A., Parsons S., Düren T. Opening the gate: framework flexibility in ZIF-8 explored by experiments and simulations. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(23):8900–8902. DOI: 10.1021/ja202154j.
32. Sameni M., Moradbeigi P., Hosseini S., Ghaderian S. M. H., Jajarmi V., Miladipour A. H., Basati H., Abbasi M., Salehi M. ZIF-8 Nanoparticle: A Valuable Tool for Improving Gene Delivery in Sperm-Mediated Gene Transfer. *Biological Procedures Online*. 2024;26:4. DOI: 10.1186/s12575-024-00229-2.
33. Zhou L., Li N., Owens G., Chen Z. Simultaneous removal of mixed contaminants, copper and norfloxacin, from aqueous solution by ZIF-8. *Chemical Engineering Journal*. 2019;362:628–637. DOI: 10.1016/j.cej.2019.01.068.
34. de Moura Ferraz L. R., Gonçalves Alves Tabosa A. É., Souza da Silva Nascimento D. D., Silva Ferreira A., de Albuquerque Wanderley Sales V., Rodrigues Silva J. Y., Alves Júnior S., Araújo Rolim L., de Souza Pereira J. J., Rolim-Neto P. J. ZIF-8 as a promising drug delivery system for benznidazole: development, characterization, in vitro dialysis release and cytotoxicity. *Scientific Reports*. 2020;10:16815. DOI: 10.1038/s41598-020-73848-w.
35. Wallbridge S. P., Archer S., Elsegood M. R. J., Wagner J. L., Christie J. K., Dann S. E. An investigation into the adsorption mechanism of *n*-butanol by ZIF-8: a combined experimental and *ab initio* molecular dynamics approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2023;25:19911–19922.
36. Butova V. V., Polyakov V. A., Bulanova, Soldatov M. A., Yahia I. S., Zahran H. Y., Abd El-Rehim A. F., Garni H. E., Aboraia A. M., Soldatov A. V. MW synthesis of ZIF-65 with a hierarchical porous structure. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2020;293:109685.
37. Butova V. V., Budnik A. P., Bulanova E. A., Soldatov A. V. New microwave-assisted synthesis of ZIF-8. *Mendeleev Communications*. 2016;26(1):43–44.
38. Cravillon J., Schröder C.A., Bux H., Rothkirch A., Caro J., Wiebcke M. Formate modulated solvothermal synthesis of ZIF-8 investigated using time-resolved *in situ* X-ray diffraction and scanning electron microscopy. *CrystEngComm*. 2012;14(2):492–498.
39. Jung B. K., Jun J. W., Hasan Z., Jhung S. H. Adsorptive removal of *p*-arsanilic acid from water using mesoporous zeolitic imidazolate framework-8. *Chemical Engineering Journal*. 2015;267:9–15.
40. Poryvaev A. S. Study of ZIF-8 MOCP by ESR spectroscopy using an encapsulated spin probe. [Dissertation.] Novosibirsk; 2021. 139 p. Available at: https://www.dissercat.com/content/issledovanie-mokp-zif-8-metodom-epr-spektroskopii-s-ispolzovaniem-inkapsulirovannogo-spinovo. Accessed: 30.08.2024. (In Russ.)
41. Cerri G., Farina M., Brundu A., Daković A., Giunchedi P., Gavini E., Rassu G. Natural zeolites for pharmaceutical formulations: Preparation and evaluation of a clinoptilolite-based material. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2016;223:58–67.
42. Vinaches P., Bernardo-Gusmão K., Pergher S. B. C. An Introduction to Zeolite Synthesis Using Imidazolium-Based Cations as Organic Structure-Directing Agents. *Molecules*. 2017;22:1307.
43. Hao J., Milašin I.S., Eken Z. B., Mravak-Stipetic M., Pavelić K., Ozer F. Effects of Zeolite as a Drug Delivery System on Cancer Therapy: A Systematic Review. *Molecules*. 2021;26:6196.
44. Anthony J. L., Davis M. E. Assembly of Zeolites and Crystalline Molecular Sieves. In: Adachi M., Lockwood D. J., editors. Self-Organized Nanoscale Materials. New York: Springer Science; 2006. P. 159–185.
45. Souza I. M. S., García-Villén F., Viseras C., Perger S. B. C. Zeolites as Ingredients of Medicinal Products. *Pharmaceutics*. 2023;15(5):1352. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051352.
46. Datt A., Ndiege N., Larsen S. C. Development of porous nanomaterials for applications in drug delivery and imaging. In: Nagarajan R., editor. Nanomaterials for Biomedicine. Washington: American Chemical Society; 2012. P. 239–258.
47. Kazantseva L. K., Seretkin Yu. V. Method of obtaining NaY Zeolite. Patent RUS No. RU2476378C1. 07/25/2011. Available at: https://patents.google.com/patent/RU2476378C1/ru. Accessed: 30.08.2024. (In Russ.)

48. Aripova M. H., Kadirov O. S., Tillaev S. U., Khudainazarov Zh. O. U., Fayzieva F. M., Ruzieva F. O. Obtaining low-modulus synthetic zeolites based on local raw materials. *Universum: chemistry and biology*. 2022;92(2–1):65–70. (In Russ.)
49. Prokofiev V. Yu., Gordina N. E., Konstantinova E. M., Khramtsova A. P. Method for producing synthetic granulated zeolite NaP. Patent RUS No. 2652210. 10.07.2017. (In Russ.)
50. Sakhautdinov R. A., Sokolova V. V. About the synthesis of zeolites. *Science leader*. 2022;67(22):46–49. (In Russ.)
51. Gordina N. E., Prokofiev V. Yu. Preparation of synthetic LTA zeolite from mechanically activated mixtures of metakaolin. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya*. 2013;56(10):79–84. (In Russ.)
52. Zaarour M., Dong B., Naydenova I., Retoux R., Mintova S. Progress in zeolite synthesis promotes advanced applications. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2014;189:11–21.
53. Corma A., Garcia H. Supramolecular host-guest systems in zeolites prepared by ship-in-a-bottle synthesis. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2004;2004(6):1143–1164.
54. Cundy C. S., Cox P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: history and development from the earliest days to the present time. *Chemical reviews*. 2003;103(3):663–702.
55. Kumar S., Wang Z., Penn R. L., Tsapatsis M. A structural resolution cryo-TEM study of the early stages of MFI growth. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(51):17284–17286. DOI: 10.1021/ja8063167.
56. Derakhshankhah H., Jafari S., Sarvari S., Barzegari E., Moakedi F., Ghorbani M., Varnamkhasti B. S., Jaymand M., Izadi Z., Tayebi L. Biomedical applications of zeolitic nanoparticles, with an emphasis on medical interventions. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:363–386. DOI: 10.2147/IJN.S234573.
57. Farías T., de Ménorval L. C., Zajac J., Rivera A. Adsolubilization of drugs onto natural clinoptilolite modified by adsorption of cationic surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;76(2):421–426.
58. Nezamzadeh-Ejhieh A., Tavakoli-Ghinani S. Effect of a nano-sized natural clinoptilolite modified by the hexadecyltrimethyl ammonium surfactant on cephalexin drug delivery. *Comptes Rendus Chimie*. 2014;17(1):49–61. DOI: 10.1016/j.crci.2013.07.009.
59. Lee Y. R., Jang M. S., Cho H. Y., Kwon H. J., Kim S., Ahn W. S. ZIF-8: a comparison of synthesis methods. *Chemical Engineering Journal*. 2015;271:276–280.
60. Wang Q., Sun Y., Li S., Zhang P., Yao Q. Synthesis and modification of ZIF-8 and its application in drug delivery and tumor therapy. *RSC Advances*. 2020;10(62):37600–37620. DOI: 10.1039/d0ra07950b.
61. Chen W., Du L., Wu C. Hydrothermal synthesis of MOFs. In: Yang J., Yang Y.-W. Metal-Organic frameworks for Biomedical Applications. Amsterdam: Elsevier; 2020. P. 141–57.
62. Thomas-Hillman I., Laybourn A., Dodds C., Kingman S. W. Realising the environmental benefits of metal–organic frameworks: recent advances in microwave synthesis. *Journal of Materials Chemistry A*. 2018;6(25):11564–11581.
63. Deiko G. S., Kravtsov L. A., Davshan N. A., Isaeva V. I., Kustov L. M. Sorption of lead ions on composites based on zeolite imidazolate frameworks ZIF-8 and ZIF-67 and calcium alginate. *Russian Journal of Physical Chemistry*. 2022;96(8):1180–1187. (In Russ.)
64. Park K. S., Ni Z., Côté A. P., Choi J. Y., Huang R., Uribe-Romo F. J., Chae H. K., O'Keeffe M., Yaghi O. M. Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(27):10186–10191. DOI: 10.1073/pnas.0602439103.
65. Chen W., Sun L., Li Q., Huo L., Zhao H. Defect-rich MoS_2/r-GO hybrid via microwave-assisted solvothermal process for efficient electrocatalytic hydrogen evolution. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2020;45(3):22459–22468. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2020.06.114.
66. Krasnikov A. A., Lvova E. S., Kurzina I. A. Synthesis and study of physical-chemical properties of zeolite imidazolate frameworks. *Tomsk State University Journal of Chemistry*. 2020;19:37–44. (In Russ.)
67. Wijaya C. J., Ismadji S., Aparamarta H. W., Gunawan S. Facile and Green Synthesis of Starfruit-Like ZIF-L, and Its Optimization Study. *Molecules*. 2021;26(15):4416. DOI: 10.3390/molecules26154416.
68. Nurain A. S. Z., Wan S. W. N., Norhaniza Y., Mohd Y. M. Z., Rafidah H., Fauzi I. A. Synthesis of zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) using different solvents for lead and cadmium adsorption. *Applied Nanoscience*. 2023;13(6):4005–4019.
69. Shahsavari M., Mohammadzadeh Jahani P., Sheikhshoaie I., Tajik S., Aghaei Afshar A., Askari M. B., Salarizadeh P., Di Bartolomeo A., Beitollahi H. Green Synthesis of Zeolitic Imidazolate Frameworks: A Review of Their Characterization and Industrial and Medical Applications. *Materials*. 2022;15(2):447.
70. Sun B., He Y., Peng R., Chu S., Zuo J. Air-flow Impacting for Continuous, Highly Efficient, Large-Scale Mechanochemical Synthesis: a Proof-Of-Concept Study. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2016;4:2122–2128.
71. Gugin N. Y., Villajos J. A., Dautain O., Maiwald M., Emmerling F. Optimizing the Green Synthesis of ZIF-8 by Reactive Extrusion Using *In Situ* Raman Spectroscopy. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2023;11(13):5175–5183.
72. Stock N., Biswas S. Synthesis of metal-organic frameworks (MOFs): routes to various MOF topologies, morphologies, and composites. *Chemical Reviews*. 2012;112(2):933–969. DOI: 10.1021/cr200304e.
73. Cho H.-Y., Kim J., Kim S.-N., Ahn W.-S. High yield 1-L scale synthesis of ZIF-8 via a sonochemical route. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013;169:180–184. DOI: 10.1016/j.micromeso.2012.11.012.
74. Haider J., Shahzadi A., Akbar M. U., Hafeez I., Shahzadi I., Khalid A., Ashfaq A., Ahmad S. O. A., Dilpazir S., Imran M. Ikram M., Ali G., Khan M., Khan Q., Maqbool M. A review of synthesis, fabrication, and emerging biomedical applications of metal-organic frameworks. *Biomaterials Advances*. 2022;140:213049. DOI: 10.1016/j.bioadv.2022.213049.
75. Kukkar P., Kim K.-H., Kukkar D., Singh P. Recent advances in the synthesis techniques for zeolitic imidazolate frameworks and their sensing applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 2021;446:214109.
76. Makarov A. V., Sinegovskaya L. M., Korchevin N. A. Physico-chemical studies of the adsorption process of heavy metal ions on modified aluminosilicates. *iPolytech Journal*. 2013;73(2):147–154. (In Russ.)
77. Lukhneva O. L., Chikin A. Yu., Proidakova O. A. The nature of the interaction of metal ions with mineral sorbents in the process of post-treatment of wastewater from galvanic shops. *iPolytech Journal*. 2010;45(5):194–197. (In Russ.)

78. Deyko G. S., Kravtsov L. A., Davshan N. A., Isaeva V. I., Kustov L. M. Sorption of lead ions on ZIF-8 and ZIF-67 zeolite imidazolate frameworks and calcium alginate composites. *Russian Journal of Physical Chemistry*. 2022;96(8):1728–1735.
79. Jung B. K., Jun J. W., Hasan Z., Jhung S. H. Adsorptive removal of *p*-arsanilic acid from water using mesoporous zeolitic imidazolate framework-8. *Chemical Engineering Journal*. 2015;267:9–15.
80. Haghi A., Raissi H., Hashemzadeh H., Farzad F. Designing a high-performance smart drug delivery system for the synergetic co-absorption of DOX and EGCG on ZIF-8. *RSC Advances*. 2020;10(72):44533–44544.
81. Manousi N., Giannakoudakis D. A., Rosenberg E., Zachariadis G. A. Extraction of Metal Ions with Metal-Organic Frameworks. *Molecules*. 2019;24(24):4605.
82. Deikoa G. S., Kravtsova L. A., Davshana N. A., Isaeva V. I., Kustov L. M. Sorption of lead ions on composites based on zeolite imidazolate frameworks ZIF-8 and ZIF-67 and calcium alginate. *Russian Journal of Physical Chemistry*. 2022;96(8):1180–1187. (In Russ.)
83. Zhuang J., Kuo C.-H., Chou L.-Y., Liu D.-Y., Weerapana E., Tsung C.-K. Optimized metal-organic-framework nanospheres for drug delivery: evaluation of small-molecule encapsulation. *ACS Nano*. 2014;8(3):2812–2819. DOI: 10.1021/nn406590q.
84. Wu Q., Niu M., Chen X., Tan L., Fu C., Ren X., Ren J., Li L., Xu K., Zhong H. Biocompatible and biodegradable zeolitic imidazolate framework/polydopamine nanocarriers for dual stimulus triggered tumor thermo-chemotherapy. *Biomaterials*. 2018;162:132–143.
85. Chen B., Yang Z. Zeolitic imidazolate framework materials: Recent progress in synthesis and applications. *Journal of Materials Chemistry A*. 2014;2:16811–16831.
86. Xie R., Yang P., Peng S., Cao Y., Yao X., Guo S., Yang W. A phosphorylcholine-based zwitterionic copolymer coated ZIF-8 nanodrug with a long circulation time and charged conversion for enhanced chemotherapy. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8:6128–6138.
87. Deria P., Mondloch J. E., Karagiaridi O., Bury W., Hupp J. T., Farha O. K. Beyond post-synthesis modification: evolution of metal–organic frameworks via building block replacement. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(16):5896–5912.
88. Abdelhamid H. N. Zeolitic Imidazolate Frameworks (ZIF-8) for Biomedical Applications: A Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2021;28(34):7023–7075. DOI: 10.2174/0929867328666210608143703.
89. Keskin S., Kızılel S. Biomedical applications of metal organic frameworks. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2011;50(4):1799–1812.
90. Singh R., Prasad A., Kumar B., Kumari S., Sahu R. K., Hedau S. T. Potential of dual drug delivery systems: MOF as hybrid nano-carrier for dual drug delivery in cancer treatment. *ChemistrySelect*. 2022;7(36):e202201288.
91. Dyachkova T. Yu., Makarova I. A., Vaganova E. S., Davydova O. A., Mosunova T. V. Sorption purification of solutions from heavy metal ions using zeolite modified by carbon nanotubes. *Bulletin of the South Ural State University. Series. Chemistry.* 2019;11(2):16–27. (In Russ.)
92. Makarov A. V. Adsorption of heavy metals by modified zeolites. *Modern technologies and scientific and technical progress*. 2013;1:25. (In Russ.)
93. Manousi N., Giannakoudakis D. A., Rosenberg E., Zachariadis G. A. Extraction of metal ions with metal–organic frameworks. *Molecules*. 2019;24(24):4605.
94. Hao J., Stavljenić Milašin I., Batu Eken Z., Mravak-Stipetic M., Pavelić K., Ozer F. Effects of Zeolite as a Drug Delivery System on Cancer Therapy: A Systematic Review. *Molecules*. 2021;26(20):6196. DOI: 10.3390/molecules26206196.
95. Saravanan M., Kumar V., Padmanabhan T. V., Banu F. Viscoelastic properties and antimicrobial effects of soft liners with silver zeolite in complete dental prosthesis wearers: an in vivo study. *The International Journal of Prosthodontics*. 2015;28(3):265–269. DOI: 10.11607/ijp.3740.
96. Pourhajibagher M., Bahador A. Enhanced reduction of polymicrobial biofilms on the orthodontic brackets and enamel surface remineralization using zeolite-zinc oxide nanoparticles-based antimicrobial photodynamic therapy. *BMC Microbiol*. 2021;21(1):273. DOI: 10.1186/s12866-021-02324-w.
97. Hajipour M. J., Fromm K. M., Ashkarran A. A., Jimenez de Aberasturi D., de Larramendi I. R., Rojo T., Serpooshan V., Parak W. J., Mahmoudi M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. 2012;30(10):499–511. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
98. Alswat A. A., Ahmad M. B., Saleh T. A., Hussein M. Z. B., Ibrahim N. A. Effect of zinc oxide amounts on the properties and antibacterial activities of zeolite/zinc oxide nanocomposite. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2016;68:505–511. DOI: 10.1016/j.msec.2016.6.028.
99. Alswat A. A., Ahmad M. B., Saleh T. A. Preparation and characterization of zeolite\zinc oxide-copper oxide nanocomposite: antibacterial activities. *Colloid and Interface Science Communications*. 2017;16:19–24.
100. Kihara T., Zhang Y., Hu Y., Mao Q., Tang Y, Miyake J. Effect of composition, morphology and size of nanozeolite on its in vitro cytotoxicity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011;111(6):725–730. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.01.017.
101. Yang F., Wen X., Ke Q.-F., Xie X.-T., Guo Y.-P. pH-responsive mesoporous ZSM-5 zeolites/chitosan core-shell nanodisks loaded with doxorubicin against osteosarcoma. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;85:142–153. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.024.
102. Lei Z., Tang Q., Ju Y., Lin Y., Bai X., Luo H., Tong Z. Block copolymer@ZIF-8 nanocomposites as a pH-responsive multi-steps release system for controlled drug delivery. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2020;31(6):695–711. DOI: 10.1080/09205063.2020.1713451.
103. Hao J., Stavljenić Milašin I., Batu Eken Z., Mravak-Stipetic M., Pavelić K., Ozer F. Effects of Zeolite as a Drug Delivery System on Cancer Therapy: A Systematic Review. *Molecules*. 2021;26:6196. DOI: 10.3390/molecules26206196.
104. Tan C., Wu J., Wen Z. Doxorubicin-Loaded MnO_2@Zeolitic Imidazolate Framework-8 Nanoparticles as a Chemophotothermal System for Lung Cancer Therapy. *ACS Omega*. 2021;6(20):12977–12983. DOI: 10.1021/acsomega.0c05922.
105. Sharsheeva A., Iglin, V. A., Nesterov P. V., Kuchur O. A., Garifullina E., Hey-Hawkins E., Ulasevich S. A., Skorb E. V., Vinogradov A. V., Morozov M. I. Light-controllable systems based on TiO(2)-ZIF-8 composites for targeted drug release: Communicating with tumour cells. *Current Gene Therapy*. 2019;7:6810–6821.
106. Kang Y., Yu X., Fan X., Aodenggerile, Zhao S., Tu C., Yan Z., Wang R., Li W., Qiu H. Tetramodal Imaging and Synergistic Cancer Radio-Chemotherapy Enabled by Multiple Component-Encapsulated Zeolitic Imidazolate Frameworks. *ACS Nano*. 2020;14:4336–4351.

107. Li X., Hou S., Chen J., He C.-E., Gao Y.-E., Lu Y., Jia D., Ma X., Xue P., Kang Y., Xu Z. Engineering silk sericin decorated zeolitic imidazolate framework-8 nanoplatform to enhance chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021;200:111594. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.111594.
108. Guo H., Mukwaya V., Wu D., Xiong S., Dou H. Acid-Responsive Decomposable Nanomedicine Based on Zeolitic Imidazolate Frameworks for Near-Infrared Fluorescence Imaging/Chemotherapy Combined Tumor Theranostics. *Pharmaceutics*. 2024;16(6):823. DOI: 10.3390/pharmaceutics16060823.
109. Adhikari C., Das A., Chakraborty A. Zeolitic imidazole framework (ZIF) nanospheres for easy encapsulation and controlled release of an anticancer drug doxorubicin under different external stimuli: a way toward smart drug delivery system. Mol. *Pharmaceutics*. 2015;12:3158–3166.
110. Wen X., Yang F., Ke Q.-F., Xie X.-T., Guo Y.-P. Hollow mesoporous ZSM-5 zeolite/chitosan ellipsoids loaded with doxorubicin as pH-responsive drug delivery systems against osteosarcoma. *Journal of Materials Chemistry B*. 2017;5:7866–7875.
111. Khatamian M., Divband B., Farahmand-Zahed F. Synthesis and characterization of Zinc (II)-loaded Zeolite/Graphene oxide nanocomposite as a new drug carrier. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*. 2016;66:251–258.
112. Abasian P., Radmansouri M., Habibi Jouybari M., Ghasemi M. V., Mohammadi A., Irani M., Jazi F. S. Incorporation of magnetic NaX zeolite/DOX into the PLA/chitosan nanofibers for sustained release of doxorubicin against carcinoma cells death in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;121:398–406.
113. Zheng L., Zhang Y., Lin H., Kang S., Li Y., Sun D., Chen M., Wang Z., Jiao Z., Wang Y. Ultrasound and Near-Infrared Light Dual-Triggered Upconversion Zeolite-Based Nanocomposite for Hyperthermia-Enhanced Multimodal Melanoma Therapy via a Precise Apoptotic Mechanism. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020;12:32420–32431.
114. deKrafft K. E., Xie Z., Cao G., Tran S., Ma L., Zhou O. Z., Lin W. Iodinated Nanoscale Coordination Polymers as Potential Contrast Agents for Computed Tomography. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48(52):9901–9904. DOI: 10.1002/anie.200904958.
115. Yan L., Chen X., Wang Z., Zhang X., Zhu X., Zhou M., Chen W., Huang L., Roy V. A. L., Yu P. K. N. Zhu G., Zhang W. Size Controllable and Surface Tunable Zeolitic Imidazolate Framework-8-Poly(acrylic acid sodium salt) Nanocomposites for pH Responsive Drug Release and Enhanced in Vivo Cancer Treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017;9(38):32990–33000.
116. Duan D., Liu H., Xu M., Chen M., Han Y., Shi Y., Liu Z. Size-Controlled Synthesis of Drug-Loaded Zeolitic Imidazolate Framework in Aqueous Solution and Size Effect on Their Cancer Theranostics in Vivo. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018;10(49):42165–42174. DOI: 10.1021/acsami.8b17660.
117. Longley D. B., Harkin D. P., Johnston P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2013;3(5):330–338. DOI: 10.1038/nrc1074.
118. Cao Y., Jiang Z., Li Y., Wang Y., Yang Y., Akakuru O. U., Li J., Wu A. Tandem post-synthetic modification of a zeolitic imidazolate framework for CXCR4-overexpressed esophageal squamous cell cancer imaging and therapy. *Nanoscale*. 2020;12:12779-12789.
119. Jiang Z., Li Y., Wei Z., Yuan B., Wang Y., Akakuru O. U., Li Y., Li J., Wu A. Pressure-induced amorphous zeolitic imidazole frameworks with reduced toxicity and increased tumor accumulation improves therapeutic efficacy *In vivo*. *Bioactive Materials*. 2021;6(3):740–748.
120. Pandey A., Kulkarni S., Vincent A. P., Nannuri S. H., George S. D., Mutalik S. Hyaluronic acid-drug conjugate modified core-shell MOFs as pH responsive nanoplatform for multimodal therapy of glioblastoma. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;588:119735. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119735.
121. Xiao X., Liang S., Zhao Y., Huang D., Xing B., Cheng Z., Lin J. Core-shell structured 5-FU-ZIF-90-ZnO as a biodegradable nanoplatform for synergistic cancer therapy. *Nanoscale*. 2020;12:3846–3854.
122. Vilaça N., Amorim R., Machado A. F., Parpot P., Pereira M. F., Sardo M., Rocha J., Fonseca A. M., Neves I. C., Baltazar F. Potentiation of 5-fluorouracil encapsulated in zeolites as drug delivery systems for in vitro models of colorectal carcinoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;112:237–244.
123. Sagir T., Huysal M., Durmus Z., Kurt B. Z., Senel M., Isık S. Preparation and in vitro evaluation of 5-fluorouracil loaded magnetite-zeolite nanocomposite (5-FU-MZNC) for cancer drug delivery applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;77:182–190.
124. Abd-Elsatar A. G., Farag M. M., Youssef H. F., Salih S. A., Mounier M. M., El-Meliegy E. Different zeolite systems for colon cancer therapy: Monitoring of ion release, cytotoxicity and drug release behavior. *Progress in Biomaterials*. 2019;8(2):101–113. DOI: 10.1007/s40204-019-0115-8.
125. Imran M., Ullah A., Saeed F., Nadeem M., Arshad M .U., Suleria H. Cucurmin anticancer, & antitumor perspectives: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58:1271–1293.
126. Zheng M., Liu S., Guan X., Xie Z. One-Step Synthesis of Nanoscale Zeolitic Imidazolate Frameworks with High Curcumin Loading for Treatment of Cervical Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015;7:22181–22187.
127. Xing Y., Jiang Z., Akakuru O. U., He Y., Li A., Li J., Wu A. Mitochondria-targeting zeolitic imidazole frameworks to overcome platinum-resistant ovarian cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;189:110837.
128. Amorim R., Vilaça N., Martinho O., Reis R. M., Sardo M., Rocha J., Fonseca A. M., Baltazar F., Neves I. C. Zeolite Structures Loading with an Anticancer Compound as Drug Delivery Systems. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2012;116:25642–25650.
129. Kannen H., Nomura S., Hazama H., Kaneda Y., Fujino T., Awazu K. Enhancement of Ionization Efficiency Using Zeolite in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Multiple Drugs in Cancer Cells (Mass Spectrometry of Multiple Drugs in Cells Using Zeolite). *Mass Spectrometry*. 2020;9(1):A0091. DOI: 10.5702/massspectrometry.A0091.
130. Martinho O., Vilaça N., Castro P. J., Amorim R., Fonseca A. M., Baltazar F., Reis R. M., Neves I. C. In vitro and in vivo studies of temozolomide loading in zeolite structures as drug delivery systems for glioblastoma. *RSC Advances*. 2015;5:28219–28227.
131. Khojaewa V., Lopatin O., Zelenikhin P., Ilinskaya O. Zeolites as Carriers of Antitumor Ribonuclease Binase. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:442. DOI: 10.3389/fphar.2019.00442.

132. Souza I. M. S., García-Villén F., Viseras C., Pergher S. B. C. Zeolites as Ingredients of Medicinal Products. *Pharmaceutics*. 2023;15(5):1352. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051352.
133. Guo Y. P., Long T., Song Z. F., Zhu Z. A. Hydrothermal Fabrication of ZSM-5 Zeolites: Biocompatibility, Drug Delivery Property, and Bactericidal Property. *Journal of Biomedical Materials Research – Part B Applied Biomaterials*. 2014;102:583–591.
134. Yassue-Cordeiro P. H., Zandonai C. H., Genesi B. P., Lopes P. S., Sanchez-Lopez E., Garcia M. L., Fernandes-Machado N. R. C., Severino P., Souto E. B., da Silva C. F. Development of Chitosan/Silver Sulfadiazine/Zeolite Composite Films for Wound Dressing. *Pharmaceutics*. 2019;11:535.
135. Szegedi Á., Popova M., Trendafilova I., Trif L., Mihály J., Makk J., Mavrodinova V. Bicomponent Drug Formulation for Simultaneous Release of Ag and Sulfadiazine Supported on Nanosized Zeolite Beta. *Nano-Structures & Nano-Objects*. 2020;24:100562.
136. Moradi S., Barati A., Tonelli A. E., Hamedi H. Effect of Clinoptilolite on Structure and Drug Release Behavior of Chitosan/Thyme Oil Γ-Cyclodextrin Inclusion Compound Hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*. 2021;138:49822.
137. Kocaaga B., Kurkcuoglu O., Tatlier M., Batirel S., Guner F. S. Low-Methoxyl Pectin–Zeolite Hydrogels Controlling Drug Release Promote In Vitro Wound Healing. *Journal of Applied Polymer Science*. 2019;136:47640.
138. Kocaaga B., Kurkcuoglu O., Tatlier M., Dinler-Doganay G., Batirel S., Güner, F. S. Pectin–Zeolite-Based Wound Dressings with Controlled Albumin Release. *Polymers*. 2022;14:460.
139. Youssefi Azarfam M., Nasirinezhad M., Naeim H., Zarrintaj P., Saeb M. A Green Composite Based on Gelatin/Agarose/Zeolite as a Potential Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Journal of Composites Science*. 2021;5(5):125. DOI: 10.3390/jcs5050125.
140. Wise A. J., Sefy J. S., Barbu E., O'Malley A. J., van der Merwe S. M., Cox P. A. Zero-Order and Prolonged Release of Atenolol from Microporous FAU and BEA Zeolites, and Mesoporous MCM-41: Experimental and Theoretical Investigations. *Journal of Controlled Release*. 2020;327:140–149. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.027.
141. Souza I. M. S., Sainz-Díaz C. I., Viseras C., Pergher S. B. C. Adsorption Capacity Evaluation of Zeolites as Carrier of Isoniazid. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2020;292:109733. DOI: 10.1016/j.micromeso.2019.109733.
142. Souza I. M. S., Borrego-Sánchez A., Sainz-Díaz C. I., Viseras C., Pergher S. B. C. Study of Faujasite Zeolite as a Modified Delivery Carrier for Isoniazid. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;118:111365. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111365.
143. Souza I. M. S., Borrego-Sánchez A., Rigoti E., Sainz-Díaz C. I., Viseras C., Pergher S. B. C. Experimental and Molecular Modelling Study of Beta Zeolite as Drug Delivery System. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2021;321:111152. DOI: 10.1016/j.micromeso.2021.111152.
144. Karavasili C., Kokove L., Kontopoulou I., Eleftheriadis G. K., Bouropoulos N., Fatouros D. G. Dissolution Enhancement of the Poorly Soluble Drug Nifedipine by Co-Spray Drying with Microporous Zeolite Beta. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016;35:91–97.
145. Karavasili C., Amanatiadou E. P., Kontogiannidou E., Eleftheriadis G. K., Bouropoulos N., Pavlidou E., Kontopoulou I., Vizirianakis I. S., Fatouros D. G. Comparison of Different Zeolite Framework Types as Carriers for the Oral Delivery of the Poorly Soluble Drug Indomethacin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;528:76–87.
146. Kontogiannidou E., Karavasili C., Kouskoura M. G., Filippousi M., Van Tendeloo G., Andreadis I. I., Eleftheriadis G. K., Kontopoulou I., Markopoulou C. K., Bouropoulos N. In Vitro and Ex Vivo Assessment of Microporous Faujasite Zeolite (NaX-FAU) as a Carrier for the Oral Delivery of Danazol. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;51:177–184.
147. Yaneva Z., Ivanova D., Popov N. Clinoptilolite Microparticles as Carriers of Catechin-Rich Acacia Catechu Extracts: Microencapsulation and In Vitro Release Study. *Molecules*. 2021;26:1655.
148. Rimoli M. G., Rabaioli M. R., Melisi D., Curcio A., Mondello S., Mirabelli R., Abignente E. Synthetic Zeolites as a New Tool for Drug Delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008;87(1):156–164. DOI: 10.1002/jbm.a.31763.
149. Khodaverdi E., Soleimani H. A., Mohammadpour F., Hadizadeh F. Synthetic Zeolites as Controlled-Release Delivery Systems for Anti-Inflammatory Drugs. *Chemical Biology & Drug Design*. 2016;87:849–857.
150. Khodaverdi E., Honarmandi R., Alibolandi M., Baygi R. R., Hadizadeh F., Zohuri G. Evaluation of synthetic zeolites as oral delivery vehicle for anti-inflammatory drugs. *The Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2014;17(5):337–343.
151. Datt A., Fields D., Larsen S. C. An experimental and computational study of the loading and release of aspirin from zeolite HY. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2012;116(40):21382–21390. DOI: 10.1021/jp3067266.
152. Dyer A., Morgan S., Wells P., Williams C. The Use of Zeolites as Slow Release Anthelmintic Carriers. *Journal of Helminthology*. 2000;74:137–141.
153. Sandomierski M., Zielińska, M., Voelkel, A. Calcium Zeolites as Intelligent Carriers in Controlled Release of Bisphosphonates. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;578:119117.
154. Neolaka Y. A. B., Darmokoesoemo H., Adu A. A., Lawa Y., Naat J., Riwu A. A. P., Bui M. F., Wila E. C., Fahirah M. A., Budiastant T. A. Study of Mordenite Natural Zeolite Type Modified by Cu(II) Cation as an Oral Safe Drug Carrier for Ibuprofen and Meloxicam. *Journal of Molecular Liquids*. 2022;352:118734.
155. Nezamzadeh-Ejhieh A., Tavakoli-Ghinani S. Effect of a Nano-Sized Natural Clinoptilolite Modified by the Hexadecyltrimethyl Ammonium Surfactant on Cephalexin Drug Delivery. *Comptes Rendus Chimie*. 2014;17:49–61.
156. de Gennaro B., Catalanotti L., Cappelletti P., Langella A., Mercurio M., Serri C., Biondi M., Mayol L. Surface Modified Natural Zeolite as a Carrier for Sustained Diclofenac Release: A Preliminary Feasibility Study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;130:101-109.
157. Krajišnik D., Daković A., Malenović A., Kragović M., Milić J. Ibuprofen Sorption and Release by Modified Natural Zeolites as Prospective Drug Carriers. *Clay Minerals*. 2015;50:11–22.
158. Pasquino R., Di Domenico M., Izzo F., Gaudino D., Vanzanella V., Grizzuti N., de Gennaro B. Rheology-Sensitive Response of Zeolite-Supported Anti-Inflammatory Drug Systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2016;146:938–944.

159. Izzo F., Mercurio M., de Gennaro B., Aprea P., Cappelletti P., Daković A., Germinario C., Grifa C., Smiljanic D., Langella A. Surface Modified Natural Zeolites (SMNZs) as Nanocomposite Versatile Materials for Health and Environment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;182:110380.
160. Sandomierski M., Jakubowski M., Ratajczak M., Voelkel A. Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8) modified titanium alloy for controlled release of drugs for osteoporosis. *Scientific Reports*. 2022;12(1):9103. DOI: 10.1038/s41598-022-13187-0.
161. Li Y., Cai Y., Chen T., Bao X. Zeolites: A series of promising biomaterials in bone tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:1066552. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1066552.
162. Aslani Z., Nazemi N., Rajabi N., Kharaziha M., Bakhsheshi-Rad H. R., Kasiri-Asgarani M., Najafinezhad A., Ismail A. F., Sharif S., Berto F. Antibacterial Activity and Cell Responses of Vancomycin-Loaded Alginate Coating on ZSM-5 Scaffold for Bone Tissue Engineering Applications. *Materials*. 2022;15(14):4786. DOI: 10.3390/ma15144786.
163. Chebbi M., Azambre B., Cantrel L., Huvé M., Albiol T. Influence of structural, textural and chemical parameters of silver zeolites on the retention of methyl iodide. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2017;244:137–150.
164. Singh S. Zinc oxide nanoparticles impacts: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2019;29:300–311.
165. Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Kaus N. H. M., Ann L. C., Bakhori S. K. M., Hasan H., Mohamad D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*. 2015;7:219–242.
166. Buchwald Z., Sandomierski M., Voelkel A. Calcium-Rich 13X Zeolite as a Filler with Remineralizing Potential for Dental Composites. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2020;6(7):3843–3854. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.0c00450.
167. Kim H.-J., Son J. S., Kim K.-H., Kwon T.-Y. Antimicrobial Activity of Glass Ionomer Cement Incorporated with Chlorhexidine-Loaded Zeolite Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016;16(2):1450–1453. DOI: 10.1166/jnn.2016.11915.
168. Nikawa H., Yamamoto T., Hamada T., Rahardjo M. B., Murata H., Nakanoda S. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2008;24:350–357. DOI: 10.1111/j.1365-2842.1997.tb00339.x.
169. Çinar Ç., Odabaş M., Gürel M. A., Baldağ I. The effects of incorporation of silver-zeolite on selected properties of mineral trioxide aggregate. *Dental Materials Journal*. 2013;32(6):872–876. DOI: 10.4012/dmj.2012-314.
170. Ghatole K., Patil A., Giriyappa R. H., Singh T. V., Jyotsna S. V., Rairam S. Evaluation of Antibacterial Efficacy of MTA with and without Additives Like Silver Zeolite and Chlorhexidine. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016;10(6):11–14. DOI: 10.7860/JCDR/2016/18014.7913.
171. Bedi R. S., Beving D. E., Zanello L. P., Yan Y. Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(8):3265–3271. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.04.019.
172. Zhang X., Chen J., Pei X., Wang J., Wan Q., Jiang S., Huang C., Pei X. Enhanced Osseointegration of Porous Titanium Modified with Zeolitic Imidazolate Framework-8. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017;9:25171–25183. DOI: 10.1021/acsami.7b07800.
173. Chen J., Zhang X., Huang C., Cai H., Hu S., Wan Q., Pei X., Wang J. Osteogenic activity and antibacterial effect of porous titanium modified with metal-organic framework films. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2016;105:834–846. DOI: 10.1002/jbm.a.35960.
174. Kraljević Pavelić S., Simović Medica J., Gumbarević D., Filošević A., Pržulj N., Pavelić K. Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1350. DOI: 10.3389/fphar.2018.01350.
175. Mastinu A., Kumar A., Maccarinelli G., Bonini S. A., Premoli M., Aria F., Gianoncelli A., Memo M. Zeolite Clinoptilolite: Therapeutic Virtues of an Ancient Mineral. *Molecules*. 2019;24(8):1517. DOI: 10.3390/molecules24081517.
176. Pavelić K., Hadžija M., Bedrica L., Pavelić J., Đikić I., Katić M., Kralj M., Bosnar M. H., Kapitanović S., Poljak-Blaži M., Križanac Š., Stojković R., Jurin M., Subotić B., Čolić M. Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *Journal of Molecular Medicine*. 2001;78:708–720. DOI: 10.1007/s001090000176.
177. Pavelic K., Katic M., Sverko V., Marotti T., Bosnjak B., Balog T., Stojkovic R., Radacic M., Colic M., Poljak-Blazi M. Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic ability. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2002;128(1):37–44. DOI: 10.1007/s00432-001-0301-6.
178. Demirer E., Ghattas C. F., Radwan M. O., Elamin E. M. Clinical and prognostic features of erionite-induced malignant mesothelioma. *Yonsei Medical Journal*. 2015;56(2):311–323. DOI: 10.3349/ymj.2015.56.2.311.
179. Attanoos R. L., Churg A., Galateau-Salle F., Gibbs A. R., Roggli V. L. Malignant Mesothelioma and Its Non-Asbestos Causes. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2018;142(6):753–760. DOI: 10.5858/arpa.2017-0365-RA.
180. Iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: World health organization; 1987. 449 p.
181. Dogan A. U., Baris Y. I., Dogan M., Emri S., Steele I., Elmishad A. G., Carbone M. Genetic predisposition to fiber carcinogenesis causes a mesothelioma epidemic in Turkey. *Cancer Research*. 2006;66(10):5063–5068. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4642.
182. Patel J. P., Brook M. S. Erionite asbestiform fibres and health risk in Aotearoa/New Zealand: A research note. *New Zealand Geographer*. 2021;77(2):123–129.
183. Fach E., Kristovich R., Long J. F., Waldman W. J., Dutta P. K., Williams M. V. The effect of iron on the biological activities of erionite and mordenite. *Environment International*. 2003;29(4):451–458. DOI: 10.1016/S0160-4120(02)00193-9.
184. Dogan A. U., Dogan M. Re-evaluation and re-classification of erionite series minerals. *Environmental Geochemistry and Health*. 2008;30(4):355–366. DOI: 10.1007/s10653-008-9163-z.
185. Kshirsagar P., Miranda-Avilés R., Loza-Aguirre I., Li Y., Alquiza M. J. P. Y., Moncada-Sánchez C. D., Hernández-Jiménez A. Erionite series minerals in felsic volcanic rocks of southern Mesa Central, Guanajuato, Mexico. *Environmental Earth Sciences*. 2021;80(19):1–21.
186. Reid G., Klebe S., van Zandwijk N., George A. M. Asbestos and Zeolites: from A to Z via a Common Ion. *Che-*

mical Research in Toxicology. 2021;34(4):936–951. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00286.
187. Waris G., Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*. 2006;5(1):14. DOI: 10.1186/1477-3163-5-14.
188. Pacella A., Cremisini C., Nardi E., Montereali M. R., Pettiti I., Giordani M., Ballirano P. Different erionite species bind iron into the structure: A potential explanation for fibrous erionite toxicity. *Minerals*. 2018;8(2):36.
189. Gualtieri A. F., Gandolfi N. B., Passaglia E., Pollastri S., Mattioli M., Giordani M., Gualtieri M. L. Is fibrous ferrierite a potential health hazard? Characterization and comparison with fibrous erionite. *American Mineralogist: Journal of Earth and Planetary Materials*. 2018;103(7):1044-1055.
190. Ahali Abadeh Z., Saviano G., Ballirano P., Santonicola M. G. Curcumin-loaded zeolite as anticancer drug carrier: Effect of curcumin adsorption on zeolite structure. *Pure and Applied Chemistry*. 2020;92(3):461–471. DOI: 10.1515/pac-2018-1213.
191. Derakhshankhah H., Jafari S., Sarvari S., Barzegari E., Moakedi F., Ghorbani M., Varnamkhasti B. S., Jaymand M., Izadi Z., Tayebi L. Biomedical Applications of Zeolitic Nanoparticles, with an Emphasis on Medical Interventions. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:363–386. DOI: 10.2147/IJN.S234573.
192. Lehman S. E., Larsen S. C. Zeolite and mesoporous silica nanomaterials: greener syntheses, environmental applications and biological toxicity. *Environmental Science: Nano*. 2014;1(3):200–213.
193. Katic M., Bosnjak B., Gall-Troselj K., Dikic I., Pavelic K. A clinoptilolite effect on cell media and the consequent effects on tumor cells *in vitro*. *Frontiers in Bioscience*. 2006;11(2):1722–1732. DOI: 10.2741/1918.
194. Zakeri N., Rezaie H. R., Javadpour J., Kharaziha M. Effect of pH on cisplatin encapsulated zeolite nanoparticles: Release mechanism and cytotoxicity. *Materials Chemistry and Physics*. 2021;273:124964.
195. Mintova S., Burtea C., Hébert C. Corona protein composition and cytotoxicity evaluation of ultra-small zeolites synthesized from template free precursor suspensions. *Toxicology Research*. 2013;2(4):270–279.
196. Abd-Elsatar A. G., Farag M. M., Youssef H. F., Salih S. A., Mounier M. M., El-Meliegy E. Different zeolite systems for colon cancer therapy: monitoring of ion release, cytotoxicity and drug release behavior. *Progress in Biomaterials*. 2019;8(2):101–113. DOI: 10.1007/s40204-019-0115-8.
197. Panichev A. M., Kulakov Yu. V., Gulkov A. N. Use of zeolites in medicine. *Pacific Medical Journal*. 2003;(4):21–24. (In Russ.)
198. Gaidash A. A., Apchel V. Ya., Ivchenko E. V., Bely V. I., Bakakin V. V. The effect of zeolite tuffs on the body upon oral administration. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2016;1(53):115–123. (In Russ.)
199. Zeolites. Evolution of knowledge. Experimental and clinical studies of dietary supplements of the "Litovit" series. Volume 2. Novosibirsk: "EKOR-kniga"; CJSC RPC "NOV"; 2011. 175 p. (In Russ.)
200. Kraljević Pavelić S., Saftić Martinović L., Simović Medica J., Žuvić M., Perdija Ž., Krpan D., Eisenwagen S., Orct T., Pavelić K. Clinical Evaluation of a Defined Zeolite-Clinoptilolite Supplementation Effect on the Selected Blood Parameters of Patients. *Frontiers in Medicine*. 2022;9:851782. DOI: 10.3389/fmed.2022.851782.

Алматы, Казахстан
КЦДС «Атакент»

21-23 мая
2025

PharmaTECH
KAZAKHSTAN

2-ая КАЗАХСТАНСКАЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА
«ОБОРУДОВАНИЕ, СЫРЬЕ И ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ»

pharmatechexpo.kz

KiheKazakhstan

@healthcare.events

+7 727 258 34 47

gulzana.abdusharipova@iteca.events

ОРГАНИЗАТОРЫ

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.03

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1983

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка и исследование гранул методом реактивной термоэкструзии на основе интерполимерных сочетаний сополимеров Eudragit® для доставки индометацина

Ш. Ф. Насибуллин[1], Т. Ван Дуонг[2], И. Николакакис[3], К. Какриманис[3], Г. Ван Ден Мутер[2], Р. И. Мустафин[1]✉

[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] Department of Pharmaceutical and Pharmacological Science (Drug Delivery and Disposition), Leuven, University of Leuven (KU Leuven). Belgium

[3] Department of Pharmaceutical Technology, Thessaloniki, Aristotle University of Thessaloniki. Greece

✉ **Контактное лицо:** Мустафин Руслан Ибрагимович. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Ш. Ф. Насибуллин – https://orcid.org/0000-0002-7255-8041;
Т. Ван Дуонг – https://orcid.org/0000-0002-8918-0268;
И. Николакакис – https://orcid.org/0000-0003-1690-1885;
К. Какриманис – https://orcid.org/0000-0003-3717-6897;
Г. Ван Ден Мутер – https://orcid.org/0000-0001-9166-6075;
Р. И. Мустафин – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853.

Статья поступила: 23.11.2024 **Статья принята в печать:** 06.03.2025 **Статья опубликована:** 07.03.2025

Резюме

Введение. В результате исследования методом реактивной термоэкструзии (РТЭ) было получено 4 типа гранул с индометацином на основе сополимеров Eudragit® марок EPO и L100-55, их физической смеси (ФС), аналогичной по составу синтезированному интерполиэлектролитному комплексу (ИПЭК) EPO/L100-55 – 1,95 : 1 (по молям). Проведенная с использованием метода модулированной ДСК отработка условий термоэкструзии показала применимость данного подхода для предварительного моделирования происходящих процессов. Охарактеризованные с использованием методов термического и спектрального анализа полученные гранулы включают индометацин в аморфной форме, образующейся из исходной γ-формы в результате РТЭ образцов. Изучение высвобождения индометацина из полученных гранул в моделирующих продвижение по ЖКТ условиях показало перспективность всех видов разработанных систем для создания конструкций с направленным высвобождением ЛВ в модельные буферные среды, соответствующие голодному или сытому желудку, а также верхним отделам тонкой кишки (EPO и ФС EPO/L100-55), слепой и правой половины толстой кишки (L100-55) и проксимального отдела толстой кишки (ИПЭК). В последнее время вследствие выраженной пластичности, обусловленной низкой температурой стеклования (T_c), многие типы сополимеров Eudragit® (E, RL, RS, FS, NE, NM) находят все более широкое применение в интенсивно развивающейся области фармацевтической технологии – гранулировании методом термоэкструзии, получившей название pharmaceutical melt extrusion (PME). Несмотря на прогрессирующее количество исследований по использованию PME-метода, исследования по изучению возможности применения поликомплексных систем на основе сополимеров семейства Eudragit® незаслуженно отсутствуют. При этом известно, что комбинирование противоположно заряженных пар термопластичных эудрагитов при использовании технологии термоэкструзии позволяет разрабатывать пероральные системы доставки с регулируемой проницаемостью полимерных звеньев в структуре оболочек пеллет вследствие образования интерполимерно связанных участков цепей реагирующих макромолекул в процессе высвобождения лекарственных веществ (ЛВ) в моделирующих желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) средах с прогрессирующим ростом значений pH от желудка до толстой кишки. К сожалению, несмотря на то, что в литературе имеется множество примеров по применению метода термоэкструзии, включая и РТЭ для получения систем доставок ЛВ на основе сополимера Eudragit® EPO (ввиду его низкой T_c), практически отсутствуют исследования, в которых в качестве термоэкструзионного носителя использовался бы интерполиэлектролитный комплекс (ИПЭК) с участием химически комплементарных пар эудрагитов.

© Насибуллин Ш. Ф., Ван Дуонг Т., Николакакис И., Какриманис К., Ван Ден Мутер Г., Мустафин Р. И., 2025
© Nasibullin S. F., Van Duong T., Nikolakakis I., Kachrimanis K., Van den Mooter G., Moustafine R. I., 2025

Цель. Разработка и исследование термоэкструдированных гранул на основе интерполимерных сочетаний анион-катионных типов сополимеров Eudragit® для доставки индометацина.

Материалы и методы. Подбор и отработка условий термоэкструзии были проведены с использованием методов реометрии, высокотемпературной микроскопии и модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (мДСК), позволившей смоделировать и воспроизвести условия термоэкструзии. Полученные на одношнековом экструдере гранулы были охарактеризованы с использованием методов мДСК, термогравиметрического анализа (ТГА), ИК- и БИК-спектроскопии. Изучение высвобождения индометацина из гранул в моделирующих продвижение по ЖКТ условиях проводили по методу 2 – «вращающаяся лопасть» согласно ГФ РФ.

Результаты и обсуждение. Термоэкструдированнные гранулы получали из составов бинарных смесей (ЕРО-ИНД, L100-55-ИНД, ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД), при которых они имели максимальное значение температур стеклования – T_{cmax}. Для ЕРО-ИНД оно составило 30/70, а для ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД и L100-55-ИНД – 40/60. Согласно результатам ИК-спектроскопии, образцы термоэкструдатов, содержащие в своем составе ЕРО, а именно ЕРО-ИНД, ФС ЕРО-L100-55-ИНД и ИПЭК-ИНД, характеризуются смещением полосы ИНД с 1689 до 1678 $см^{-1}$, свидетельствующее о переходе исходной кристаллической формы ИНД в аморфную в результате физико-химического взаимодействия ЕРО с ИНД, что, также, подтверждается результатами термического анализа. Кроме того, у всех термоэкструдированных образцов содержащих ЕРО, ИК-спектры характеризуются появлением полосы при 1570 $см^{-1}$, подтверждающей образование ионных связей, вследствие взаимодействия ионизированных карбоксильных групп ИНД и L100-55 с диметиламино группами ЕРО. БИК-спектроскопия подтвердила наличие в структуре экструдата на основе ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД как аморфной, так и кристаллической формы γ-формы ИНД, что, по всей видимости, связано с частичным переходом метастабильной аморфной формы в кристаллическую с течением времени. Высвобождение ИНД из экструдатов ЕРО-ИНД при pH 1,2 происходит очень быстро, достигая 100 % в течение получаса. Характер высвобождения ИНД из экструдатов с L100-55-ИНД представляет собой отсрочено-замедленный профиль, контроль скорости выхода которого определяется свойствами формообразующего сополимера (L100-55). Высвобождение ИНД из экструдатов на основе ФС ЕРО-L100-55-ИНД, как и случае экструдатов ЕРО-ИНД, начинается при pH 1,2, но обеспечивает лишь незначительный выход ЛВ (порядка 30 %). Благодаря содержанию в составе ФС кислотоустойчивого L100-55 стремительный выход ИНД сдвигается из кислой среды (pH = 1,2) в слабокислую (pH = 5,8) обеспечивая 100 % выход ИНД к 2,5 часам эксперимента. Высвобождение ИНД из поликомплексных экструдатов (ЕРО-L100-55)-ИНД характеризуется импульсным профилем высвобождения.

Заключение. В результате исследования методом реактивной термоэкструзии было получено 4 типа гранул с индометацином на основе сополимеров Eudragit® марок ЕРО и L100-55, ИПЭК с их участием и физической смеси, аналогичной ему по составу. Полученные гранулы были охарактеризованы с использованием термических и спектральных методов. Изучение высвобождения индометацина из полученных гранул показало перспективность применения разработанных систем для направленной доставки в различные отделы ЖКТ, начиная от желудка и заканчивая проксимальным отделом толстой кишки.

Ключевые слова: гранулы, метод реактивной термоэкструзии, направленная доставка в область толстой кишки, индометацин

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

Вклад авторов. Ш. Ф. Насибуллин осуществлял разработку методики получения гранул, подбор параметров термоэкструдера и оптимального состава, их анализ, исследования по высвобождению индометацина, а также обработку результатов и написание драфта статьи. Доктор Т. Ван Дуонг оказывал техническую поддержку в выполнении термического анализа. Профессор Г. Ван Ден Мутер оказывал консультативную и методологическую помощь в выполнении термических исследований. Профессор И. Николакакис и профессор К. Какриманис оказывали консультационную и техническую поддержку по получению гранул индометацина методом термоэкструзии. Доцент Р. И. Мустафин принимал участие в концептуализации и методологии настоящей работы, а также осуществлял рецензирование и корректировку статьи. Все вышеуказанные авторы принимали участие в написании статьи.

Благодарность. Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 23-15-00263). Также авторы выражают благодарность администрации Казанского ГМУ за предоставление гранта на научные стажировки Ш. Ф. Насибуллина в Лёвенском католическом университете (Лёвен, Бельгия) и Университете Салоники имени Аристотеля (Салоники, Греция), где была выполнена большая часть работы, и немецкой компании Evonik Nutrition & Care GmbH за предоставление образцов сополимеров Eudragit® EPO и Eudragit® L100-55. Также авторы выражают благодарность студенту Института фармации Гузалие Нургатиной за помощь в ходе исследований по изучению высвобождения индометацина из термоэкструдированных гранул.

Для цитирования: Насибуллин Ш. Ф., Ван Дуонг Т., Николакакис И., Какриманис К., Ван Ден Мутер Г., Мустафин Р. И. Разработка и исследование гранул методом реактивной термоэкструзии на основе интерполимерных сочетаний сополимеров Eudragit® для доставки индометацина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):223–244. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1983

Development and study of reactive hot-melt extruded granules based on interpolymer combinations of Eudragit® copolymers for indomethacin delivery

Shamil F. Nasibullin, Tu Van Duong, Ioannis Nikolakakis, Kyriakos Kachrimanis, Guy Van den Mooter, Rouslan I. Moustafine✉

[1] Institute of Pharmacy. Kazan State Medical University. 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia
[2] Department of Pharmaceutical and Pharmacological Science (Drug Delivery and Disposition), Leuven, University of Leuven (KU Leuven). Belgium
[3] Department of Pharmaceutical Technology, Thessaloniki, Aristotle University of Thessaloniki. Greece

✉ **Corresponding author:** Rouslan I. Moustafine. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Shamil F. Nasibullin – https://orcid.org/0000-0002-7255-8041;
Tu Van Duong – https://orcid.org/0000-0002-8918-0268;
Ioannis Nikolakakis – https://orcid.org/0000-0003-1690-1885;
Kyriakos Kachrimanis – https://orcid.org/0000-0003-3717-6897;
Guy Van den Mooter – https://orcid.org/0000-0001-9166-6075;
Rouslan I. Moustafine – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853.

Received: 23.11.2024 **Accepted:** 06.03.2025 **Published:** 07.03.2025

Abstract

Introduction. As a result of the study, 4 types of pellets with indomethacin based on Eudragit® copolymers of EPO and L100-55 grades, their physical mixture (PM) being similar in composition to the synthesised interpolyelectrolyte complex (IPEC) EPO/L100-55 – 1.95 : 1 (mole/mole) were obtained using reactive HME method. The development of thermal extrusion conditions using the modulated DSC method showed the applicability of this approach for preliminary modelling of the occurring processes. Characterised using thermal and spectral analysis methods, the obtained granules include indomethacin in the amorphous form formed from the original γ-form as a result of reactive thermal extrusion of the samples. The study of indomethacin (IND) release from the obtained granules in modelling the progression through the GI tract under mimicking conditions has shown the prospectivity of all types of the developed systems for the creation of constructs with targeted release of IND into model buffer media corresponding to: the fasted or feed state simulated gastric fluids, as well as the fasted state simulated intestinal fluid correspondent to the upper parts of the small intestine (EPO and PM EPO/L100-55), the cecum and right half of the colon (L100-55) and the proximal colon (IPEC). Recently, due to the pronounced plasticity resulting from the low glass transition temperature (T_g), many of the Eudragit® copolymer types (E, RL, RS, FS, NE, NM) have found increasing application in the intensively developing field of pharmaceutical technology – thermo extrusion granulation, called pharmaceutical melt extrusion (PME). Despite the progressive number of studies on the use of the PME method, there is an undeserved lack of research on the feasibility of polycomplex systems based on copolymers of the Eudragit® family. At the same time, it is known that combining oppositely charged pairs of thermoplastic Eudragits using PME technology allows the development of oral delivery systems with adjustable permeability of polymer links in the structure of pellet coatings due to the formation of interpolymer-bonded chain sequences of reacting macromolecules during drug release in gastrointestinal (GI) simulating media with progressive increase of pH values from the stomach to the colon. Unfortunately, although there are many examples in the literature on the application of PME, including reactive HME, to produce drug delivery systems based on Eudragit® EPO copolymer (due to its low T_g value), there are practically no studies in which an interpolyelectrolyte complex (IPEC) involving chemically complementary pairs of Eudragits is used as a thermoextruded carrier.

Aim. Development and study of hot-melt extruded granules based on interpolymer anionic-cationic combinations of Eudragit® copolymers for indomethacin delivery.

Materials and methods. Thermal extrusion conditions were selected and refined using rheometry, high-temperature microscopy and modulated differential scanning calorimetry (mDSC) to simulate and reproduce the thermal extrusion conditions. The pellets obtained on a single screw extruder were characterised using mDSC, thermogravimetric analysis (TGA), IR and NIR spectroscopy. The study of indomethacin release from granules under mimicking GI tract conditions was carried out by method 2 – 'rotating paddle' according to GPh. RF.

Results and discussion. Hot melt extruded pellets were obtained from the compositions of binary mixtures (EPO-IND, L100-55-IND, IPEC (EPO-L100-55)-IND), at which they had the maximum value of glass transition temperature – $T_{g_{max}}$. For EPO-IND it was 30/70, and for IPEC (EPO-L100-55)-IND and L100-55-IND – 40/60. According to the results of IR spectroscopy, the samples of thermoextrudates containing EPO in their composition, namely EPO-IND, EPO-L100-55-IND PM and IPEC-IND, are characterized by a shift of the IND band from 1689 to 1678 cm^{-1}, indicating the transition of the initial crystalline form of IND into amorphous form as a result of physicochemical interaction of EPO with IND, which is also confirmed by the results of thermal analysis. In addition, in all thermoextruded samples containing EPO, IR spectra are characterized by the appearance of a band at 1570 cm^{-1}, confirming the formation of ionic bonds due to the interaction of ionized carboxyl groups of IND and L100-55 with dimethylamino groups of EPO. NIR spectroscopy confirmed the presence of both amorphous and crystalline forms of the γ-form of IND in the structure of the IPEC (EPO-L100-55)-IND-based extrudate, which is apparently due to the partial transition of the metastable amorphous form to the crystalline form over time. The release of IND from EPO-IND extrudates at pH 1.2 is very rapid, reaching 100 % within half an hour. The character of IND release from extrudates with

L100-55-IND is a delayed-sustained profile, the control of the release rate being determined by the properties of the forming copolymer (L100-55). The release of IND from EPO-L100-55-IND PM-based extrudates, as in the case of EPO-IND extrudates, starts at pH 1.2, but provides only a negligible yield of IND release (about 30 %). Due to the content of acid-resistant L100-55 in the PM composition, the rapid IND release shifts from acidic environment (pH = 1.2) to slightly acidic (pH = 5.8) providing 100 % IND release by 2.5 hours of the experiment. The release of IND from polycomplex extrudates (EPO-L100-55)-IND is characterized by a pulse release profile.

Conclusion. As a result of the study, 4 types of pellets with indomethacin based on Eudragit® copolymers of EPO and L100-55 grades, IPEC with their participation and a physical mixture similar to it were obtained by reactive thermal extrusion. The resulting granules were characterised using thermal and spectral techniques. The study of indomethacin release from the obtained granules showed the promising application of the developed systems for targeted delivery to different parts of the GI tract, from the stomach to the proximal colon.

Keywords: granules, reactive HME method, targeted delivery to the colon region, indomethacin

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. Shamil F. Nasibullin developed the method for obtaining HME granules, selected the device parameters and optimal composition, analyzed them, studied indomethacin release, processed the results and wrote the draft of the article. Dr. Tu Van Duong provided technical support in performing thermal analysis. Prof. Guy Van den Mooter provided consulting and methodological assistance in performing thermal studies. Prof. Ioannis Nikolakakis and Prof. Kyriakos Kachrimanis provided consulting and technical support for the production of indomethacin granules by HME. Dr. 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.

Acknowledgment. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF № 23-15-00263). The authors express their gratitude to the administrative staff of the Kazan State Medical University for providing the grant for the internships of Shamil Nasibullin at the University of Leuven – KU Leuven (Leuven, Belgium) and Aristotle University of Thessaloniki (Thessaloniki, Greece), where most of the research was carried out, and German company Evonik Nutrition & Care GmbH for providing samples of Eudragit® EPO and Eudragit® L100-55. The authors also express their gratitude to Guzaliya Nurgatina for her assistance during release studies from HME granules.

For citation: Nasibullin S. F., Van Duong T., Nikolakakis I., Kachrimanis K., Van den Mooter G., Moustafine R. I. Development and study of reactive hot-melt extruded granules based on interpolymer combinations of Eudragit® copolymers for indomethacin delivery. *Drug development & registration*. 2025;14(1):223–244. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1983

ВВЕДЕНИЕ

Метод термоэкструзии (*англ.* hot melt extrusion – HME) был предложен еще в 1930-х годах. За это время он нашел широкое применение в производстве пластмасс, резины и в пищевой промышленности. Первое применение термоэкструзии в фармацевтической технологии с использованием поли(винилацетат-со-метакриловой кислоты) и эпоксидной смолы, содержащей вторичный амин в качестве полимерного носителя, было описано в 1971 году El-Egakey и др. [1]. Термоэкструзия представляет собой непрерывный фармацевтический процесс, который включает в себя продвижение полимерных материалов с ЛВ и смесью ЛВ с помощью вращающегося шнека при температуре выше их температуры стеклования (T_c, T_g), а иногда и выше температуры плавления ($T_{пл.}$, T_m) для достижения перемешивания на молекулярном уровне ЛВ и термопластичных наполнителей, чаще всего полимерной природы. Такое перемешивание в процессе термоэкструзии преобразует исходные компоненты в аморфный продукт с однородной формой, структурой и плотностью [2–4]. Данный метод имеет определенные преимущества перед традиционными, а именно: уменьшение количества вспомогательных компонентов, сокращение количества технологических стадий, увеличение растворимости труднорастворимых ЛВ.

Огромной популярностью в PME-технологии пользуются в основном те марки сополимеров Eudragit®, которые являются термопластичными, а это прежде всего поликатионные типы (EPO, RL, RS), характеризующиеся низкими значениями температур стеклования (T_c) – 50, 63, 64 °C соответственно. Однако достаточной термической стабильностью обладает лишь EPO, температура деградации ($T_{дег.}$) которого составляет 200 °C. В то же время у типов RL/RS $T_{дег.}$ регистрируются при 166/170° соответственно, что тем не менее позволяет использовать все три марки в тер-

моэкструзии при соблюдении температурного диапазона нагрева в интервале 120–150 °C [5]. Выбор из числа полианионных типов сополимеров Eudragit® еще более ограничен, так как аналогичным требованиям удовлетворяют лишь две марки, FS и L100-55, имеющие T_c 50 и 120 °C. И если FS характеризуется аналогичной EPO $T_{дег.}$ = 200 °C, то L100-55 имеет ограничения по температуре нагрева при отработке режимов термоэкструзии в связи с его $T_{дег.}$, равной 176 °C [6]. Известно, что поликомплексы, как правило, характеризуются наличием единственной T_c, находящейся между T_c исходных, образующих ИПЭК полимеров [7–9]. Таким образом, направленный синтез поликомплекса с участием комплементарной пары путем увеличения избытка термопластичного сополимера в его структуре ожидаемо позволит снизить результирующую T_c и тем самым расширить диапазон применения включенного в состав ИПЭК менее термопластичного сополимера в рамках его использования в HME-технологии. Кроме того, включение сополимеров в состав поликомплексов позволяет изменить свойства образующих его компонентов, основным из которых в случае использования ИПЭК в качестве носителя является прецизионное контролирование скорости и степени высвобождения по времени и месту доставки ЛВ в заданный отдел ЖКТ. Последнее легко достигается подбором стехиометрического состава, регулированием гидрофильных (свободных звеньев, не участвующих в интерполиэлектролитной реакции) и гидрофобных (включающих звенья в составе макромолекул, связанных ионными межмакромолекулярными связями) участков в структуре ИПЭК [8]. Однако выводы по единственной попытке исследования возможности применения поликомплексных систем на основе комплементарных марок эудрагитов в технологии термоэкструзии, предпринятой Gallardo [9], оказались неутешительными: синтезированные в средах органических растворителей поликомплексы с мольным избытком используемых полианионных марок сополимеров Eudragit® по отношению к EPO приводили к значительному увеличению результирующей вязкости систем при термоэкструзии и получению некачественных экструдатов.

Несколько позже выяснилось, что метод HME хорошо зарекомендовал себя в качестве способа получения твердых дисперсий путем механохимического синтеза [10], используя возможность образования полиэлектролит-лекарственных комплексов (ПЛК) при термоэкструзии. Благодаря высоким температурам смешивание ЛВ с полимером обеспечивает необходимые условия для протекания твердофазных химических реакций. Такой метод впоследствии получил название reactive melt extrusion – реактивной (реакционной) экструзии расплава (РЭР) или реактивной термоэкструзии (РТЭ), как особый процесс термоэкструзии, в котором отдельные компоненты соединяются в результате химической реакции [11]. В ряде исследований РТЭ используется для приготовления ПЛК для улучшения скорости растворения плохо растворимых в воде ЛВ [12], маскировки вкуса [13] и адресной доставки лекарств [14]. Ранее нашей группой был также предложен подход по получению ПЛК на основе EPO-ИНД 3 : 1 (по молям) и интерполиэлектролит-лекарственных комплексов (ИПЭЛК) состава EPO-S100-ИНД 4,5 : 1 : 1 (по молям) методом соосаждения с возможностью создания системы доставки ИНД в толстый кишечник [15].

Данная работа посвящена сравнительному изучению микрогранулированных систем на основе индивидульных сополимеров (EPO, L100-55), их физической смеси и ИПЭК (EPO-L100-55) с индометацином (ИНД), полученных методом реактивной термоэкструзии.

Целью настоящего исследования стала разработка и исследование термоэкструдированных гранул на основе сочетаний противоположно заряженных типов сополимеров Eudragit® для доставки индометацина в различные отделы кишечника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для создания термоэкструдированных гранул использовали Eudragit® EPO (EPO), терполимер катионного типа *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата с метилметакрилатом и бутилметакрилатом (молярное соотношение 2 : 1 : 1, ММ 150 кДа), и Eudragit® L100-55 (L100-55), сополимер анионного типа метакриловой кислоты и этилакрилата (молярное соотношение 1 : 1, ММ 250 кДа), производства Evonik Nutrition & Care GmbH (Германия). В качестве ЛВ использовали индометацин (ИНД) производства Sigma-Aldrich (Бельгия).

ИПЭК на основе Eudragit® EPO и Eudragit® L100-55 получали по следующей методике: навеску EPO растворяли в 0,1 н. растворе CH_3COOH, полученный раствор доводили 0,1 н. раствором NaOH до pH 7,0. Навеску L100-55 растворяли в 0,1 н. растворе NaOH, полученный раствор доводили 0,1 н. раствором CH_3COOH до значения pH 7,0. Затем, используя делительную воронку, со скоростью 1–2 капли в секунду добавляли раствор EPO к раствору L100-55. Выделяется ИПЭК в виде рыхлого, объемного, хлопьевидного осадка, который оседает при стоянии с разделением системы на две равновесные фазы: прозрачный раствор и осадок поликомплекса. Прозрачный раствор декантировали, а осадок промывали деионизированной водой и сушили в вакуум-сушильном шкафу VD 23 (BINDER, Германия) при температуре 40 °C до постоянной массы. Согласно проведенному элементному анализу на приборе Thermo Flash 2000 CHNS/O (Thermo Fisher Scientific, Великобритания) полученный нами ИПЭК имел стехиометрический состав ИПЭК EPO/L100-55 1,95 : 1 (по молям).

Для предварительной оценки термических свойств анализируемых образцов и изучения их термической стабильности использовали методы ТГА и высокотем-

пературной поляризационной световой микроскопии. ТГА проводили на приборе Discovery TGA™ (TA Instruments, США): образцы массой 10 мг нагревали со скоростью 10 °С/мин в алюминиевых тиглях от 30 до 500 °С. Программное обеспечение TRIOS™ версии 3.1.5.3696 (TA Instruments, США) использовалось для обработки результатов ТГА.

Дополнительно морфологию и двупреломление образца полученного ИПЭК изучали с помощью поляризационного светового микроскопа BX60 с подогреваемым столиком THMS600 (Olympus, Германия) и температурным котроллером TMS93 (Linkam Scientific Instruments Ltd., Великобритания). Наличие двупреломления под действием поляризационного света оценивали с помощью цифровой камеры высокого разрешения (Olympus, Германия).

Для моделирования условий термоэкструзии в системах ЕРО-ИНД, L100-55-ИНД, IPEC EPO/L100-55-ИНД использовали метод мДСК. Термический анализ проводили на приборе Q2000 с системой охлаждения RCS90 (TA Instruments, США) в атмосфере сухого азота марки 6.0 при скорости потока газа 50 мл/мин. Калибровку прибора по энтальпии плавления и теплоемкости проводили с использованием индия и сапфира (sapphire) соответственно. Образцы массой 5 мг помещали в алюминиевые тигли Tzero® (TA Instruments, США) и нагревали в диапазоне температур от 0 до 180 °С. Метод состоял из трех последовательных сегментов: нагрева, охлаждения, нагрева. Вначале образец нагревали со скоростью 20 °С/мин до температуры 170 °С (на 10 °С выше $T_{пл.}$ ИНД) и выдерживали (Isothermal) при данной температуре в течение 10 мин, затем охлаждали со скоростью 20 °С/мин до температуры 0 °С, при данной же температуре вновь выдерживали (Isothermal) в течение 5 мин и нагревали со скоростью 2 °С/мин до 180 °С в режиме модуляции (период – 40 с, амплитуда – 0,212 °С). Данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Universal Analysis (версия 4.4, TA Instruments, США).

С целью подбора условий термоэкструзии и определения характеристик экструзии путем измерения кривых течения расплавов использовали метод реометрии. Постоянную вязкости сдвига как функцию от температуры определяли с колебательными измерениями на реометре с контролируемой деформацией AR2000ex (TA Instruments, США), используя 25 мм геометрию стальных пластин (steel plate geometry) в системе «плоскость – плоскость». Испытания на деформационные растяжения проводились в линейном режиме со скоростью сдвига 0,1 $с^{-1}$. Измерения вязкости проводились в интервале температур от 200 до 80 °С при скорости охлаждения 5 °С/мин.

Термоэкструдаты с индометацином получали с использованием порошков индивидуальных сополимеров Eudragit® EPO и Eudragit® L100-55, ИПЭК на их основе и физической смеси (ФС) сополимеров в том же мольном соотношении. Смешение ИНД и сополимера или полимерных композиций (ФС, ИПЭК) осуществляли в смесителе типа «пьяная бочка» (W.A. Bachofen, Швейцария) в течение 15 мин при скорости вращения 45 об/мин. Далее полученную смесь порошков прессовали в таблетки диаметром 13 мм при давлении 10 атм с использованием лабораторного гидравлического пресса для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США). Полученные таблетки (по 2–3 шт.) измельчали в мельнице A11 basic (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Германия) с «ножевой» насадкой. После просеивания через сита отбирали фракцию микрогранул, имеющих размер в диапазоне от 150 до 850 мкм, которую засыпали в загрузочный бункер термоэкструдера. Термоэкструзию проводили в одношнековом лабораторном экструдере RCP-0250 Microtruder (Randcastle Extrusion Systems, США) с диаметром отверстия матрицы 2 мм. С помощью блока управления задавали необходимые параметры процесса (температурные режимы представлены в таблице 1). После достижения необходимых температур на каждом участке шнека приводили его в дви-

Таблица 1. Температурные параметры, использованные при экструзии образцов

Table 1. Temperature parameters used during extrusion of the samples

№ п/п No.	Наименование системы System name	Термоэкструзия Thermoextrusion (HME)			
		Контролируемые зоны (температура, °С) Controlled zones (Temperature, °C)			
		T_1 (подача) T_1(feeding)	T_2 (перемешивание) T_2 (mixing)	T_3 (экструзия) T_3 (extrusion)	T_4 (выход) T_4 (die)
1	ЕРО-ИНД EPO-IND	100	120	125	130
2	L100-55-ИНД L100-55-IND	110	140	150	150
3	ФС (ЕРО-L100-55)-ИНД PM (EPO-L100-55)-IND	100	125	130	135
4	ИПЭК (ЕРО/L100-55)-ИНД IPEC (EPO/L100-55)-IND	100	135	140	140

жение. Загружали смесь микрогранул равными порциями, равномерность загрузки контролировалась по крутящему моменту на шнеке в диапазоне от 30 до 90 об/мин. После экспериментального подбора условий рабочий крутящий момент зафиксировали на значении 40 об/мин, при котором состав через матрицу стабильно экструдировался. Термоэкструдат вытягивался вручную. Для упрощения последующего измельчения диаметр выдерживался в диапазоне от 2,0 до 2,5 мм. Давление экструдирумого расплава 0,96 мПа обеспечивало скорость экструзии 10 мм/с при общем создаваемом давлении в термоэкструдере 40 мПа. Полученный термоэкструдат вначале измельчали вручную на кусочки размером 3–4 см, которые впоследствии нарезали на цилиндрические пеллеты размером 2 мм с помощью специального устройства – микропеллетайзера (Randcastle Extrusion Systems, США).

Количественное определение ИНД в термоэкструдатах проводили методом УФ-спектрофотомерии. Навеску гранул растворяли в 15 мл 95%-го этанола в мерной колбе вместимостью 20 мл в течение 5 мин в УЗ-бане UB-505 (Thermoline Scientific, Австралия), доводили объем этим же растворителем до метки и перемешивали. 2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводили объем 95%-м этанолом до метки и перемешивали. Оптическую плотность полученного раствора и раствора стандартного образца ИНД относительно раствора сравнения (95%-й этанол) определяли при длине волны $\lambda = 318$ нм на УФ/Вид-спектрофотометре Evolution 220 (Thermo Fisher Scientific, США).

мДСК-анализ полученных термоэкструдатов проводился на приборе Discovery DSC™ с системой охлаждения RCS90 (TA Instruments, США). Исследования проводились в атмосфере сухого азота марки 6.0 при скорости потока газа 50 мл/мин. Калибровку температурной шкалы ДСК проводили с использованием в качестве стандартов *н*-октадекана, индия и олова. Образцы загружали в алюминиевые тигли Tzero® (TA Instruments, США) и нагревали в диапазоне температур от 0 до 180 °С. Метод состоял из двух последовательных сегментов охлаждения и нагрева. Вначале образец охлаждали со скоростью 20 °С/мин до температуры 0 °С, выдерживали в течение 5 мин при данной температуре и далее нагревали со скоростью нагрева 2 °С/мин до 180 °С в режиме модуляции при следующих параметрах: период – 40 с и амплитуда – 0,212 °С. Программное обеспечение TRIOS™ версии 3.1.5.3696 (TA Instruments, США) использовалось для обработки результатов мДСК.

ИК-спектроскопию исследуемых образцов сополимеров и ИНД, а также тонкоизмельченных порошков термоэкструдатов, полученных после измельчения с помощью мельницы ShakIR (PIKE Technologies, США), проводили на ИК-спектрометре с фурье-преобразователем Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific, США) с приставкой НПВО с кристаллом ZnSe в диапазоне спектра от 4000 до 400 $см^{-1}$. Для обработки полученных результатов ИК-спектроскопии использовали программное обеспечение OMNIC версии 8.2.387 (Thermo Fisher Scientific, США).

БИК-спектры тонкоизмельченного порошка термоэкструдата на основе ИПЭК (EPO/L100-55)-ИНД в сравнении с субстанцией ИНД записывали на БИК/ИК-спектрометре Nicolet iS10 XT с приставкой диффузного отражения Smart DRA в диапазоне спектра от 2000 до 1500 нм. Для обработки полученных результатов ИК-спектроскопии использовали программное обеспечение OMNIC версии 9.2.98 (Thermo Fisher Scientific, США).

Оценку высвобождения ИНД из образцов гранул термоэкструдатов проводили по методу 2 (ГФ РФ) на приборе исследовательского класса, включающем тестер растворения DT 828 с автоматическим пробоотборником ASS-8, коллектором фракций FRL 824 и перистальтическим насосом ICP-8 (ERWEKA GmbH, Германия). Скорость вращения лопастей – 100 об/мин; температура среды – $37 \pm 0,5$ °С. Высвобождение проводили в течение 7 ч в условиях, имитирующих продвижение по ЖКТ [15], при этом pH среды растворения постепенно повышали: 0,1 н. HCl (pH = 1,2) в течение 1 ч, фосфатные буферные растворы с pH 5,8, 6,8 и 7,4 – по 2 ч в каждой из сред. Навеску образцов гранул термоэкструдатов, содержащую 100 мг ИНД, помещали в 400 мл 0,1 н. HCl, затем через 1 ч к первоначальной среде растворения добавляли 400 мл 0,02 М раствора K_2HPO_4. Значение pH полученного буферного раствора регулировали до необходимого значения pH (5,8, 6,8 и 7,4) с помощью 0,1 н. раствора NaOH. Конечный объем поддерживали на уровне 850 мл. Контроль значений pH проводили в каждой емкости с помощью портативного pH-метра Orion Star™ A325 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием комбинированного электрода Orion™ ROSS Ultra™ ATC Triode™ (Thermo Fisher Scientific, США). Отбор проб в количестве 5 мл проводили через каждые 30 мин с возмещением объема среды чистым буферным раствором. Количество высвободившегося ИНД в отобранных пробах определяли после их фильтрования через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,45 мм (Supelco Iso-Disc Filters N-25-4 Nylon 25 мм) при длинах волн $\lambda = 262$ нм (pH = 1,2) и $\lambda = 265$ нм (pH = 5,8; 6,8; 7,4) УФ-спектрофотометрически на приборе Evolution 220 (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве раствора сравнения использовали буферные растворы с соответствующими значениями pH. Эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Статистический анализ проводился с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и двустороннего *t*-критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, где $p < 0,05$ считалось значимым. Все результаты представлены как «среднее значение ± стандартное отклонение (СО)».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принимая во внимание результаты неудачной попытки по изучению использования поликомплексных систем на основе противоположно заряженных марок сополимеров Eudragit® в термоэкструдировании [9], мы осуществили направленный синтез образца ИПЭК на основе противоположно заряженных марок Eudragit® EPO и L100-55 с двухкратным мольным избытком термопластичного сополимера (EPO) в реакционной смеси (1,95:1). Выбор в качестве полианионного сополимера L100-55 был обусловлен его наименьшей температурой стеклования по сравнению с марками L100 и S100. Полученный образец ИПЭК EPO/L100-55 был физико-химически охарактеризован методами ИК-спектроскопии и термического анализа.

На рисунке 1 представлены ИК-спектры индивидуальных сополимеров и индометацина (IND). Структура EPO подтверждается наличием характеристических полос при 2820, 2770 (диметиламиногруппы) и 1724–1730 $см^{-1}$ (этерифицированные карбонильные группы). Eudragit® L100-55 характеризуется полосой при 1697–1705 $см^{-1}$, подтверждающей наличие протонированных карбоксильных групп. Полученные результаты согласуются с материалами, изложенными в спецификации фирмы Evonik Nutrition & Care GmbH. ИК-спектр ФС является суперпозицией составляющих ее сополимеров. В то же время ИК-спектр ИПЭК характеризуется появлением отличной от ФС полосы при 1570 $см^{-1}$, подтверждающей образование ионных связей вследствие взаимодействия ионизированных карбоксильных групп (в составе L100-55) и диметиламиногрупп (EPO) противоположно заряженных макромолекул [8, 9]. На ИК-спектре индометацина следует выделить две полосы при 1713–1717 $см^{-1}$ (асимметричные колебания карбонильных C=O-групп в циклических димерах) и 1689–1692 $см^{-1}$ (валентные колебания «амид I» ароматической амидной группы и бензоильных C=O-групп) [15].

В ходе термического анализа (рисунок 2) на ТГА-термограмме EPO первая потеря массы происходит при 264–310 °C (27 %), что может быть связано с образованием шестичленных циклических ангид-

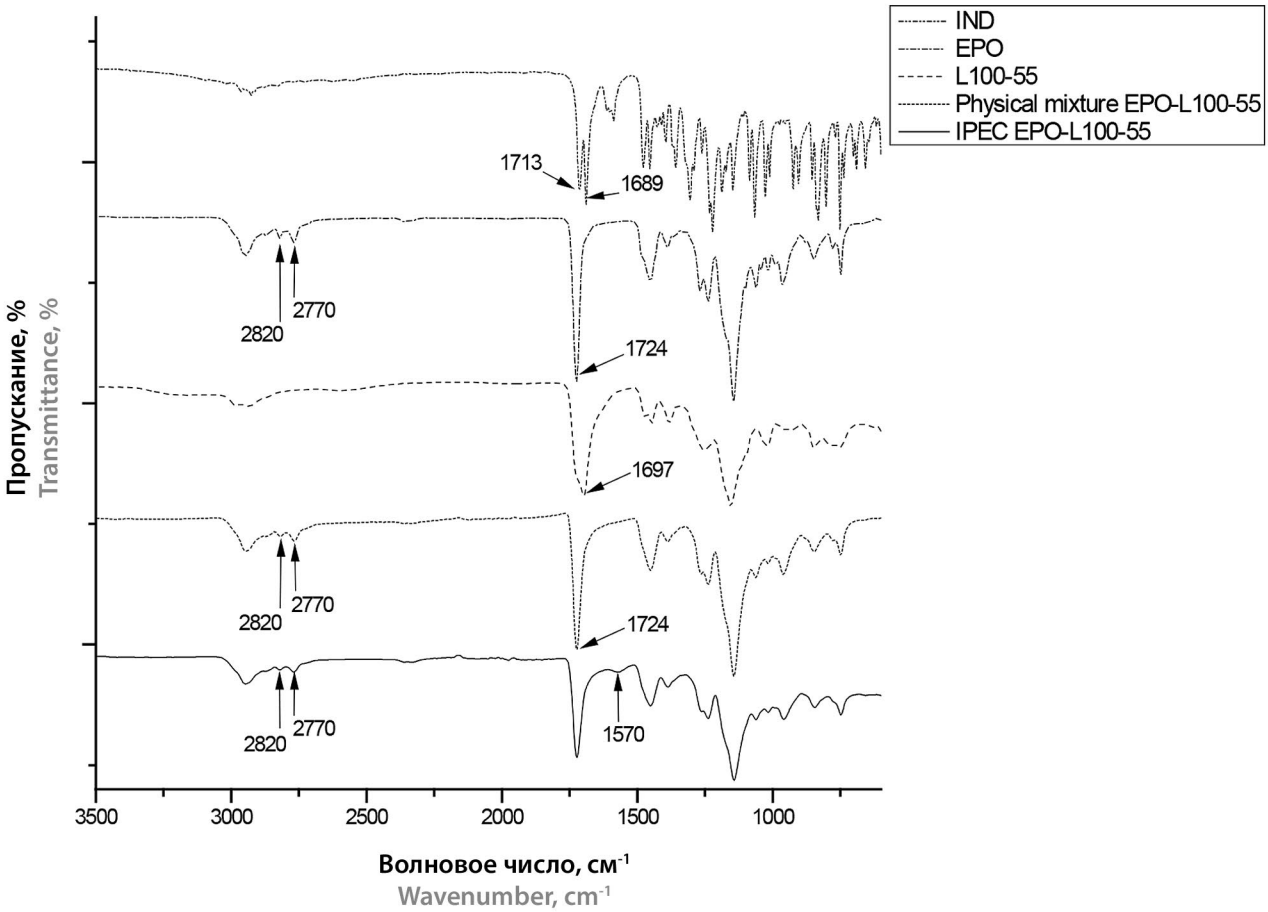


Рисунок 1. ИК-спектры индометацина, индивидуальных сополимеров, ФС EPO-L100-55 и ИПЭК EPO-L100-55 (по оси ординат – пропускание, %; по оси абсцисс – волновое число, $см^{-1}$)

Figure 1. FTIR spectra of indomethacin, individual copolymers, PM EPO-L100-55 and IPEC EPO-L100-55 (ordinate – transmission, %; abscissa – wavenumber, cm^{-1})

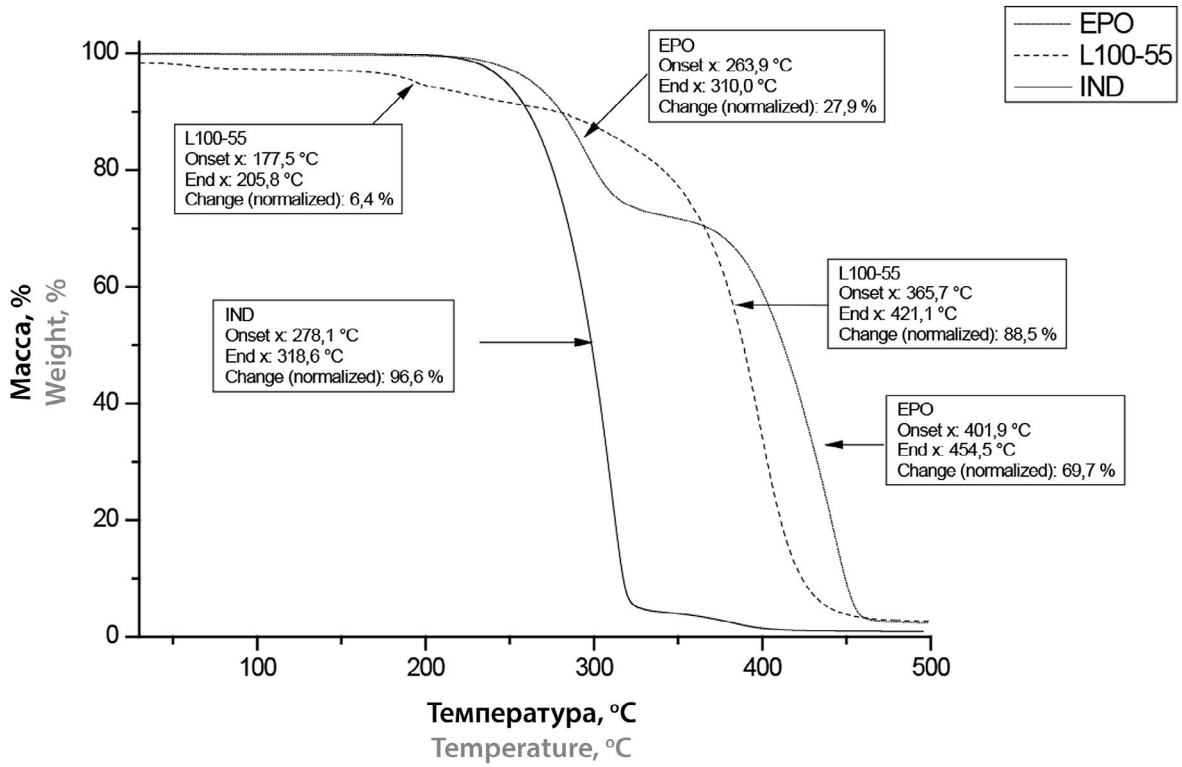


Рисунок 2. ТГА-термограммы индивидуальных сополимеров и индометацина (по оси ординат – масса, %; по оси абсцисс – температура, °C)

Figure 2. TGA thermograms of individual copolymers and indomethacin (ordinate – weight, %; abscissa – temperature, °C)

ридов [16]. Вторая потеря массы наблюдается при 402–454 °C (69 %), что указывает на термическую деструкцию терполимера. На ТГА-термограмме образца L100-55 первая потеря массы происходит при 177–206 °C (6 %), что связано с началом его термической деградации и соответствует данным литературы [6, 17–20]. Второе снижение массы образца сополимера, наблюдающееся при 365–421 °C (88 %), также является результатом его разложения. В случае ИНД потеря массы образца происходит при 278–318 °C (96 %), что, очевидно, свидетельствует о его разложении.

Согласно результатам термического анализа все индивидуальные образцы исследуемых соединений демонстрируют достаточно сопоставимую термическую стабильность. Однако с позиций использования изучаемых сополимеров в технологии термоэкструзии существуют определенные ограничительные особенности. В первую очередь это относится к L100-55, так как в связи с выявленным началом его термической деградации при экструзии образцов необходимо придерживаться режима нагрева, не превышающего 177 °C ($T_{дег.}$), что соотвествует и рекомендациям по его использованию в PME, изложенным в литературе [6]. Принимая во внимание узкий диапазон температур между T_c и $T_{дег.}$, можно сделать зпключение, что применение L100-55 в термоэкструзии ограничено с учетом того, что деструкция полимера может происходить и до достижения $T_{дег.}$ [5]. В этой связи использование ИПЭК EPO/L100-55, содержащего, по данным элементного анализа, двухкратный мольный избыток термопластичного EPO, позволило бы уменьшить результирующую температуру экструзионного процесса и расширить температурный диапазон применения L100-55.

С целью детального изучения влияния нагрева на термические свойства полученного образца поликомплекса нами был использован метод высокотемпературной микроскопии. На рисунке 3 видно, что нагревание образца ИПЭК до температуры 180 °C не приводит к изменению цвета расплава поликомплеса, что свидетельствует об отсутсвии термической деградации образующих его сополимеров. В то же время при 250 °C происходит побурение расплава ИПЭК, являющееся следствием начала его термодеструкции.

С целью понимания процессов, происходящих при нагревании исследуемых образцов сополимеров, в сравнении с ИПЭК и ФС, аналогичной по составу, нами был использован метод модулированной ДСК.

мДСК, как известно, позволяет произвести прецизионное разделение необратимых процессов, таких как отделение влаги (свободной, химически не связанной воды), и обратимых явлений, к которым

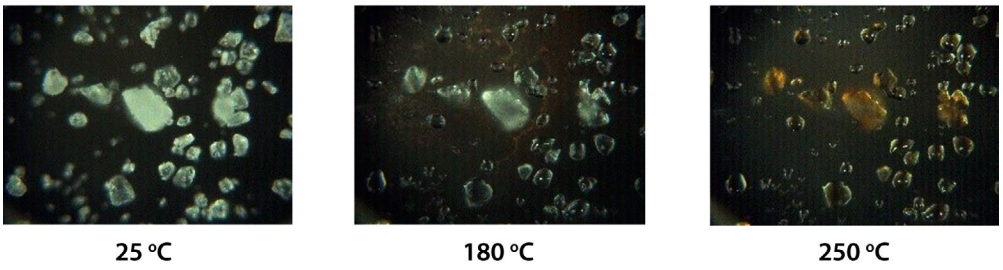


Рисунок 3. Изменение внешнего вида образца ИПЭК EPO/L100-55 при нагревании с использованием метода высокотемпературной микроскопии

Figure 3. Changes in the appearance of IPEC EPO/L100-55 sample upon heating using high temperature microscopy

относится определение T_c. Аморфная природа полимеров подтверждается наличием температуры стеклования и отсутствием эндотермы плавления [21–23].

Результаты представлены на рисунке 4 в виде зависимости обратимого теплового потока от повышения температуры. На мДСК-термограмме EPO наблюдается наличие T_c при 52,9 ± 3,1 °C. В случае L100-55 его T_c регистрируется при 125,1 ± 2,2 °C. Выявленные температуры стеклования исходных сополимеров согласуются как с нашими ранее проведенными исследованиями, так и с данными литературы [24–27]. В ходе термического анализа полученного ИПЭК единственная T_c регистрируется при 77,3 ± 1,1 °C, то есть между температурами стеклования образующих поликомплекс сополимеров. В то же время на мДСК-термограмме ФС сополимеров выявлены обе T_c, что свидетельствует о несовместимости компонентов бинарной смеси. Образец ИПЭК, напротив, представляет собой однородную гомогенную структуру, в которой поликомплекс состоит из совместимых, стабилизированных кооперативным ионным взаимодействием сополимеров, что согласуется с данными литературы [8, 9, 28].

Синтез ИПЭК EPO/L100-55 с двухкратным мольным избытком термопластичного терполимера EPO позволил получить гомогенный и термически ста-

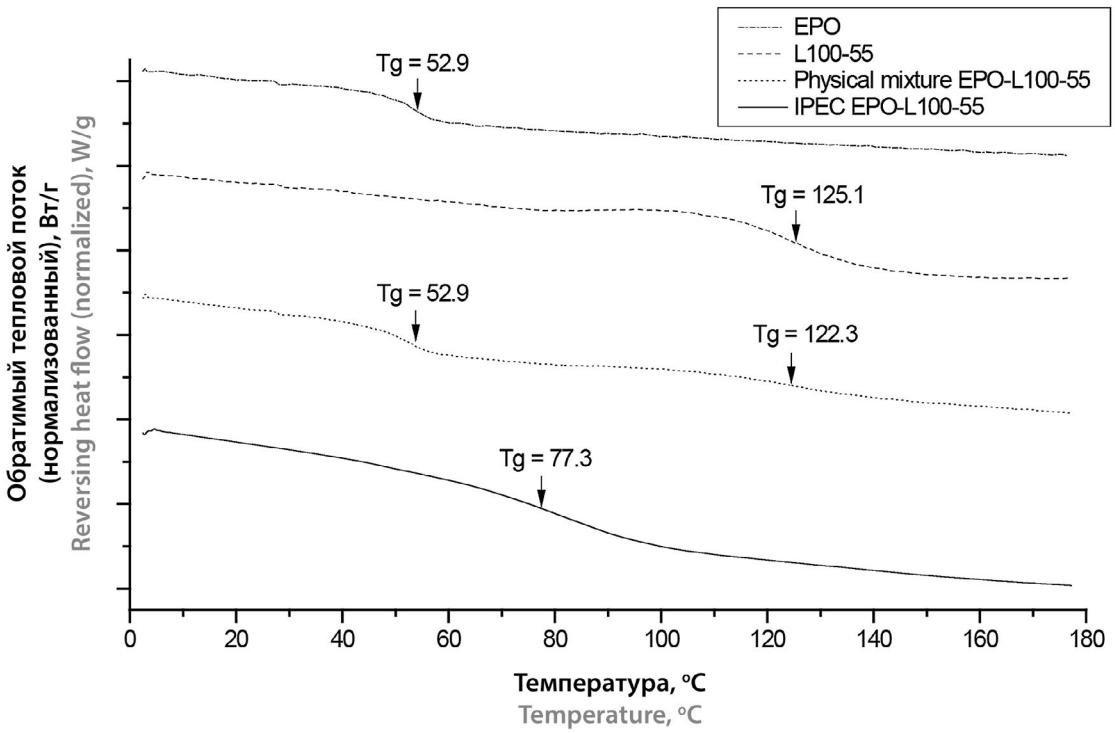


Рисунок 4. ДСК-термограммы индивидуальных сополимеров, их физической смеси (ФС) и ИПЭК (по оси ординат – обратимый тепловой поток, Вт/г; по оси абсцисс – температура, °C)

Figure 4. DSC thermograms of individual copolymers, their physical mixture (PM) and IPEC (ordinate – reversing heat flow, W/g; abscissa – temperature, °C)

бильный носитель с уменьшенной результирующей T_c и тем самым расширить перспективы использования поликомплекса в термоэкструзии.

Как известно, успешная реализация процесса термоэкструзии с точки зрения технологичности и экструдируемости лекарственно-полимерных смесей в значительной степени влияет на реологию их расплавов. При этом знание реологических характеристик носителя является ключевым для понимания свойств текучести и микроструктурных особенностей размягченного после достижения температуры стеклования полимера, влияющих на оптимизацию условий процесса термоэкструзии, включая температуру и крутящий момент, определяющие нагрузку на двигатель экструдера [6].

Кроме того, структура полимеров играет важную роль в определении T_c и вязкости расплава, поскольку их молекулярная масса (ММ) зависит от длины цепи, а также от степени и типа замещений в основной цепи макромолекул. В общем случае вязкость расплава полимера при заданной температуре является показателем скорости перемещения полимерных цепей друг относительно друга и зависит от их гибкости и степени их переплетения. Полимеры с большей длиной цепи имеют более высокую степень переплетения цепей, что приводит к более высокой вязкости расплава [19].

Принимая во внимание сопоставимые ММ изучаемых сополимеров 150 кДа и 250 кДа в случае EPO и L100-55 соответственно, мы провели изучение реологических свойств расплава полученного ИПЭК с помощью реометра. Согласно представленной кривой изменения вязкости в зависимости от температуры (рисунок 5), вязкость расплава поликомплекса уменьшается с увеличением температуры в диапазоне от 90 до 110 °C, то есть на 10–30 °C выше его T_c. С учетом того, что рекомендованный для термоэкструзии диапазон температур для EPO составляет 127–150 °C (при T_c = 47–57 °C, $T_{дег.}$ > 250 °C), а в случае L100-55 – до его $T_{дег.}$ = 176 °C (при T_c = 110–125 °C), то для ИПЭК вполне подходящим может оказаться тот же диапазон, что и для EPO, то есть 120–150 °C, что ниже порогового значения $T_{дег.}$ L100-55.

Вязкость расплава, как известно, обеспечивает оптимальный поток и смешивание в экструдере. Слишком высокая вязкость расплава может стать причиной чрезвычайно высокого крутящего момента, что будет приводить к перегрузке механических возможностей экструдера, а увеличение времени пребывания в матрице может привести к нежелательной деградации ЛВ и/или полимера-носителя, что, безусловно, необходимо учитывать [6, 29–33].

Таким образом, выбор условий термоэкструзии будет определяться не только технологическими характеристиками (вязкость расплавов «ЛВ – носитель»), но и физико-химическими свойствами (растворимость ЛВ в носителе, способность к взаимодействию в системе «ЛВ – полимер» и, как следствие, их совместимость).

Как известно, ИНД может существовать в различных полиморфных кристаллических формах – α, β, γ, δ, ε, ζ и η, основными из которых являются α- и γ-формы, различающиеся характером и количеством межмолекулярных водородных связей, соединяющих

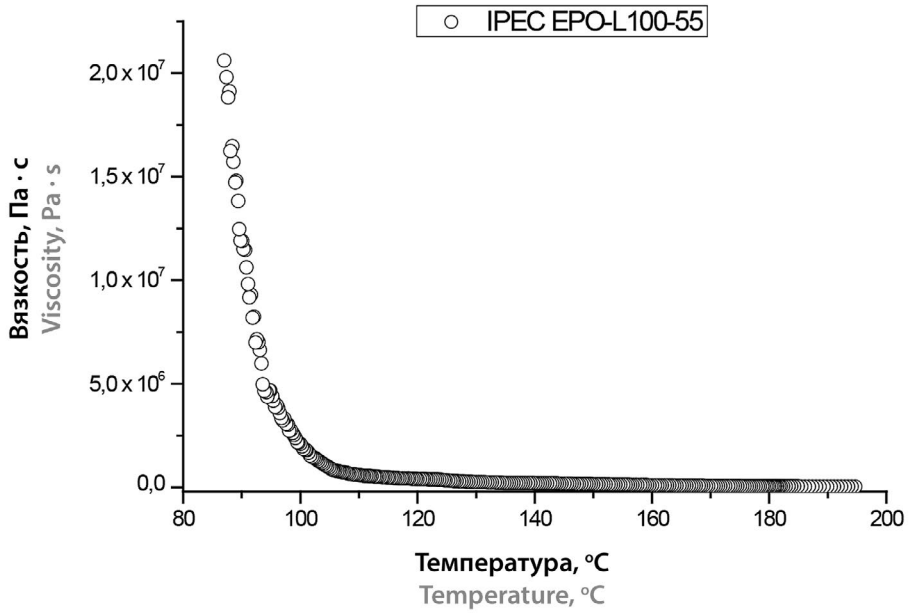


Рисунок 5. Зависимость вязкости расплава образца ИПЭК EPO-L100-55 от температуры (по оси ординат – вязкость, Па · с; по оси абсцисс – температура, °C)

Figure 5. Viscosity of IPEC EPO-L100-55 sample as a function of the temperature (ordinate – viscosity, Pa · s; abscissa – temperature, °C)

две (γ-форма) или три (α-форма) молекулы ИНД [34]. При этом лишь γ-форма является термодинамически стабильной, в то время как α-ИНД является наиболее метастабильной его полиморфной формой [35–37]. Имеющийся у нас образец, согласно $T_{пл.}$, составившей 160,5 ± 1,2 °С, а также характеристическим полосам на ИК-спектре, подтвердил, что это γ-форма ИНД (рисунок 6, А).

Кроме того, согласно данным литературы, ИНД может достаточно легко переходить и в аморфную форму [34]. Для подтверждения ее образования провели повторное нагревание образца γ-формы ИНД до температуры 170 °С, то есть на 10 °С выше его $T_{пл.}$, после чего выдержали при данной температуре в течение 10 мин, а затем быстро охладили до температуры 0 °С и вновь нагрели до 170 °С. Температура стеклования образовавшейся в нашем случае аморфной формы ИНД регистрируется при 47,2 ± 1,1 °С (рисунок 6, Б), что также согласуется с данными литературы [35–40].

Как известно, подбор соотношения «полимер – ЛВ» для последующего использования в термоэкструзии производится термическим анализом их бинарных смесей с регистрацией результирующих значений единственной T_c, подтверждающей совместимость компонентов системы вследствие, как правило, физико-химического взаимодействия. Оптимальным является тот состав, что характеризуется наибольшей температурой стеклования [9, 34].

Принимая во внимание, что ЛВ, индивидуальные сополимеры и поликомплекс имеют различающиеся температуры стеклования: 47,2 ± 1,1 °С (ИНД), 52,9 ± 3,1 °С (ЕРО), 77,3 ± 1,1 °С (ИПЭК) и 125,1 ± 2,2 °С (L100-55), предварительный подбор оптимальных соотношений «носитель – ИНД» проводили с помощью метода мДСК.

На диаграммах представлены зависимости изменений T_c образцов в составе бинарных смесей на основе ЕРО-ИНД (рисунок 7, А), L100-55-ИНД (рисунок 7, Б) и ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД (рисунок 7, В). Согласно приведенным данным видно, что только в случае бинарных смесей, содержащих поликатион ЕРО, способный, как известно, к взаимодействию с анионным ИНД, наблюдается четко выраженный экстремум при соотношении (по массе) 30:70 (ЕРО-ИНД) и 40:60 (ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД). В случае термического исследования бинарных смесей с участием полианоинного L100-55 и ИНД с учетом отсутствия их физико-химического взаимодействия выбрать оптимальный состав не представилось возможным. Для корректности сравнительного анализа при выборе соотношения L100-55-ИНД руководствовались тем же составом, что был выявлен для ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД, – 40:60.

При выполнении термоэкструзии руководствовались, таким образом, составами бинарных смесей [ЕРО-ИНД, L100-55-ИНД, ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД], при которых они имели максимальное значение температур стеклования – T_{cmax}. Для ЕРО-ИНД оно составило 30/70, а для ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД и L100-55-ИНД – 40/60.

На рисунке 8 представлен внешний вид полученных термоэкструдированных гранул. Следует отметить, что, несмотря на близкие по содержанию количества включенного ИНД, гранулы отличаются не только интенсивностью окраски, но и степенью прозрачности. Так, прозрачными получились гранулы ЕРО-ИНД и ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД. Гранулы, на основе ФС ЕРО-L100-55-ИНД представляют собой непрозрачные системы, что, по всей видимости, обусловлено неполным растворением включенных в состав ФС компонентов в процессе термоэкструзии и последующего охлаждения. Буроватая окраска гранул L100-

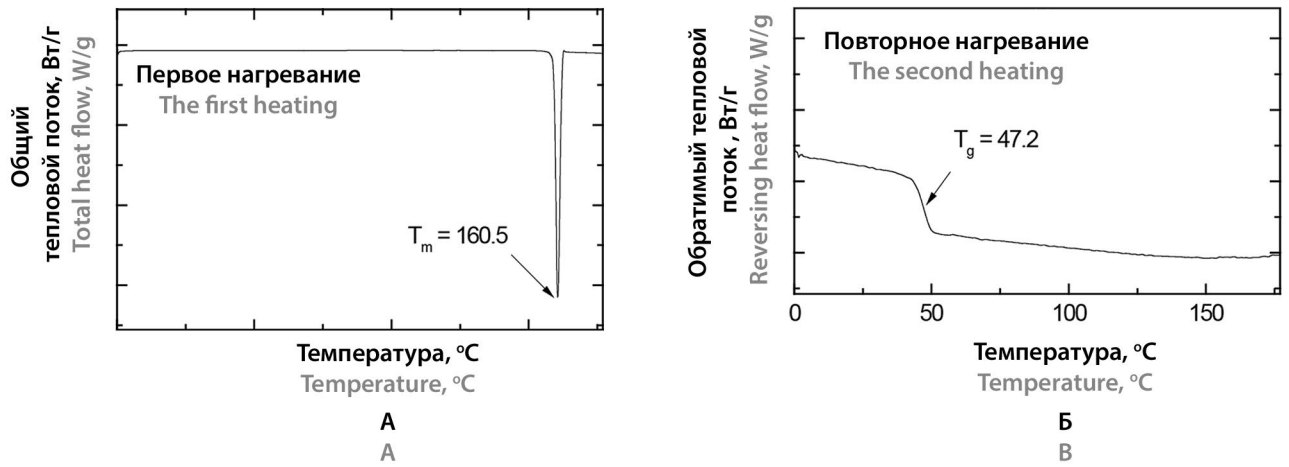


Рисунок 6. ДСК-термограммы образца индометацина при первом (А) и повторном нагревании (Б) (по оси ординат): А – общий тепловой поток, Вт/г; Б – обратимый тепловой поток, Вт/г; по оси абсцисс – температура, °С

Figure 6. DSC thermograms of indomethacin sample at first (A) and second (B) heating (ordinate): A – total heat flow, W/g; B – reversing heat flow, W/g; abscissa – temperature, °C

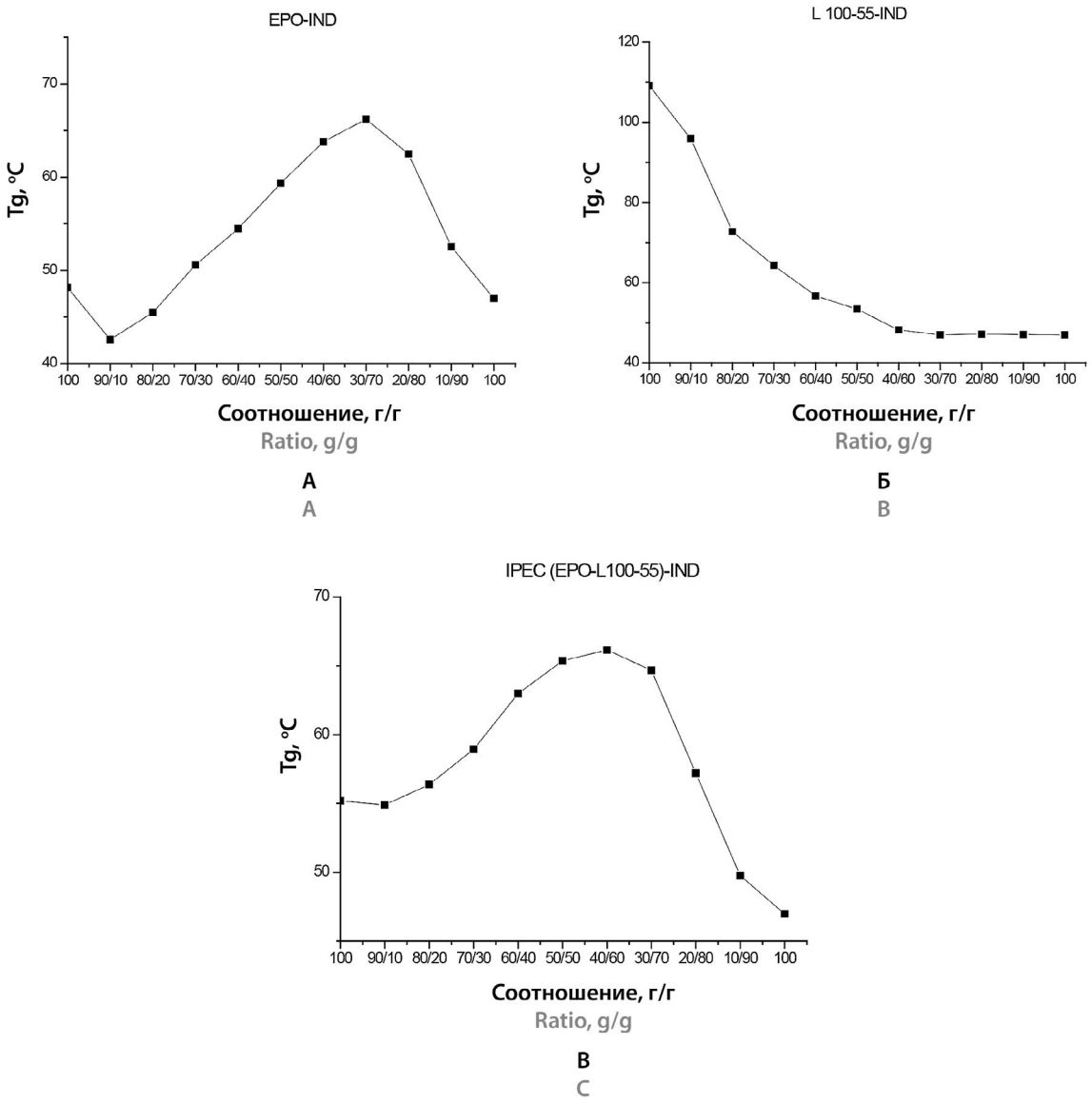


Рисунок 7. Зависимости изменений температур стеклования (T_c) образцов в зависимости от соотношения «ИНД – носитель» (по массе) в системах, в рамках моделирования условий термоэкструзии:

А – ЕРО-ИНД; Б – L100-55-ИНД; В – ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД (по оси ординат – T_c, °С; по оси абсцисс – соотношение «ИНД – носитель», г/г)

Figure 7. Dependences of changes in glass transition temperatures (T_g) of samples depending on the ratio of IND-carrier (by mass) in the systems under modelling conditions of HME:

A – EPO-IND; B – L100-55-IND; C – IPEC (EPO-L100-55)-IND (ordinate – T_g, °C; abscissa – ratio IND-carrier, g/g)

55-ИНД может быть обусловлена особенностью распределения ИНД в полианионном сополимере без их физико-химического взаимодействия, а также высокой вязкостью расплава L100-55 и вследствие этого трудностями экструдирования, что согласуется с данными литературы [29, 30].

Необходимо отметить, что метод мДСК хорошо зарекомендовал себя и как способ моделирования условий термоэкструзии, позволяющий оценить не только химическую однородность, но и совместимость компонентов бинарных систем [3].

В этой связи для предварительной оценки подобранных на основе анализа T_c составов «ИНД – носитель» было проведено сравнительное изучение аналогичных по соотношению композиций ФС в сравнении с термоэкструдированными.

На рисунке 9, А–Г, представлены термограммы образцов, полученные на термоэкструдере, в сравнении с аналогичными по составу образцами ФС, но полученными при моделировании условий термоэкструзии с помощью метода ДСК, а именно с использованием трех последовательных сегментов: нагрева

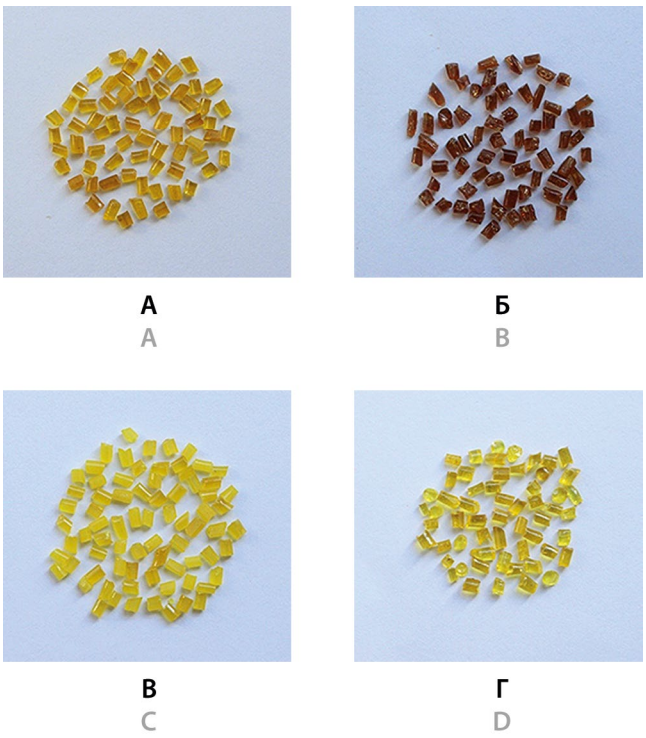


Рисунок 8. Внешний вид полученных термоэкструдированных гранул с индометацином:

А – ЕРО-ИНД; Б – L100-55-ИНД; В – ФС ЕРО-L100-55-ИНД; Г – ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД

Figure 8. Appearance of the obtained thermoextruded pellets with indomethacin

A – EPO-IND; B – L100-55-IND; C – PM EPO-L100-55-IND; D – IPEC (EPO-L100-55)-IND

до температуры 170 °С, охлаждения до температуры 0 °С и нагрева до 180 °С в режиме модуляции по методике, изложенной выше.

Все анализируемые системы, за исключением экструдата L100-55-ИНД, как в процессе термоэкструзии, так и при моделировании аналогичных процессов методом ДСК имеют весьма близкие T_c, являющиеся результатом происходящих при нагревании процессов, а именно: стеклования ЕРО (при 52 °С), взаимодействия ЕРО с ИНД – перехода кристаллической формы ИНД в аморфную и стеклования продукта их взаимодействия при 64–66 °С. В этой связи использование метода мДСК с целью предварительного термического анализа бинарных смесей «ЛВ – носитель» может быть рекомендовано для выяснения вопросов их физико-химической совместимости в условиях, приближенных к процессам, что происходят в результате термоэкструзии. В случае сравнительного изучения систем на основе L100-55-ИНД очевидно, что в случае HME-моделирования мы наблюдаем стеклование ФС несколько раньше, чем остальных образцов – при 48,2 ± 1,1 °С, что соответствует T_c аморфной формы ИНД. В результате же термоэкструзии T_c фиксируется при температуре 52,6 ± 1,2 °С, что, очевидно, соответствует стеклованию ЕРО. При дальнейшем нагревании образца L100-55-ИНД происходит плавление ЛВ, наблюдаемое при температуре 157,3 ± 1,1 °С, что подтверждает, что ИНД находится в термоэкструдате в кристаллической, а не в аморфной форме.

Дополнительно к термическому анализу образцы были проанализированы и методом ИК-спектроскопии. Образцы термоэкструдатов, содержащие в своем составе ЕРО, а именно ЕРО-ИНД, ФС ЕРО-L100-55-ИНД и ИПЭК-ИНД (рисунок 10, А, В, Г), характеризуются смещением полосы ИНД с 1689 до 1678 $см^{-1}$, свидетельствующим о переходе исходной кристаллической формы ЛВ в аморфную в результате физико-химического взаимодействия ЕРО с ИНД, что также подтверждается результатами мДСК-анализа. Кроме того, у всех термоэкструдированных образцов, содержащих ЕРО, ИК-спектры характеризуются появлением полосы при 1570 $см^{-1}$, подтверждающей образование ионных связей вследствие взаимодействия ионизированных карбоксильных групп ИНД и L100-55 с диметиламиногруппами ЕРО вследствие образования ПЛК и ИПЭЛК соответственно. В то же время на ИК-спектрах образцов ФС ЕРО-ИНД и ФС ЕРО-L100-55-ИНД, полученных для последующего моделирования условий термоэкструзии с использованием ДСК, наблюдаются отличная от 1570 $см^{-1}$ полоса при 1593 $см^{-1}$, характерная для спектра ИНД. Последнее является подтверждением того, что только моделирование условий реактивной термоэкструзии (РТЭ) может привести как к механохимическому взаимодействию молекул ИНД с макромолекулами ЕРО, в том числе и в составе ИПЭК, так и к межмакромолекулярному взаимодействию противоположно заряженных сополимеров в составе ФС. Последнее подтверждается весьма близкими значениями результирующих T_c образцов термоэкструдатов и сравниваемых с ними ФС, полученных при моделировании условий РТЭ.

В случае анализа экструдата L100-55-ИНД в сравнении с его физической смесью L100-55 + IND (рисунок 10, Б) на ИК-спектре ФС наблюдаются полосы при 1713 и 1689 $см^{-1}$, характерные для исходной, кристаллической γ-формы ИНД. Однако при сравнении ИК-спектра с мДСК-термограммой образца ФС становится очевидным, что процесс нагревания все же приводит к образованию аморфной формы ИНД, подтверждением чему является фиксируемая на термограмме T_c при 48,2 ± 1,1 °С (рисунок 9, Б). Для экструдата, несмотря на небольшое смещение полосы ИНД с 1689 до 1692 $см^{-1}$, тем не менее также подтверждается его присутствие в γ-форме, что согласуется с данными мДСК-анализа по проявлению характерного пика плавления ЛВ, наблюдаемого при температуре 157,3 ± 1,1 °С.

С целью изучения процессов термической стабильности изучаемых сополимеров и включенного ИНД в составе полученных термоэкструдатов нами был также использован метод ТГА. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 11, А, Б. На ТГА-термограмме ЕРО-ИНД первая потеря мас-

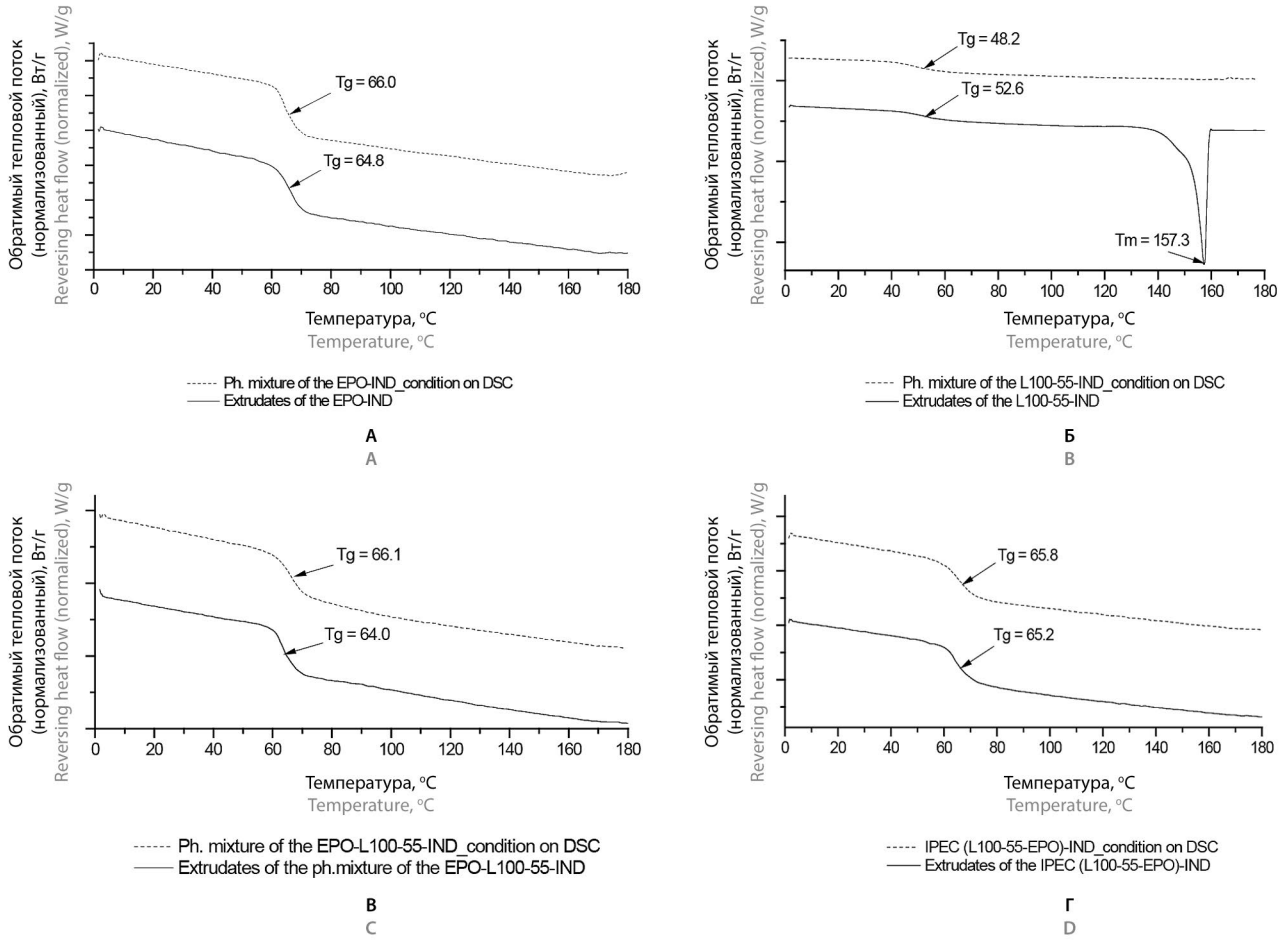


Рисунок 9. мДСК-термограммы экструдатов и образцов после моделирования условий термоэкструзии:
А – ФС ЕРО+ИНД и экструдата ЕРО-ИНД; Б – ФС L 100-55 + ИНД и экструдата L100-55-ИНД; В – ФС ЕРО + L100-55 + ИНД и ФС ИПЭК (ЕРО-L100-55) + ИНД; Г – экструдатов ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД и ФС ЕРО + L100-55 + ИНД (по оси ординат – обратимый тепловой поток, Вт/г; по оси абсцисс – температура, °С)

Figure 9. mDSC-thermograms of extrudates and samples after simulation of thermoextrusion conditions:
A – PM EPO + IND and EPO-IND extrudate; B – PM L100-55 + IND and L100-55-IND extrudate; C – PM EPO + L100-55 + IND and PM IPEC (EPO-L100-55) + IND; D – IPEC (EPO-L100-55)-IND and PM EPO + L100-55 + IND (ordinate – reversing heat flow, W/g; abscissa – temperature, °C)

сы происходит при 258–333 °С (74 %). При сравнении с индивидуальными компонентами потеря в массе образцов происходит у ЕРО при 264–310 °С (27 %), а у ИНД – при 278–318 °С (96 %), то есть включение в термоэкструдат ИНД практически не влиет на температурный диапазон, связаный с образованием шестичленных циклических ангидридов, но потенциирует уменьшение массы с 27 до 74 %. Вторая потеря массы наблюдается при 416–444 °С (22 %), что также близко к значениям деструкции для ЕРО – 402–454 °С, но отличается процентом снижения в массе (69 %). На ТГА-термограмме экструдата ИНД-L100-55 первая потеря массы происходит при 263–314 (68 %), что по сравнению с L100-55 (177–206 °С при потере в массе 6 %) свидетельствует об увеличениии термической стабильности сополимера в присутсвии ИНД и сдвигает начало его термической деградации на 86 °С. Второе снижение массы экструдата ИНД-L100-55 наблюдается при 373–416 °С (22 %), что близко к значениям для индивидуального L100-55 (365–421 °С при потере в массе 88 %).

В случае экструдатов на основе ФС с ИНД первое снижение в массе для ФС наблюдается при 253–333 °С (70 %), а второе – при 416–446 °С (26 %), что практически совпадает с результатами для экструдата на основе ЕРО-ИНД (258–333 °С при потере в массе 74 % и 416–444 °С при потере в массе 22 %). ТГА экструдатов на основе ИПЭК ЕРО-L100-55)-ИНД показал сопоставимые с ФС, аналогичной по составу, результаты, а именно: первое снижение в массе для ИПЭК наблюдается при 248–328 °С (70 %), а второе – при 392–423 °С (24 %). Получается, что механохимическое

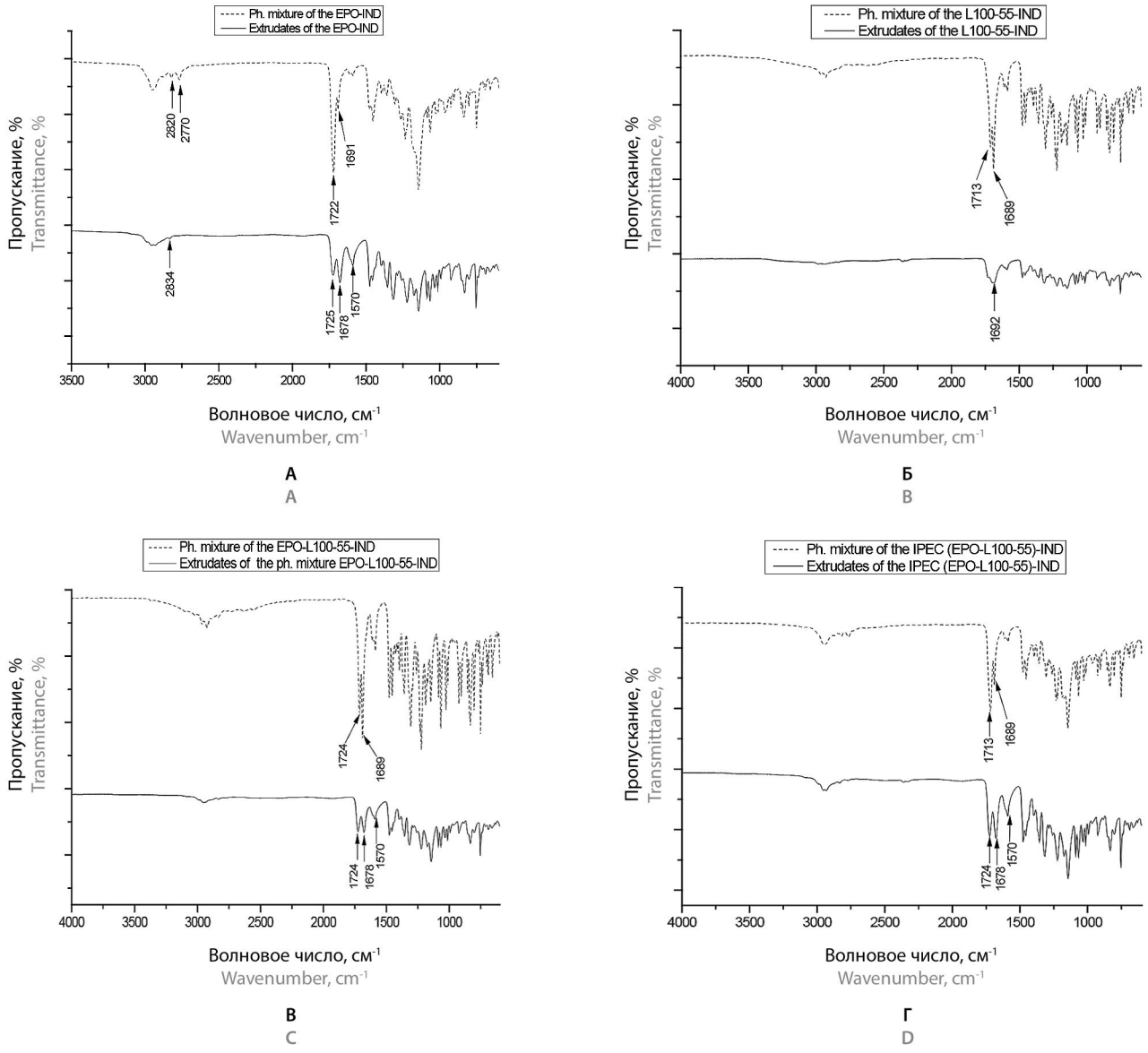


Рисунок 10. ИК-спектры экструдатов и образцов после моделирования условий термоэкструзии:

А – ФС ЕРО + ИНД и экструдата ЕРО-ИНД; Б – ФС L 100-55 + ИНД и экструдата L100-55-ИНД; В – ФС ЕРО + L100-55 + ИНД и ФС ИПЭК (ЕРО-L100-55) + ИНД; Г – экструдатов ИПЭК (ЕРО-L100-55)-ИНД и ФС ЕРО + L100-55 + ИНД (по оси ординат – пропускание, %; по оси абсцисс – волновое число, см$^{-1}$)

Figure 10. IR spectra of extrudates and samples after simulation of thermoextrusion conditions:

A – PM EPO + IND and EPO-IND extrudate; B – PM L 100-55 + IND and L100-55-IND extrudate; C – PM EPO + L100-55 + IND and PM IPEC (EPO-L100-55) + IND; D – IPEC (EPO-L100-55)-IND and PM EPO + L100-55 + IND extrudates (ordinate – transmission, %; abscissa – wavenumber, cm^{-1})

взаимодействие между ЕРО и ИНД выполняет ключевую роль в структуре образующегося экструдата как в случае ФС, так и в случае поликомплекса.

С целью выяснения вопроса о стабильности аморфной формы ИНД и возможного перехода в γ-форму или другие полиморфные модификации в составе термоэкструдатов нами был использован метод БИК-спектроскопии, позволяющий, как известно, оценить эти превращения лучше, чем ИК-спектроскопия в среднем диапазоне [41–42]. На рисунке 12 представлен БИК-спектр экструдатов на основе ИПЭК ЕРО-L100-55)-ИНД в сравнении с γ-формой ИНД после хранения в течение одного года.

Согласно данным литературы, основные различия между кристаллической и аморфной формами ИНД наблюдаются в интервале длин волн от 1650 до 1900 нм [43–44]. В этом диапазоне наблюдаются полосы при 1860 нм, обусловленные колебаниями карбоксильной группы, и при 1696 нм, характерные для

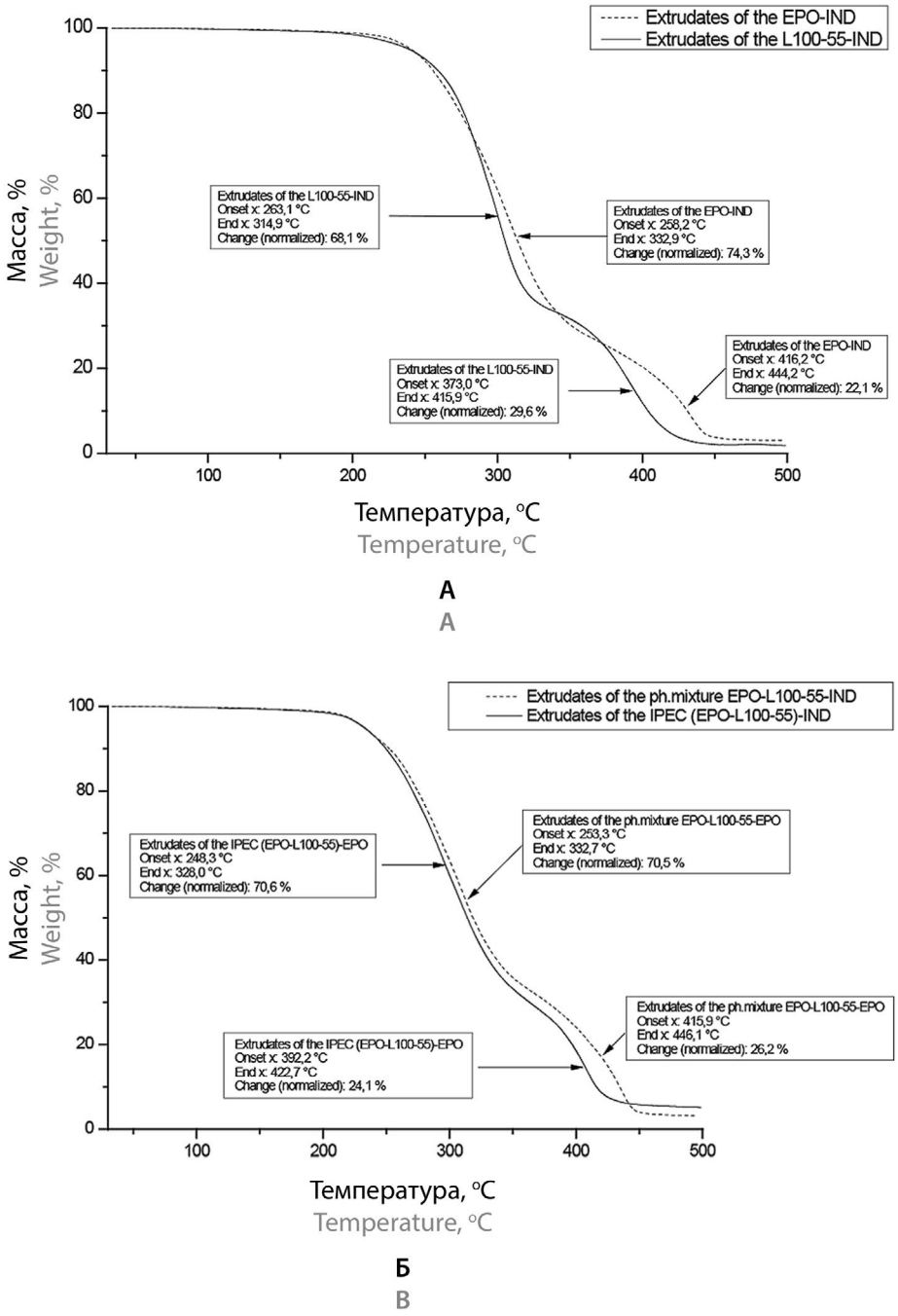


Рисунок 11. ТГА-термограммы:

А – экструдатов ЕРО-ИНД и L100-55-ИНД; Б – экструдатов ФС (ЕРО-L100-55)-ИНД и ИПЭК ЕРО-L100-55-ИНД (по оси ординат – масса, %; по оси абсцисс – температура, °С)

Figure 11. TGA thermograms:

A – EPO-IND and L100-55-IND extrudates; B – PM (EPO-L100-55)-IND and EPO-L100-55-IND IPEC extrudates (ordinate – weight, %; abscissa – temperature, °C)

БИК-спектра γ-формы ИНД. В то же время полоса при 1666 нм подтверждает наличие аморфной формы. Следует отметить, что интенсивность всех присутствующих пиков в значительной степени снижена в образце поликомплексного экструдата. Таким образом, БИК-спектроскопия подтвердила наличие в структуре экструдата на основе ИПЭК ЕРО-L100-55)-ИНД как аморфной, так и кристаллической формы γ-формы ИНД, что, по всей видимости, связано с частичным переходом метастабильной аморфной формы в кристаллическую с течением времени и согласуется с имеющимися в литературе данными [34].

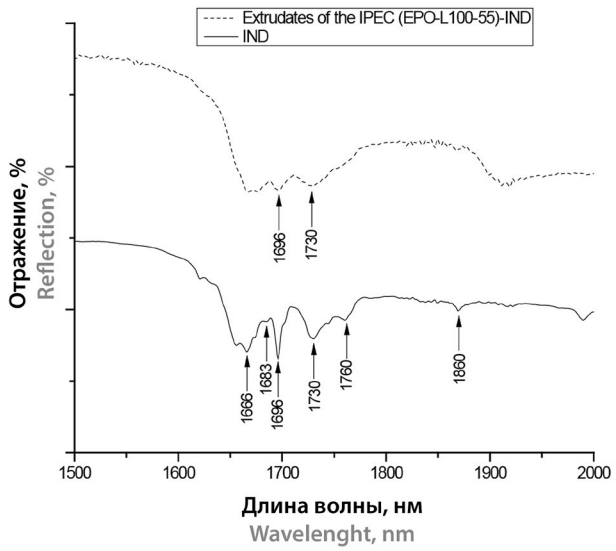


Рисунок 12. БИК-спектры ИНД и экструдата ИПЭК (EPO-L100-55)-ИНД (по оси ординат – отражение, %; по оси абсцисс – длина волны, нм)

Figure 12. NIR spectra of IND and IPEC extrudate (EPO-L100-55)-IND (ordinate – reflection, %; abscissa – wavelength, nm)

Следующим этапом исследований было изучение процессов высвобождения ИНД из полученных экструдатов в среды с постепенно увеличивающимися значениями pH (от 1,2 до 7,4). Сравнительное изучение процессов выхода ИНД из поликомплексных матриц на основе комплементарных пар сополимеров Eudragit®, проведенное нами ранее, показало, что профили высвобождения ЛВ из систем, близких по структуре к изучаемым, имеют схожий характер, независимо от использования буферных или биорелеватных сред [25]. В этой связи исследования по высвобождению ИНД проводили только в буферных растворах, то есть в условиях, моделирующих продвижение по ЖКТ.

На рисунке 13 представлены профили высвобождения ИНД из экструдатов на основе индивидуальных полимеров EPO и L100-55.

Высвобождение ИНД из экструдатов EPO-ИНД при pH 1,2 происходит очень быстро. Выход ЛВ достигает 100 % в течение получаса. По всей видимости, это связано с улучшением растворимости ИНД (нерастворимого в кислых средах) в присутствии поликатиона (EPO растворим при pH < 5,0). Кроме того, дополнительной причиной ускорения высвобождения ИНД может быть образование полиэлектролит-лекарственного комплекса (ПЛК) вследствие солеобразования между поликатионом (EPO) и анионом (ИНД).

Характер высвобождения ИНД из экструдатов с L100-55-ИНД представляет собой отсроченно-замедленный профиль. Контроль скорости выхода ИНД и в данном случае определяется свойствами формообразующего сополимера. Ввиду известной pH-зависимой растворимости L100-55 при достижении pH > 5,5, согласно полученному профилю, выход ИНД начинается со сменой кислой среды с pH = 1,2 (имитирующей

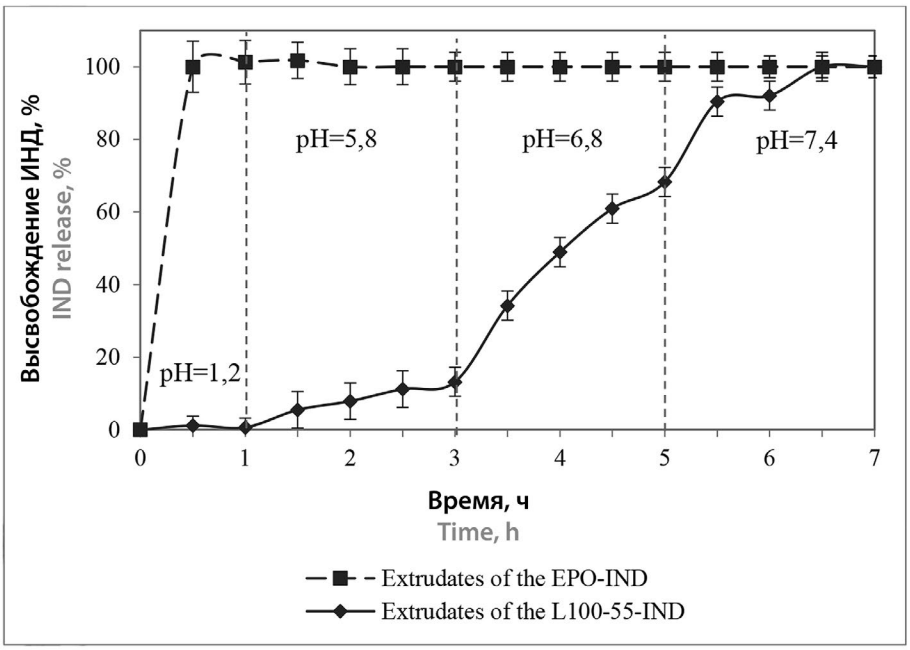


Рисунок 13. Профили высвобождения индометацина из термоэкструдированных гранул на основе EPO-ИНД и L100-55-ИНД (по оси ординат – высвобождение ИНД, %; по оси абсцисс – время, ч)

Figure 13. Release profiles of indomethacin from EPO-IND and L100-55-IND based thermo-extruded pellets (ordinate – IND release, %; abscissa – time, h)

среду голодного желудка) на среду слабокислую с pH = 5,8 (имитирующую среду сытого желудка и перехода в верхние отделы тонкой кишки). С повышением pH происходит набухание и растворение полианионного сополимера вследствие его ионизации и гидратации, что и приводит к постепенному увеличению скорости высвобождения ИНД по мере увеличения значений pH каждой из последующих сред (pH 6,8–7,4), соответствующих диапазону pH в просвете слепой и правой половины толстой кишки (pH 6–7,5), и завершается в терминальном отделе подвздошной кишки и в проксимальных отделах толстой кишки (pH 7–7,5) [45]. Таким образом, профиль высвобождения кислотоустойчивого и энтеросолюбильного сополимера L100-55 позволяет создавать экструдаты, обеспечивающие выход ИНД по классическому отсроченному механизму транспорта, то есть только при достижении оптимальной зоны его всасывания.

На рисунке 14 представлены профили высвобождения ИНД из поликомплексных экструдатов ИПЭК (EPO-L100-55)-IND в сравнении с ФС EPO-L100-55-IND, аналогичной по составу.

Высвобождение ИНД из экструдатов на основе ФС EPO-L100-55-ИНД, как и случае экструдатов EPO-ИНД, начинается при pH 1,2, но обеспечивает лишь незначительный выход ЛВ (порядка 30 %). Благодаря содержанию в составе ФС кислотоустойчивого L100-55 стремительный выход ИНД сдвигается из кислой среды (pH = 1,2) в слабокислую (pH = 5,8), обеспечивая 100 % выход ИНД к 2,5 ч эксперимента. Иначе говоря, образование ПЛК EPO-ИНД не только в результате термоэкструзии, но и в процессе высвобождения (в результате возникающих ионных обменов между ионизированными молекулами ИНД и звеньями макромолекул EPO) превалирует над возможным образованием интерполиэлектролитных контактов между цепочками комплементарных макромолекул EPO-L100-55, что отмечалось нами в ранее опубликованных исследованиях [14].

Выход ИНД из поликомплексных экструдатов (EPO-L100-55)-ИНД характеризуется импульсным профилем высвобождения в соответствии с ранее выявленным механизмом, свойственным системам на основе ИПЭЛК, содержащих ИНД, и характеризующимся последовательным, ступенчато нарастающим выходом ЛВ (в данном случае около 70 % ИНД к 7 ч эксперимента). Такой, на первый взгляд, необычный характер высвобождения, впервые описанный для осмотически активных систем типа OROS®, оказался возможным благодаря последовательно и параллельно протекающим процессам. Замедленный выход с поверхностных слоев экструдированных гранул поначалу связанных в ИПЭЛК молекул ИНД в кислой среде затруднен наличием нерастворимых и гидрофобных участков кислотоустойчивого сополимера L100-55 в составе ИПЭК. Постепенное набухание при переходе в слабокислую среду вследствие прогрессирующей ионизации звеньев полианиона L100-55 приводит к усилению проницаемости структурных фрагментов ИПЭК, в результате чего доступными для

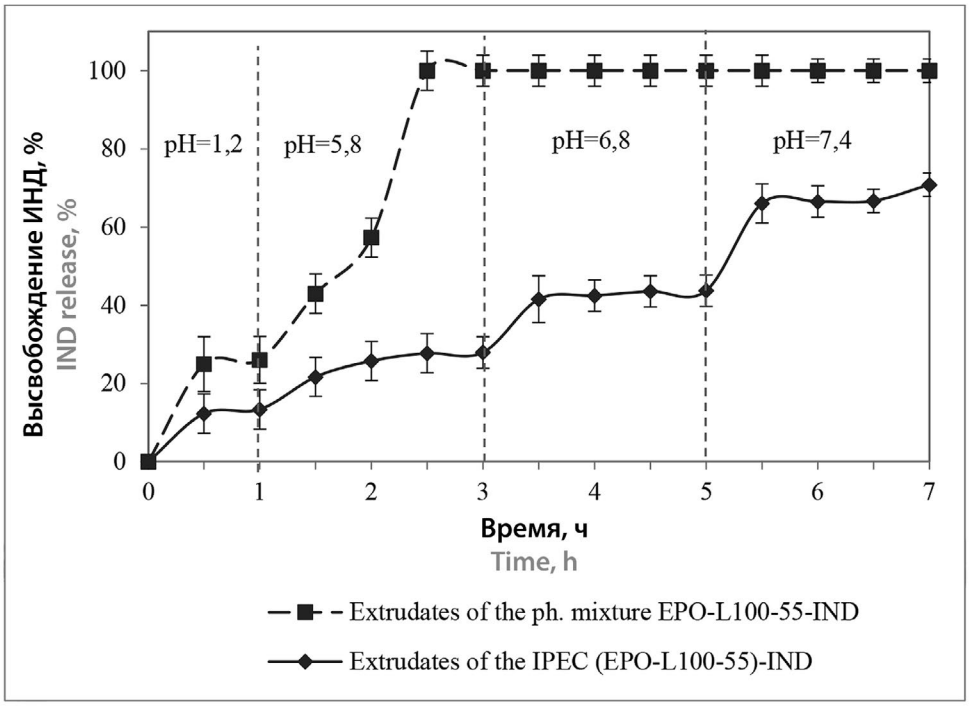


Рисунок 14. Профили высвобождения индометацина из термоэкструдированных гранул на основе ФС EPO-L100-55-ИНД и ИПЭК (EPO-L100-55)-ИНД (по оси ординат – высвобождение ИНД, %; по оси абсцисс – время, ч)

Figure 14. Release profiles of indomethacin from thermally extruded pellets based on PM EPO-L100-55-IND and IPEC (EPO-L100-55)-IND (ordinate – IND release, %; abscissa – time, h)

высвобождения оказываются и глубокорасположенные участки ИПЭЛК. Однако в силу снижения плотности заряда терполимера ЕРО (вследствие его растворимости до pH < 5,0) на участках ИПЭК происходит контактирование их структурных фрагментов, сопровождающееся уменьшением размеров пор, вновь затрудняющим процессы диффузии ИНД из диссоциирующих ИПЭЛК. При смене pH среды до 6,8 происходит еще большее увеличение плотности заряда на цепочках L100-55, но гидрофобность фрагментов ИПЭК благодаря наличию полностью неоинизированных цепочек ЕРО, свободных от интерполиэлектролитных связей, приводит к ожидаемому снижению набухающей способности поликомплексных фрагментов. Последнее приводит вновь к тому, что нарастающая с увеличением значения pH растворимость ИНД ограничивается набухаемостью ЕРО-содержащих фрагментов в структуре ИПЭК и приводит к снижению диффузии молекул ЛВ и очередному выходу на постоянный, лимитирующий уровень его концентрации. В результате очередная и заключительная смена среды до значения pH = 7,4 приводит к аналогичному предыдущим стадиям импульсному высвобождению следующей порции ИНД благодаря диффузии молекул ЛВ из все более глубокорасположенных фрагментов термоэкструдированных гранул.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования методом реактивной термоэкструзии было получено 4 типа гранул с индометацином на основе сополимеров Eudragit® марок ЕРО и L100-55, ИПЭК с их участием и физической смеси, аналогичной ему по составу. Подбор и отработка условий термоэкструзии были проведены с использованием методов реометрии, высокотемпературной микроскопии и модулированной ДСК, позволившей смоделировать и воспроизвести условия термоэкструзии. Полученные гранулы были охарактеризованы с использованием методов термического (ДСК и ТГА) и спектрального (ИК и БИК) анализа. На основании изучения высвобождения индометацина из гранул в моделирующих продвижение по ЖКТ условиях гранулы на основе ЕРО и ФС ЕРО/L100-55 обеспечивают быстрый выход индометацина в кислой (имитирующей среду голодного желудка) и слабокислой (среда, имитирующая сытый желудок и верхние отделы тонкой кишки) средах соответственно, что может быть актуальным в рамках создания систем с немедленным высвобождением труднорастворимых ЛВ. В то же время гранулы с участием L100-55 показали наилучшие свойства по возможности использования их в системах доставки в просвет слепой кишки и правой половины толстой кишки (pH 6–7,5). Поликомплексные гранулы (на основе ИПЭК ЕРО/L100-55) позволяют получать пролонгированную систему с импульсным характером высвобождения, но с преимущественным выходом индометацина в просвет терминального отдела подвздошной кишки и проксимальных отделов толстой кишки (pH 7–7,5). Дальнейшее исследование полученных гранул с целью применения их в системах доставки индометацина является перспективным направлением.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. El-Egakey M. A., Soliva M., Speiser P. Hot extruded dosage forms. Technology and dissolution kinetics of polymeric matrices. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1971;46(1):31–52.
2. Patil H., Tiwari R. V., Repka M. A. Hot-Melt Extrusion: from Theory to Application in Pharmaceutical Formulation. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17(1):20–42. DOI: 10.1208/s12249-015-0360-7.
3. Repka M. A., Bandari S., Kallakunta V. R., Vo A. Q., McFall H., Pimparade M. B., Bhagurkara A. M. Melt extrusion with poorly soluble drugs – An integrated review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;535(1–2):68–85. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.056.
4. Mendonsa N., Almutairy B., Kallakunta V. R., Sarabu S., Thipsay P., Bandari S., Repka M. A. Manufacturing strategies to develop amorphous solid dispersions: An overview. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;55:101459. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.101459.
5. Parikh T., Gupta S., Meena A., Serajuddin A. T. Investigation of thermal and viscoelastic properties of polymers relevant to hot melt extrusion – III: Polymethacrylates and polymethacrylic acid-based polymers. *Journal of Excipients and Food Chemicals*. 2014;5:56–64.
6. Md Badruddoza A. Z., Moseson D. E., Lee H-G., Esteghamatian A., Thipsay P. Role of rheology in formulation and process design of hot melt extruded amorphous solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2024;664:124651. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.124651.
7. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Kemenova V. A., Rombaut P. Van den Mooter G. Eudragit E PO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: Comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged Eudragit L100 copolymers. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(7):2630–2641. DOI: 10.1021/mp4000635.
8. Mustafin R. I. Interpolymer combinations of chemically complimentary grades of Eudragit® copolymers: new direction in design of peroral solid dosage forms of drug delivery systems with controlled release (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011;45(5):28–39. (In Russ.)
9. Gallardo D. Manufacturing of matrix tablets by combining countercharged poly(meth)acrylate polymers to provide sustained release of highly soluble drugs. [Dissertation.] 2008. Available at: https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-11199/Dissertation%20Diego%20Gallardo%2012_03.pdf. Accessed: 23.11.2024.
10. Xanthos M., Dagli S. S. Compatibilization of polymer blends by reactive processing. *Polymer Engineering and Science*. 1991;31(13):929–935. DOI: 10.1002/pen.760311302.
11. Maniruzzaman M., Morgan D. J., Mendham A. P., Pang J., Snowden M. J., Douroumis D. Drug–polymer intermolecular interactions in hot-melt extruded solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;443(1–2):199–208. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.11.048.

12. Ming L., Zhefei G., Yongcheng L., Huishi P., Ling L., Xu L., Xin P., Chuanbin W. Application of Hot Melt Extrusion for poorly water-soluble drugs: Limitations, Advances and Future Prospects. *Current Pharmaceutical Design*. 2014;20(3):369–387.
13. Liu X., Zhou L., Zhang F. Reactive melt extrusion to improve the dissolution performance and physical stability of naproxen amorphous solid dispersions. *Molecular Pharmaceutics*. 2017;14(3):658–673. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00960.
14. Kindermann C., Matthée K., Strohmeyer J., Sievert F., Breitkreutz J. Tailor-made release triggering from hot-melt extruded complexes of basic polyelectrolyte and poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011;79(2):372–381. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.05.001.
15. Moustafine R. I., Sitenkov A. Y., Bukhovets A. V., Nasibullin S. F., Appeltans B., Kabanova T. V., Khutoryanskiy V. V., Van den Mooter G. Indomethacin-containing interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® E PO/S 100 copolymers as a novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;524(1–2):121–133. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.053.
16. Liu H., Zhang X., Suwardie H., Wang P., Gogos C. G. Miscibility Studies of Indomethacin and Eudragit® E PO by Thermal, Rheological and Spectroscopic Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;101(6):2204–2212. DOI: 10.1002/jps.23075.
17. Liu H., Wang P., Zhang X., Shen F., Gogos C. G. Effects of extrusion process parameters on the dissolution behavior of indomethacin in Eudragit® E PO solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;383(1–2):161–169. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.09.003.
18. Andrews G. P., Jones D. S., Diak O. A., McCoy C. P., Watts A. B., McGinity J. W. The manufacture and characterisation of hot-melt extruded enteric tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;69(1):264–273. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.11.001.
19. Sarode A. L., Sandhu H., Shan N., Malick W., Zia H. Hot melt extrusion (HME) for amorphous solid dispersions: Predictive tools for processing and impact of drug-polymer interactions on supersaturation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;48(3):371–384. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.12.012.
20. Sarode A. L., Sandhu H., Shan N., Malick W., Zia H. Hot melt extrusion for amorphous solid dispersions: temperature and moisture activated drug-polymer interactions for enhanced stability. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(10):3665–3675. DOI: 10.1021/mp400165b.
21. Maniruzzaman M., Pang J., Morgan D. J., Douroumis D. Molecular modeling as a predictive tool for the development of solid dispersions. *Molecular Pharmaceutics*. 2015;12(4):1040–1049. DOI: 10.1021/mp500510m.
22. Hörmann T.R., Jäger N., Funke A., Mürb R.-K., Khinast J. G., Paudel A. Formulation performance and processability window for manufacturing a dual-polymer amorphous solid dispersion via hot-melt extrusion and strand pelletization. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;553(1–2):408–421. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.035.
23. Bhatkande A., Narala S., Wang H., Narala N., Karnik I., Vemula S. K., Repka M. A. Extrusion-based three-dimensional printing of metronidazole immediate release tablets: Impact of processing parameters and in vitro evaluation. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2024;19:72. DOI: 10.1007/s12247-024-09878-y.
24. Van Duong T., Reekmans G., Venkatesham A., Van Aerschot A., Adriaensens P., Van Humbeeck J., Van den Mooter G. Spectroscopic Investigation of the Formation and Disruption of Hydrogen Bonds in Pharmaceutical Semicrystalline Dispersions. *Molecular Pharmaceutics*. 2017;14(5):1726–1741. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01172.
25. Moustafine R. I., Bobyleva V. L., Bukhovets A. V., Garipova V. R. Kabanova T. V., Kemenova V. A., Van den Mooter G. Structural transformations during swelling of polycomplex matrices based on countercharged (meth)acrylate copolymers (Eudragit® EPO/Eudragit® L100-55). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100:874–885. DOI: 10.1002/jps.22320.
26. Bukhovets A. V., Fotaki N., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Interpolymer complexes of Eudragit® copolymers as novel carriers for colon-specific drug delivery. *Polymers*. 2020;12(7):1459. DOI: 10.3390/polym12071459.
27. Gallardo D., Skalsky B., Kleinebudde P. Controlled release solid dosage forms using combinations of (meth)acrylate copolymers. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2008;13(5):413–423. DOI: 10.1080/10837450802202098.
28. Sester C., Ofridam F., Lebaz N., Gagnière E., Mangin D., Elaissari A. pH-Sensitive methacrylic acid–methyl methacrylate copolymer Eudragit L100 and dimethylaminoethyl methacrylate, butyl methacrylate, and methyl methacrylate tri-copolymer Eudragit E100. *Polymers for Advanced Technology*. 2020;31:440–450. DOI: 10.1002/pat.4780.
29. Liu X., Ma X., Kun E., Guo X., Yu Z., Zhang F. Influence of lidocaine forms (salt vs. freebase) on properties of drug–Eudragit® L100-55 extrudates prepared by reactive melt extrusion. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;547(1–2):291–302. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.009.
30. Sauer D., Zheng W., Coots L. B., McGinity J. W. Influence of processing parameters and formulation factors on the drug release from tablets powder-coated with Eudragit® L100-55. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;67(2):464–475. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.02.021.
31. Avgerinos T., Kantiranis N., Panagopoulou A., Malamataris S., Kachrimanis K., Nikolakakis I. Mechanical properties and drug release of venlafaxine HCl solid mini matrices prepared by hot-melt extrusion and hot or ambient compression. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2018;44(2):338–348. DOI: 10.1080/03639045.2017.1391839.
32. Lu J., Obara S., Liu F., Fu W., Zhang W., Kikuchi S. Melt Extrusion for a High Melting Point Compound with Improved Solubility and Sustained Release. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(1):358–370. DOI: 10.1208/s12249-017-0846-6.
33. Darji M. A., Lalge R. M., Marathe S. P., Mulay T. D., Fatima T., Alshammari A., Lee H. K., Repka M. A., Murthy S. N. Excipient Stability in Oral Solid Dosage Forms: A Review. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(1):12–26. DOI: 10.1208/s12249-017-0864-4.
34. Aho J., Edinger M., Botker J., Baldursdottir S., Rantanen J. Oscillatory Shear Rheology in Examining the Drug-Polymer Interactions Relevant in Hot Melt Extrusion. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(1):160–167. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.11.029.

35. Van Duong T., Lüdeker D., Van Bockstal P-J., De Beer T., Van Humbeeck J., Van den Mooter G. Polymorphism of Indomethacin in Semicrystalline Dispersions: Formation, Transformation, and Segregation. *Molecular Pharmaceutics*. 2018;15(3):1037–1051. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00930.
36. Priemel P. A., Laitinen R., Grohganz H., Rades T., Strachan C. J. *In situ amorphisation of indomethacin with Eudragit® E during dissolution*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;85(3):1259–1265. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.09.010.
37. Lubach J. W., Hau J. Solid-State NMR Investigation of Drug-Excipient Interactions and Phase Behavior in Indomethacin-Eudragit E Amorphous Solid Dispersions. *Pharmaceutical Research*. 2018;35(3):65. DOI: 10.1007/s11095-018-2364-y.
38. Priemel P. A., Laitinen R., Barthold S., Grohganz H., Lehto V.-P., Rades T., Strachan C. J. Inhibition of surface crystallisation of amorphos indomethacin particles in physical drug-polymer mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;456(2):301–306. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.08.046.
39. Chokshi R. J., Sandhu H. K., Iyer R. M., Shan N. H., Malick A. W., Zia H. Charaterization of physico-mechanical properties of indomethacin and polymers to assess their suitability for hot-melt extrusion process as a means to manufacture solid dispersion/solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;94(11):2463–2474. DOI: 10.1002/jps.20385.
40. Chokshi R. J., Shan N. H., Sandhu H. K., Malick A. W., Zia H. Characterization of low glass transition temperature indomethacin formulations: Impact of polymer-type and its concentration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(6):2286–2298.
41. Tanabe S., Higashi K., Umino M., Limwikrant W., Yamamoto K., Moribe K. Yellow coloration phenomena of incorporated indomethacin into folded sheet mesoporous materials. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;429(1–2):38–45. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.03.011.
42. Heinz A., Savolainen M., Rades T., Strachan C. J. Quantifying ternary mixtures of different solid-state forms of indomethacin by Raman and near-infrared spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;32(3):182–192. DOI: 10.1016/j.ejps.2007.07.003.
43. Kao J. Y., McGoverin C. M., Graeser K. A., Rades T., Gordon K. C. Measurement of amorphous indomethacin stability with NIR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 2012;58:19–26. DOI: 10.1016/j.vibspec.2011.09.009.
44. Nielsen L. H., Keller S. S., Gordon K. C., Boisen A., Rades T., Müllertz A. Spatial confinement can lead to increased stability of amorphous indomethacin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012;81(2):418–425. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.03.017.
45. Lomakina E. Y., Teberdieva M. V., Buzunova Y. M., Belousova E. A. Treatment of mild and moderate forms of ulcerative colitis: the possibilities of mesalazine. *Medical Council*. 2024;(15):182–189. (In Russ.) DOI: 10.21518/ms2024-446.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.19.071

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1753

Check for updates

CC BY 4.0

Оценка подлинности цветков каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) методом растровой электронной микроскопии

А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева✉

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

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

ORCID: А. Д. Дунилин – https://orcid.org/0000-0001-6792-6877;
О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Статья поступила: 19.02.2024 **Статья принята в печать:** 11.12.2024 **Статья опубликована:** 13.12.2024

Резюме

Введение. Каштан конский (*Aesculus hippocastanum* L.) – растение, широко использующееся в официальной и народной медицине многих стран. Фармакопейным сырьем в Российской Федерации являются только семена каштана конского. Цветки, благодаря содержащейся в них фракции фенольных производных и тритерпеновых сапонинов, являются перспективным лекарственным растительным сырьем, предположительно обладающим венотонизирующим и мембранопротекторным действием. Для получения лекарственных растительных препаратов на основе цветков каштана конского требуется наличие нормативной документации, содержащей перечень показателей качества, в том числе описание признаков его подлинности (морфологии и анатомии). Одним из передовых методов, широко применяемых в медицине и в последнее время все чаще используемых в фармакогностическом анализе, является растровая электронная микроскопия. В отличие от традиционной световой микроскопии метод дает возможность получить объемное пространственное представление о диагностически значимых признаках лекарственного растительного сырья.

Цель. Целью исследования являлось изучение особенностей морфологии поверхности цветков каштана конского методом растровой электронной микроскопии.

Материалы и методы. Объектом исследования служили высушенные цельные цветки каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.), собранные в Воронежской области в 2023 году в начале цветения. Кусочки цветков предварительно напыляли кремнием на автоматической напылительной установке Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., Великобритания). Микрофотографии получены на электронном микроскопе JSM-6510LV (JEOL Ltd., Япония).

Результаты и обсуждение. Микрофотографии, полученные в ходе анализа, показали диагностически значимые особенности строения цветка: эпидермальные клетки лепестков венчика многоугольные, неправильной формы, некоторые вытянутые, с извилистыми складками. Пыльцевые зерна могут быть собраны в гроздеобразные скопления, располагаться разрозненно или встречаться поодиночке. Поверхность лепестка венчика покрыта многочисленными, часто перекручивающимися волосками, имеющими грубобородавчатую структуру и конусовидное основание с четко выраженным местом крепления. Поверхность тычиночных нитей бороздчатая, с продольными складками с единичными одноклеточными волосками. Пыльник обладает складчатой формой, его поверхность выстилают чешуйчатые эпидермальные клетки с грубыми и утолщенными стенками. Поверхность чашечки, включая цветоножку, также густо опушена многочисленными трихомами.

Заключение. Метод растровой электронной микроскопии впервые использован для изучения морфолого-анатомических признаков цветков каштана конского. Уточнено строение основных диагностически значимых структур данного ЛРС. Определена морфология поверхности эпидермиса лепестков венчика и чашечки, трихом, пыльцевых нитей, пыльников и пыльцевых зерен цветков.

Ключевые слова: цветки каштана конского, *Aesculus hippocastanum* L., электронная растровая микроскопия, морфологические и микродиагностические признаки сырья

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

Вклад авторов. А. Д. Дунилин проводил заготовку и пробоподготовку сырья к выполнению исследования, им обнаружены морфологические признаки цветков каштана конского с применением растрового электронного микроскопа, а также обозначены все рисунки, отражающие основные результаты работы. Совместно с О. В. Тринеевой написал текст статьи. О. В. Тринеева консультировала по полученным результатам, писала разделы «Заключение» и «Результаты и обсуждение».

© Дунилин А. Д., Тринеева О. В., 2025
© Dunilin A. D., Trineeva O. V., 2025

Для цитирования: Дунилин А. Д., Тринеева О. В. Оценка подлинности цветков каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) методом растровой электронной микроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):245–253. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1753

Assessment of the authenticity of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) flowers by scanning electron microscopy

Alexander D. Dunilin, Olga V. Trineeva✉

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

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

ORCID: Alexander D. Dunilin – https://orcid.org/0000-0001-6792-6877;
Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Received: 19.02.2024 **Accepted:** 11.12.2024 **Published:** 13.12.2024

Abstract

Introduction. Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) is a plant widely used in official and folk medicine in many countries. Pharmacopoeia raw materials in the Russian Federation are only horse chestnut seeds. Flowers, due to the fraction of phenolic derivatives and triterpene saponins contained in them, are a promising medicinal plant raw material, presumably having a venotonizing and membrane-protective effect. To obtain medicinal herbal preparations based on horse chestnut flowers, it is required to have regulatory documentation containing a list of quality indicators, including a description of the signs of its authenticity (morphology and anatomy). Scanning electron microscopy is one of the advanced methods that have recently been increasingly used in medicine and pharmacognostic analysis. Unlike light microscopy, the method provides a three-dimensional spatial representation of diagnostically significant signs of medicinal plant raw materials.

Aim. The aim of the study was to study the morphology of the surface of horse chestnut flowers by scanning electron microscopy.

Materials and methods. The object of the study was dried whole flowers of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.), collected in the Voronezh region in 2023 at the beginning of flowering. The pieces of flowers were pre-sprayed with silicon on an automatic spraying unit Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., Great Britain). Micrographs were obtained using the JSM-6510LV electron microscope (JEOL Ltd., Japan).

Results and discussion. The micrographs obtained during the analysis showed diagnostically significant features of the flower structure: the epidermal cells of the corolla petals are polygonal, irregularly shaped, some elongated with sinuous folds. Pollen grains can be collected in cluster-like clusters, located separately or found singly. The surface of the corolla petal is covered with numerous often twisting hairs having a rough-warped structure and a cone-shaped base with a clearly defined attachment point. The surface of the staminate filaments is striated, with longitudinal folds with single unicellular hairs. The anther has a folded shape, its surface is lined with scaly epidermal cells with rough and thickened walls. The surface of the calyx, including the pedicel, is also densely pubescent with numerous trichomes.

Conclusion. The scanning electron microscopy method was used for the first time to study the morphological and anatomical features of horse chestnut flowers. The structure of the main diagnostically significant structures of this LRS has been clarified. The morphology of the epidermis surface of the petals of the corolla and calyx, trichomes, pollen filaments, anthers and pollen grains of flowers has been determined. It has been established that carbon and oxygen are the predominant elements of the raw materials.

Keywords: horse chestnut flowers, *Aesculus hippocastanum* L., electron scanning microscopy, morphological and microdiagnostic signs of raw materials

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

Contribution of the authors. Alexander D. Dunilin carried out the harvesting and sample preparation of raw materials for the study, he discovered morphological signs of horse chestnut flowers using a scanning electron microscope, and also marked all the drawings reflecting the main results of the work. Together with Olga V. Trineeva wrote the text of the article. Olga V. Trineeva consulted on the results obtained, wrote a conclusion and discussion of the results.

For citation: Dunilin A. D., Trineeva O. V. Assessment of the authenticity of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) flowers by scanning electron microscopy. *Drug development & registration*. 2025;14(1):245–253. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1753

ВВЕДЕНИЕ

Каштан конский (*Aesculus hippocastanum* L.) – растение, широко использующееся в официальной и народной медицине многих стран. Сырье каштана конского, по данным литературы [1–6], обладает рядом фармакологических свойств, главным из которых в настоящее время принято считать его флеботоническое действие. Однако на данный момент на территории Российской Федерации в официальной медицине используются только семена каштана конского [7]. В связи с этим комплексное фармакогностическое изучение других морфологических частей данного растения является актуальным направлением исследований в рамках поиска новых источников биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения. Из литературных источников известно, что цветки каштана конского являются перспективным лекарственным растительным сырьем (ЛРС) благодаря содержащейся в них совокупности многочисленных фенольных производных и тритерпеновых сапонинов, предположительно оказывающих комплексный венотонизирующий и мембранопротекторный эффект [8–10].

Для использования растительного сырья фармацевтическими производствами с целью получения лекарственных растительных препаратов (ЛРП) требуется наличие нормативной документации (НД), содержащей перечень показателей качества, в том числе описание признаков его подлинности (морфологии и анатомии). Одним из передовых методов, последнее время все чаще используемых в медицине и практике фармакогностического анализа, является растровая электронная микроскопия (РЭМ) [11–24]. Данный оптический метод позволяет изучать поверхность различных исследуемых образцов, в частности и ЛРС, включая встречающиеся на ней морфолого-анатомические структуры с высоким разрешением. В отличие от традиционной световой микроскопии метод дает возможность получить объемное пространственное представление о диагностически значимых признаках изучаемого ЛРС [25–26].

Однако стоит отметить, что в настоящее время данный метод не является фармакопейным в части анализа ЛРС, чаще всего РЭМ используется в различных наукоемких отраслях, металлургической промышленности и инженерии для оценки микроструктуры поверхности изделий [27–28]. На данный момент применение РЭМ в медицине и фармации используется для мониторинга поверхности некоторых лекарственных форм, анализа морфологических структур ЛРС или исследований структурных изменений в клетках и тканях организма [29–30]. В случае оценки подлинности ЛРС метод применим только для исследования цельного сырья и не позволяет выявить диагностически значимые признаки для измельченного и порошкованного сырья, что следует отнести к его недостаткам.

Целью исследования являлось изучение особенностей морфологии поверхности цветков каштана конского методом растровой электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили высушенные цельные цветки каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.), собранные в Воронежской области в 2023 году в начале цветения. Сырье было высушено методом воздушно-теневой сушки. Для проведения исследования методом РЭМ кусочки цветков предварительно напыляли кремнием на автоматической напылительной установке Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) для повышения проводимости. Микрофотографии получены на электронном микроскопе JSM-6510LV (JEOL Ltd., Япония). Обработка результатов проведена при помощи программного обеспечения ESPRIT 1.9. Исследования проведены с использованием приборной базы ЦКП научным оборудованием ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет».

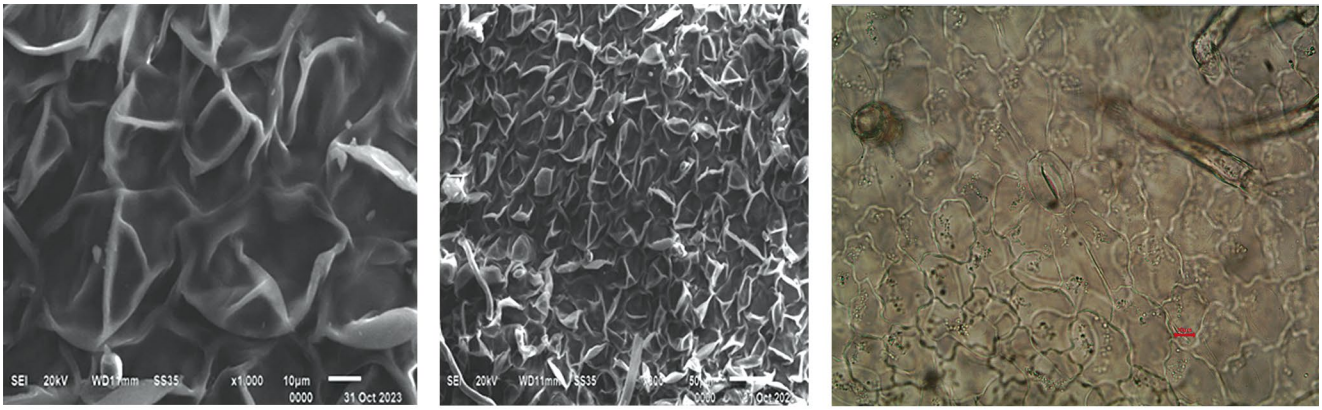
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для сравнения выявленных особенностей строения изучаемого сырья проводили сопоставление данных с фармакопейным методом идентификации ЛРС – световой микроскопией, примененной нами ранее [31]. Микрофотографии, полученные в ходе анализа, демонстрируют особенности морфологии поверхности цветков каштана конского в объемном изображении (рисунки 1–7).

Поверхность исследуемых образцов в результате высушивания приобрела специфический рельеф. Эпидермальные клетки лепестков венчика многоугольные, неправильной формы, некоторые вытянутые, с извилистыми складками. Клеточные стенки имеют утолщения (рисунок 1, А и Б). Пробоподготовка к проведению анализа методом световой микроскопии приводит к исчезновению морщинистого рельефа поверхности (рисунок 1, В).

На изучаемых образцах в большом количестве визуализируются пыльцевые зерна овальной формы с гладкой поверхностью, что не было идентифицировано при исследовании данного сырья фармакопейным методом световой микроскопии [31]. Пыльцевые зерна могут быть собраны в гроздеобразные скопления, располагаться разрозненно или встречаться поодиночке (рисунок 2, А–В).

Поверхность лепестка венчика покрыта многочисленными волосками, имеющими грубобородавчатую структуру и конусовидное основание с четко выраженным местом крепления (рисунок 3, А и Б). Волоски имеют различную длину, наиболее крупные и извилистые располагаются по краю лепестка венчика (рисунок 4, А). Трихомы на поверхности ле-



А
A

Б
B

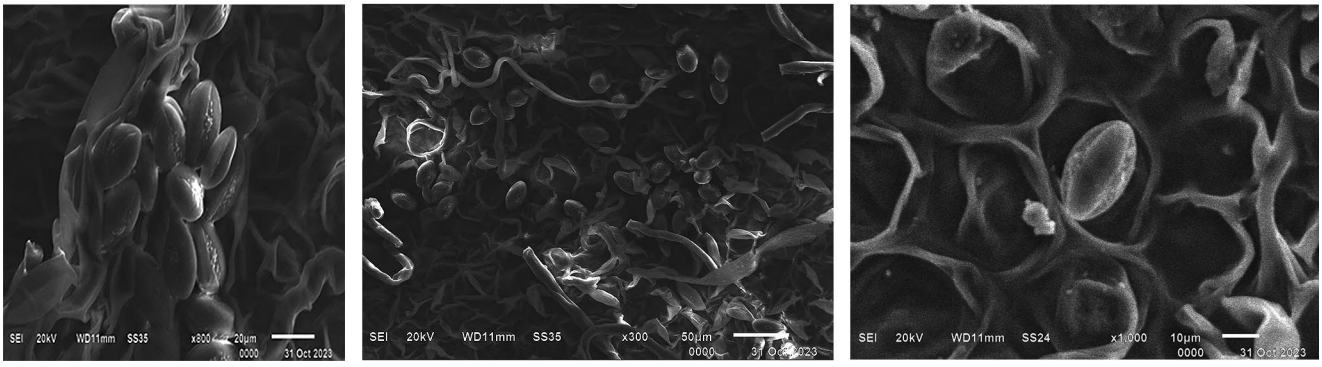
В
C

Рисунок 1. **Фрагмент эпидермиса венчика цветка каштана конского.**

РЭМ: эпидермальные клетки венчика цветка каштана конского, А – (ув. ×1000); Б – (ув. ×300); В – световая микроскопия (ув. ×400)

Figure 1. **Fragment of the epidermis of the corolla of the horse chestnut flower.**

REM: epidermal cells of the corolla of the horse chestnut flower, A – (zoom ×1000); B – (zoom ×300); C – light microscopy (zoom ×400)



А
A

Б
B

В
C

Рисунок 2. **Пыльцевые зерна.**

А – сгруппированные пыльцевые зерна и эпидермальные клетки цветка конского каштана (ув. ×800); Б – разрозненно расположенные пыльцевые зерна цветка конского каштана (ув. ×300); В – единично расположенное пыльцевое зерно (ув. ×1000)

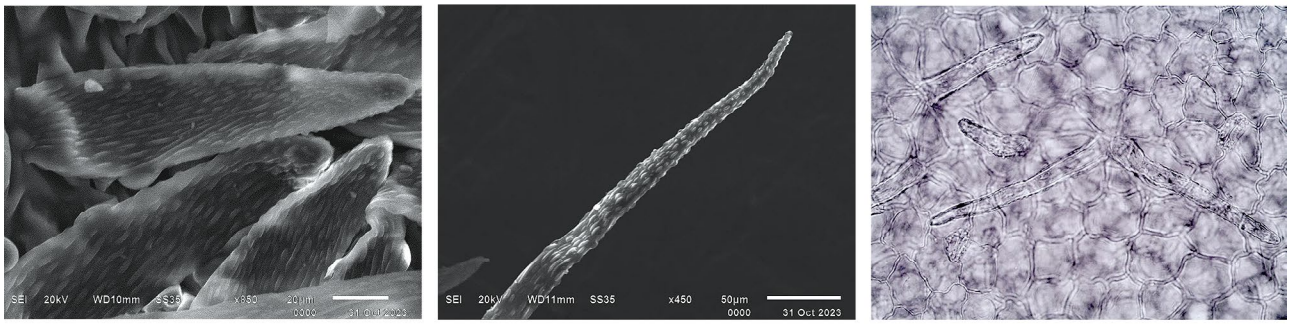
Figure 2. **Pollen grains.**

A – Grouped pollen grains and epidermal cells of horse chestnut flower (zoom ×800); B – Scattered pollen grains of horse chestnut flower (zoom ×300); C – Single pollen grain (zoom ×1000)

пестка часто перекручиваются, переплетаются между собой и могут обламываться (рисунок 4, Б). РЭМ с применением увеличения в 800 и более раз позволяет визуализировать шероховатую поверхность трихом данного сырья.

В результате изучения тычиночных нитей были отмечены характерные особенности поверхности: эпидермальные клетки не дифференцированы, поверхность тычиночных нитей бороздчатая, с продольными складками, что более четко можно увидеть на микрофотографии, полученной методом РЭМ (рисунок 5, А). На поверхности встречаются единичные одноклеточные волоски с грубобородавчатой структурой (рисунок 5).

Также в данной работе впервые были изучены морфологические особенности поверхности пыльника цветков каштана конского. Пыльник обладает складчатой формой, его поверхность выстилают чешуйча-



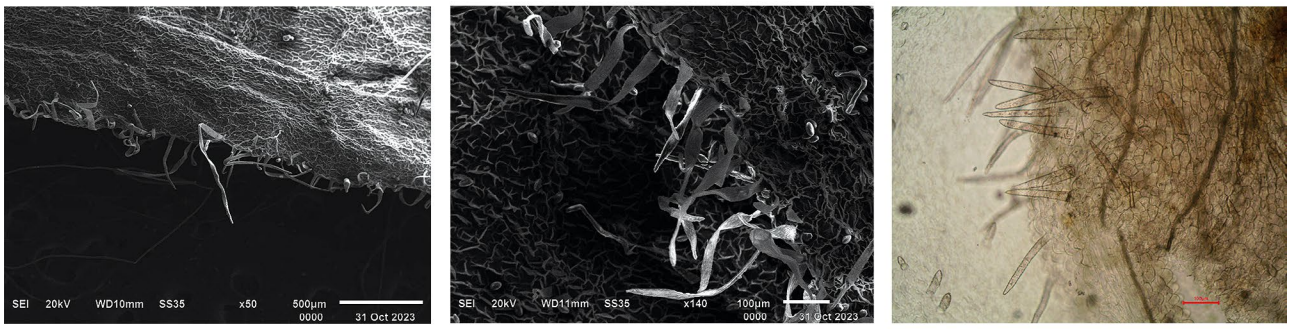
А
A

Б
B

В
C

Рисунок 3. Грубобородавчатые волоски поверхности лепестка венчика цветка каштана конского.
РЭМ, А – (ув. ×850); Б – (ув. ×450); В – световая микроскопия (ув. ×400)

Figure 3. Coarse warty hairs on the surface of the petal of the corolla of the horse chestnut flower.
REM, A – (zoom ×850); B – (zoom ×450); C – light microscopy (zoom ×400)



А
A

Б
B

В
C

Рисунок 4. Краевые волоски лепестка венчика цветка каштана конского.
РЭМ, А – (ув. ×50); Б – переплетенные волоски лепестка венчика каштана конского (ув. ×140); В – световая микроскопия (ув. ×100)

Figure 4. Border hairs of the corolla petal of the horse chestnut flower.
REM, A – (zoom ×50); B – Intertwined hairs of the corolla petal of the horse chestnut (zoom ×140); C – light microscopy (zoom ×100)

тые эпидермальные клетки с грубыми и утолщенными стенками. На поверхности пыльника визуализируются многочисленные пыльцевые зерна овальной формы с характерным вытянутым углублением в центральной части (рисунок 6, А и Б).

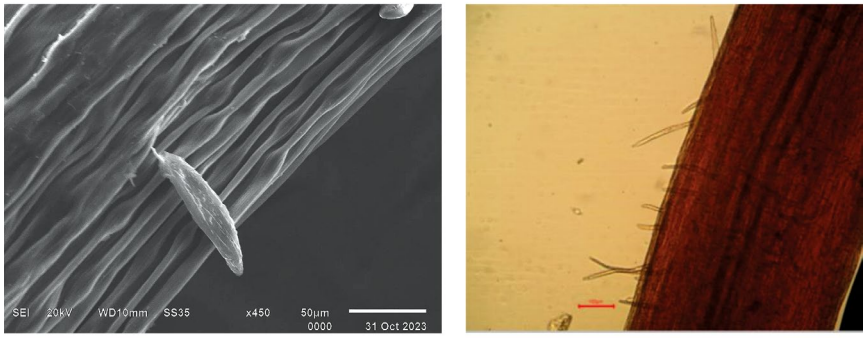
Поверхность чашечки, включая цветоножку, также густо опушена многочисленными трихомами (рисунок 7). Сплошное покрытие эпидермиса волосками затрудняет визуализацию иных диагностических характеристик данной структуры цветка, например размера и формы клеток, методом РЭМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод растровой электронной микроскопии впервые использован для изучения морфолого-анатомических признаков цветков каштана конского. Уточнено строение основных диагностически значимых структур данного ЛРС. Определена морфология поверхности эпидермиса лепестков венчика и чашечки, трихом, пыльцевых нитей, пыльников и пыльцевых зерен цветков. Полученные сведения дополняют и дают представление об объемном характере данных, полученных при исследовании цветков каштана конского фармакопейным методом световой микроскопии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bielarska A. M., Jasek J. W., Kazimierczak R., Hallmann E. Red Horse Chestnut and Horse Chestnut Flowers and Leaves: A Potential and Powerful Source of Polyphenols with High Antioxidant Capacity. *Molecules.* 2022;27(7):2279. DOI: 10.3390/molecules27072279.

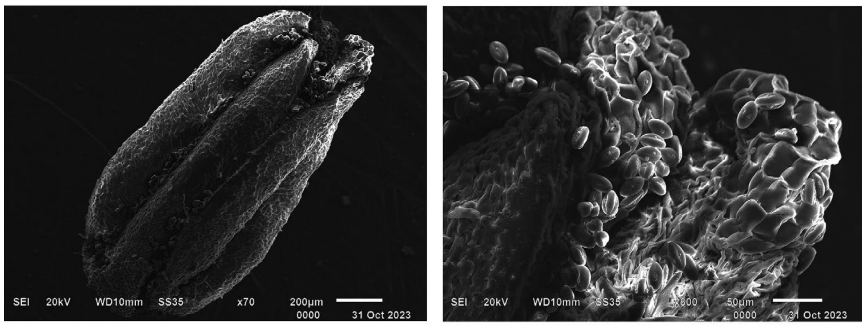


А
A

Б
B

Рисунок 5. **Бороздчатость поверхности тычиночных нитей цветка каштана конского.**
РЭМ, А – (ув. ×450); Б – световая микроскопия (ув. ×100)

Figure 5. **Grooves on the surface of the staminate thread of the horse chestnut flower.**
REM, A – (zoom ×450); B – light microscopy (zoom ×100)

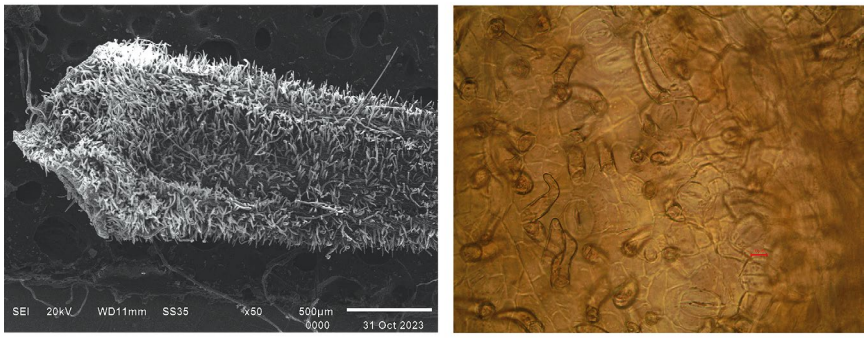


А
A

Б
B

Рисунок 6. **Морфология поверхности пыльника цветка каштана конского:**
А – полноразмерный пыльник цветка каштана конского (ув. ×70); Б – чешуйчатые клетки пыльника и пыльцевые зерна (ув. ×300)

Figure 6. **Morphology of the anther surface of the horse chestnut flower:**
A – full-size anther of the horse chestnut flower (zoom ×70); B – scaly anther cells and pollen grains (zoom ×300)



А
A

Б
B

Рисунок 7. **Морфология поверхности цветоножки цветка каштана конского.**
РЭМ, А – (ув. ×50); Б – световая микроскопия (ув. ×400)

Figure 7. **Morphology of the pedicel surface of the horse chestnut flower.**
REM, A – (zoom ×50); B – light microscopy (zoom ×400)

2. Zhang Z., Li S., Lian X.-Y. An Overview of Genus *Aesculus* L.: Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacological Activities. *Pharmaceutical Crops*. 2010;1:24–51. DOI: 10.2174/2210290601001010024.
3. Pittler M. H., Ernst E. Horse chestnut seed extract for chronic venous insufficiency. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;11(11):CD003230. DOI: 10.1002/14651858.CD003230.pub4.
4. Mojžišová G., Mojžiš J., Pilátová M., Varinská L., Ivanová L., Strojný L., Richnavský J. Antiproliferative and antiangiogenic properties of horse chestnut extract. *Phytotherapy Research*. 2013;(2):159-65. DOI: 10.1002/ptr.4688.
5. Methlie C. B., Schjøtt J. Hestekastanje – naturlegemiddel mot venøs insuffisiens *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2009;129(5):420–422. (In Norwegian) DOI: 10.4045/tidsskr.09.33871.
6. Salinas F. M., Vázquez L., Gentilini M. V., O´Donohoe A., Regueira E., Nabaes Jodar M. S., Viegas M., Michelini F. M., Hermida G., Alché L. E., Bueno C. A. *Aesculus hippocastanum* L. seed extract shows virucidal and antiviral activities against respiratory syncytial virus (RSV) and reduces lung inflammation in vivo. *Antiviral Research*. 2019;164:1–11. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.01.018.
7. Занина И. А., Дунилин А. Д., Чистякова А. С., Евсиков Ф. Д. Анализ рынка лекарственных препаратов, содержащих сырье каштана конского. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2023;1(39):37–42.
8. Idris S., Mishra A., Khushtar M. Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. towards future medicine. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2020;31(5):20190115. DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0115.
9. Ottillinger B., Greeske K. Rational therapy of chronic venous insufficiency – chances and limits of the therapeutic use of horse-chestnut seeds extract. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2001;1:5. DOI: 10.1186/1471-2261-1-5.
10. Guillaume M., Padioleau F. Veinotonic effect, vascular protection, antiinflammatory and free radical scavenging properties of horse chestnut extract. *Arzneimittelforschung*. 1994;44(1):25–35.
11. Камалова Ю. Б. Разработка алгоритма распознавания изображений зерен пыльцы, полученных с помощью растрового электронного микроскопа, и статистический анализ их информативных параметров. *Вестник ИжГТУ имени М. Т. Калашникова*. 2014;2(62):115–117.
12. Nguyen J. N. T., Harbison A. M. Scanning Electron Microscopy Sample Preparation and Imaging. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1606:71–84. DOI: 10.1007/978-1-4939-6990-6_5.
13. Гудкова А. А., Чистякова А. С., Синецкая Д. А., Сливкин А. И., Болгов А. С., Болгова М. А. Растровая электронная микроскопия в анализе видов рода *Persicaria* Mill. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):99–105. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105.
14. Ковалева Н. А., Тринеева О. В. Применение растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):79–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86.
15. Mazzara E., Torresi J., Fico G., Papini A., Kulbaka N., Dall'Acqua S., Sut S., Garzoli S., Mustafa A. M., Cappellacci L., Fiorini D., Maggi F., Giuliani C., Petrelli R. A Comprehensive Phytochemical Analysis of Terpenes, Polyphenols and Cannabinoids, and Micromorphological Characterization of 9 Commercial Varieties of *Cannabis sativa* L. *Plants*. 2022;11(7):891. DOI: 10.3390/plants11070891.
16. Manassov N., Samy M. N., Datkhayev U., Avula B., Adams S. J., Katragunta K., Raman V., Khan I. A., Ross S. A. Ultrastructural, Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, Chemical Study and LC-DAD-QToF Chemical Characterization of *Cetraria islandica* (L.) Ach. *Molecules*. 2023;28(11):4493. DOI: 10.3390/molecules28114493.
17. Ramos G. Q., Cotta E. A., da Fonseca Filho H. D. Studies on the ultrastructure in *Anacardium occidentale* L. leaves from Amazon in northern Brazil by scanning microscopy. *Scanning*. 2016;38(4):329–335. DOI: 10.1002/sca.21274.
18. Kedar K. A., Chaudhari S. R., Rao A. S. Dataset on leaf surface and elemental study of four species of Bignoniaceae family by SEM-EDAX. *Data in Brief*. 2018;17:1188–1195. DOI: 10.1016/j.dib.2018.02.037.
19. Abilkassymova A., Kozykeyeva R., Aldana-Mejía J. A., Adams S. J., Datkhayev U., Turgumbayeva A., Orynbassarova K., Saroja S. G., Khan I. A., Ross S. A. Phytochemical and Micro-Morphological Characterization of Atraphaxis pyrifolia Bunge Growing in the Republic of Kazakhstan. *Molecules*. 2024;29(4):833. DOI: 10.3390/molecules29040833.
20. Ahmad I., Hikmawan B. D., Maharani D. F., Nisrina N., Arifianti A. E., Mun'im A. Natural Deep Eutectic Solvent based Ultrasound-assisted extraction: A green approach for extraction of sulfhydryl and mimosine from *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit seeds. *Heliyon*. 2023;9(10):e20480. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e20480.
21. Zhang Z., Lu L., Liu Y., Qing L. Comparing and authenticating on anatomical aspects of Abrus cantoniensis and Abrus mollis by microscopy. *Pharmacognosy Research*. 2015;7(2):148–155. DOI: 10.4103/0974-8490.150526.
22. Yue Y., Qiu Z.-D., Qu X.-Y., Deng A.-P., Yuan Y., Huang L.-Q., Lai C.-J.-S. Discoursing on Soxhlet extraction of ginseng using association analysis and scanning electron microscopy. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018;8(5):312–317. DOI: 10.1016/j.jpha.2018.08.003.
23. Munir A., Youssef F. S., Ishtiaq S., Kamran S. H., Sirwi A., Ahmed S. A., Ashour M. L., Elhady S. S. *Malva parviflora* Leaves Mucilage: An Eco-Friendly and Sustainable Biopolymer with Antioxidant Properties. *Polymers*. 2021;13(23):4251. DOI: 10.3390/polym13234251.
24. Kanne H., Pandurang Burte N., Prasanna V., Gujjula R. Extraction and elemental analysis of Coleus forskohlii extract. *Pharmacognosy Research*. 2015;7(3):237–241. DOI: 10.4103/0974-8490.157966.
25. Franks R. G. Scanning electron microscopy analysis of floral development. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1110:263–273. DOI: 10.1007/978-1-4614-9408-9_13.
26. Chwil M., Weryszko-Chmielewska E., Sulborska A., Michońska M. Micromorphology of trichomes in the flowers of the horse chestnut *Aesculus hippocastanum* L. *Acta Agrobotanica*. 2013;66(4):45–54. DOI: 10.5586/aa.2013.050.
27. Fischer E. R., Hansen B. T., Nair V., Hoyt F. H., Dorward D. W. Scanning electron microscopy. *Current Protocols in Microbiology*. 2012;25:2B.2.1–2B.2.47. DOI: 10.1002/9780471729259.mc02b02s25.

28. Matsuda K., Ikeno S., Müllerová I., Frank L. The potential of the scanning low energy electron microscopy for the examination of aluminum based alloys and composites. *Journal of Electron Microscopy.* 2005;54(2):109–117. DOI: 10.1093/jmicro/dfi030.
29. Nomura E., Sujino T., Hosoe N., Yoshimatsu Y., Tanemoto S., Takabayashi K., Mutaguchi M., Shimoda M., Naganuma M., Ogata H., Kanai T. Characteristics of the Mucosal Surface on Scanning Electron Microscopy in Patients with Remitting Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences.* 2021;66(9):3141–3148. DOI: 10.1007/s10620-020-06609-4.
30. Наумов Н. М. Растровая электронная микроскопия капсулированного полигуанидина в пектине. В сб: Научное обеспечение агропромышленного производства. Материалы Международной научно-практической конференции. 20–21 февраля 2018. Курск; 2018. С. 43–47.
31. Чистякова А. С., Сорокина А. А., Дунилин А. Д., Гудкова А. А., Болгов А. С. Оценка подлинности каштана конского обыкновенного цветков методами микроскопического анализа. *Фармация*. 2021;70(7):32–36. DOI: 10.29296/25419218-2021-07-05.

REFERENCES

1. Bielarska A. M., Jasek J. W., Kazimierczak R., Hallmann E. Red Horse Chestnut and Horse Chestnut Flowers and Leaves: A Potential and Powerful Source of Polyphenols with High Antioxidant Capacity. *Molecules.* 2022;27(7):2279. DOI: 10.3390/molecules27072279.
2. Zhang Z., Li S., Lian X.-Y. An Overview of Genus *Aesculus* L.: Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacological Activities. *Pharmaceutical Crops*. 2010;1:24–51. DOI: 10.2174/2210290601001010024.
3. Pittler M. H., Ernst E. Horse chestnut seed extract for chronic venous insufficiency. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;11(11):CD003230. DOI: 10.1002/14651858.CD003230.pub4.
4. Mojžišová G., Mojžiš J., Pilátová M., Varinská L., Ivanová L., Strojný L., Richnavský J. Antiproliferative and antiangiogenic properties of horse chestnut extract. *Phytotherapy Research*. 2013;(2):159-65. DOI: 10.1002/ptr.4688.
5. Methlie C. B., Schjøtt J. Hestekastanje – naturlegemiddel mot venøs insuffisiens *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2009;129(5):420–422. (In Norwegian) DOI: 10.4045/tidsskr.09.33871.
6. Salinas F. M., Vázquez L., Gentilini M. V., O´Donohoe A., Regueira E., Nabaes Jodar M. S., Viegas M., Michelini F. M., Hermida G., Alché L. E., Bueno C. A. *Aesculus hippocastanum* L. seed extract shows virucidal and antiviral activities against respiratory syncytial virus (RSV) and reduces lung inflammation in vivo. *Antiviral Research.* 2019;164:1–11. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.01.018.
7. Zanina I. A., Dunikin A. D., Chistyakova A. S., Evsikov F. D. Analysis of the market of medicines containing raw materials of horse chestnut. *Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennykh sredstv.* 2023;1(39):37–42. (In Russ.)
8. Idris S., Mishra A., Khushtar M. Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. towards future medicine. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.* 2020;31(5):20190115. DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0115.
9. Ottillinger B., Greeske K. Rational therapy of chronic venous insufficiency – chances and limits of the therapeutic use of horse-chestnut seeds extract. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2001;1:5. DOI: 10.1186/1471-2261-1-5.
10. Guillaume M., Padioleau F. Veinotonic effect, vascular protection, antiinflammatory and free radical scavenging properties of horse chestnut extract. *Arzneimittelforschung.* 1994;44(1):25–35.
11. Kamalova Yu. B. Development of an algorithm for recognizing images of pollen grains obtained using a scanning electron microscope and statistical analysis of their informative parameters. *Vestnik IzhGTU imeni M. T. Kalashnikova.* 2014;2(62):115-117. (In Russ.)
12. Nguyen J. N. T., Harbison A. M. Scanning Electron Microscopy Sample Preparation and Imaging. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1606:71–84. DOI: 10.1007/978-1-4939-6990-6_5.
13. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sinetskaya D. A., Slivkin A. I., Bolgov A. S., Bolgova M. A. Scanning Electron Microscopy in the Analysis of Species of the Genus Persicaria Mill. *Drug development & registration*. 2022;11(1):99–105. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105.
14. Kovaleva N. A., Trineeva O. V. Application of Scanning Electron Microscopy to Study Morphological and Anatomical Features of Sea Buckthorn Leaves. *Drug development & registration*. 2023;12(2):79–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86.
15. Mazzara E., Torresi J., Fico G., Papini A., Kulbaka N., Dall'Acqua S., Sut S., Garzoli S., Mustafa A. M., Cappellacci L., Fiorini D., Maggi F., Giuliani C., Petrelli R. A Comprehensive Phytochemical Analysis of Terpenes, Polyphenols and Cannabinoids, and Micromorphological Characterization of 9 Commercial Varieties of *Cannabis sativa* L. *Plants.* 2022;11(7):891. DOI: 10.3390/plants11070891.
16. Manassov N., Samy M. N., Datkhayev U., Avula B., Adams S. J., Katragunta K., Raman V., Khan I. A., Ross S. A. Ultrastructural, Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, Chemical Study and LC-DAD-QToF Chemical Characterization of *Cetraria islandica* (L.) Ach. *Molecules*. 2023;28(11):4493. DOI: 10.3390/molecules28114493.
17. Ramos G. Q., Cotta E. A., da Fonseca Filho H. D. Studies on the ultrastructure in *Anacardium occidentale* L. leaves from Amazon in northern Brazil by scanning microscopy. *Scanning*. 2016;38(4):329–335. DOI: 10.1002/sca.21274.
18. Kedar K. A., Chaudhari S. R., Rao A. S. Dataset on leaf surface and elemental study of four species of Bignoniaceae family by SEM-EDAX. *Data in Brief.* 2018;17:1188–1195. DOI: 10.1016/j.dib.2018.02.037.
19. Abilkassymova A., Kozykeyeva R., Aldana-Mejía J. A., Adams S. J., Datkhayev U., Turgumbayeva A., Orynbassarova K., Saroja S. G., Khan I. A., Ross S. A. Phytochemical and Micro-Morphological Characterization of Atraphaxis pyrifolia Bunge Growing in the Republic of Kazakhstan. *Molecules*. 2024;29(4):833. DOI: 10.3390/molecules29040833.
20. Ahmad I., Hikmawan B. D., Maharani D. F., Nisrina N., Arifianti A. E., Mun'im A. Natural Deep Eutectic Solvent based Ultrasound-assisted extraction: A green approach for extraction of sulfhydryl and mimosine from *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit seeds. *Heliyon.* 2023;9(10):e20480. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e20480.

21. Zhang Z., Lu L., Liu Y., Qing L. Comparing and authenticating on anatomical aspects of Abrus cantoniensis and Abrus mollis by microscopy. *Pharmacognosy Research*. 2015;7(2):148–155. DOI: 10.4103/0974-8490.150526.
22. Yue Y., Qiu Z.-D., Qu X.-Y., Deng A.-P., Yuan Y., Huang L.-Q., Lai C.-J.-S. Discoursing on Soxhlet extraction of ginseng using association analysis and scanning electron microscopy. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018;8(5):312–317. DOI: 10.1016/j.jpha.2018.08.003.
23. Munir A., Youssef F. S., Ishtiaq S., Kamran S. H., Sirwi A., Ahmed S. A., Ashour M. L., Elhady S. S. *Malva parviflora* Leaves Mucilage: An Eco-Friendly and Sustainable Biopolymer with Antioxidant Properties. *Polymers*. 2021;13(23):4251. DOI: 10.3390/polym13234251.
24. Kanne H., Pandurang Burte N., Prasanna V., Gujjula R. Extraction and elemental analysis of Coleus forskohlii extract. *Pharmacognosy Research*. 2015;7(3):237–241. DOI: 10.4103/0974-8490.157966.
25. Franks R. G. Scanning electron microscopy analysis of floral development. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1110:263–273. DOI: 10.1007/978-1-4614-9408-9_13.
26. Chwil M., Weryszko-Chmielewska E., Sulborska A., Michońska M. Micromorphology of trichomes in the flowers of the horse chestnut *Aesculus hippocastanum* L. *Acta Agrobotanica*. 2013;66(4):45–54. DOI: 10.5586/aa.2013.050.
27. Fischer E. R., Hansen B. T., Nair V., Hoyt F. H., Dorward D. W. Scanning electron microscopy. *Current Protocols in Microbiology*. 2012;25:2B.2.1–2B.2.47. DOI: 10.1002/9780471729259.mc02b02s25.
28. Matsuda K., Ikeno S., Müllerová I., Frank L. The potential of the scanning low energy electron microscopy for the examination of aluminum based alloys and composites. *Journal of Electron Microscopy*. 2005;54(2):109–117. DOI: 10.1093/jmicro/dfi030.
29. Nomura E., Sujino T., Hosoe N., Yoshimatsu Y., Tanemoto S., Takabayashi K., Mutaguchi M., Shimoda M., Naganuma M., Ogata H., Kanai T. Characteristics of the Mucosal Surface on Scanning Electron Microscopy in Patients with Remitting Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2021;66(9):3141–3148. DOI: 10.1007/s10620-020-06609-4.
30. Naumov N. M. Scanning electron microscopy of encapsulated polyguanidine in pectin. In: Scientific support of agro-industrial production. Materials of the International Scientific and practical Conference. 20–21 February, 2018. Kursk; 2018. P. 43–47. (In Russ.)
31. Chistyakova A. S., Sorokina A. A., Dunilin A. D., Gudkova A. A., Bolgov A. S. Assessment of the identity of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) flowers by microscopic analysis methods. *Pharmacy*. 2021;70(7):32–36. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2021-07-05.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.011; 615.072

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1778

Check for updates

CC BY 4.0

Особенности проведения теста «Растворение» для суппозиториев вагинальных, содержащих в своем составе натамицин

А. В. Мелешко[1]✉, А. М. Волкова[1], В. С. Тюкова[1, 2], А. В. Панов[1, 2], С. А. Кедик[1, 2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА). 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

[2] Акционерное общество «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ»), 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, офис 1

✉ **Контактное лицо:** Мелешко Анастасия Владимировна. **E-mail:** meleshko.anastasia@yandex.ru

ORCID: А. В. Мелешко – https://orcid.org/0000-0002-1073-5073;
А. М. Волкова – https://orcid.org/0000-0003-0890-0540;
В. С. Тюкова – https://orcid.org/0000-0001-6622-0581;
А. В. Панов – https://orcid.org/0000-0002-1603-143X;
С. А. Кедик – https://orcid.org/0000-0003-2610-8493.

Статья поступила: 04.03.2024 **Статья принята в печать:** 19.12.2024 **Статья опубликована:** 20.12.2024

Резюме

Введение. Тест «Растворение» для лекарственных средств является одним из ключевых и во многом призван моделировать биодоступность действующего вещества в условиях его применения. Тем не менее существует ряд препаратов, содержащих в своем составе активные фармацевтические ингредиенты, плохо растворимые в стандартных условиях. Однако, поскольку их действие местное, плохая растворимость не сказывается отрицательно на терапевтическом эффекте. В данной работе рассмотрена разработка условий проведения теста «Растворение» в суппозиториях на липофильной основе, содержащих в своем составе натамицин, который является противогрибковым агентом, относящимся к тетраеновым макролидам, плохо растворимым в воде и, как следствие, в стандартных буферных растворах, предназначенных для проведения теста.

Цель. Подобрать оптимальные условия проведения теста «Растворение», при которых можно будет добиться полного высвобождения действующего вещества из суппозиториев на липофильной основе на примере суппозиториев «Пимафуцин» и «Примацин».

Материалы и методы. Объектами исследования являются суппозитории на липофильной основе, содержащие в своем составе натамицин. Исследование проводилось с использованием тестеров растворения (аппараты «Вращающаяся корзинка» и «Проточная ячейка») и системы ВЭЖХ для контроля количества высвободившегося натамицина.

Результаты и обсуждение. Объекты исследования были проанализированы с помощью теста «Растворение». В работе показана возможность проведения теста с полным высвобождением действующего вещества при добавлении поверхностно-активных веществ и органического растворителя, что допустимо для сред, применяемых для контроля качества согласно Государственной фармакопее XV издания; примеры таких сред можно найти также в базе данных сред растворения FDA.

Заключение. Разработаны условия проведения теста «Растворение» для суппозиториев, содержащих в своем составе натамицин.

Ключевые слова: тест «Растворение», натамицин, «Примацин», суппозитории

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

Вклад авторов. С. А. Кедик, В. С. Тюкова и А. В. Панов разработали дизайн эксперимента. А. В. Мелешко, А. М. Волкова и В. С. Тюкова проводили тест «Растворение». А. В. Мелешко разработала методики количественного определения натамицина, участвовала в обработке данных. А. В. Мелешко и А. М. Волкова проводили теоретические расчеты. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

© Мелешко А. В., Волкова А. М., Тюкова В. С., Панов А. В., Кедик С. А., 2025
© Meleshko A. V., Volkova A. M., Tyukova V. S., Panov A. V., Kedik S. A., 2025

Для цитирования: Мелешко А. В., Волкова А. М., Тюкова В. С., Панов А. В., Кедик С. А. Особенности проведения теста «Растворение» для суппозиториев вагинальных, содержащих в своем составе натамицин. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):254–264. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1778

Development of the "Dissolution" test method for vaginal suppositories Pimafucin®

Anastasiya V. Meleshko[1]✉, Aleksandra M. Volkova[1], Viktoriya S. Tyukova[1, 2], Aleksey V. Panov[1, 2], Stanislav A. Kedik[1, 2]

[1] MIREA – Russian Technological University. 86, prospekt Vernadskogo, Moscow, 119571, Russia
[2] Joint Stock Company "Institute of Pharmaceutical Technologies". 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

✉ **Corresponding author:** Anastasiya V. Meleshko. **E-mail:** meleshko.anastasia@yandex.ru

ORCID: Anastasiya V. Meleshko – https://orcid.org/0000-0002-1073-5073;
Aleksandra M. Volkova – https://orcid.org/0000-0003-0890-0540;
Viktoriya S. Tyukova – https://orcid.org/0000-0001-6622-0581;
Aleksey V. Panov – https://orcid.org/0000-0002-1603-143X;
Stanislav A. Kedik – https://orcid.org/0000-0003-2610-8493.

Received: 04.03.2024 **Accepted:** 19.12.2024 **Published:** 20.12.2024

Abstract

Introduction. «Dissolution test» for drugs is one of the key studies of control and, in many ways, is designed to simulate the bioavailability of the active substance under the conditions of use. However, there are several drugs containing active pharmaceutical substances that are poorly soluble under standard conditions. For this substances action is local, so, they are practically not absorbed in the human body, but showed the necessary therapeutic effect. This work discusses the development of conditions for «Dissolution test» in lipophilic-based suppositories containing natamycin, which is an antifungal agent related to tetraene macrolides, poorly soluble in water and, therefore, in standard buffer solutions intended for this test.

Aim. Choose the conditions for conducting «Dissolution test», under which it will be possible to achieve complete release of the active substance from lipophilic-based suppositories on «Pimafucin» and «Primacin».

Materials and methods. The objects of the study are lipophilic-based suppositories containing natamycin. The study was carried out using dissolution testers (Rotating Basket and Flow Cell apparatus) and an HPLC system to define the amount of natamycin released.

Results and discussion. The research objects were analyzed under «Dissolution test». The work shows the possibility of conducting a test with complete release of the active substance by adding surfactants and an organic solvent, which is acceptable for quality control dissolution medias.

Conclusion. Conditions for «Dissolution test» have been developed for suppositories containing natamycin.

Keywords: pimafucin, «Dissolution» test, natamycin, primacin, suppositories

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. Stanislav A. Kedik, Viktoriya S. Tyukova and Aleksey V. Panov developed the design of the experiment. Anastasiya V. Meleshko, Aleksandra M. Volkova and Viktoriya S. Tyukova carried out a dissolution test. Anastasiya V. Meleshko developed methods of natamycin quantitative determination and participated in data processing. Anastasiya V. Meleshko and Aleksandra M. Volkova carried out theoretical calculations. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

For citation: Meleshko A. V., Volkova A. M., Tyukova V. S., Panov A. V., Kedik S. A. Development of the «Dissolution» test method for vaginal suppositories Pimafucin®. *Drug development & registration*. 2025;14(1):254–264. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1778

ВВЕДЕНИЕ

Кандидоз вульвы и влагалища не относится к инфекциям, передающимся половым путем, в соответствии с Международной классификацией болезней, тем не менее он является достаточно серьезной проблемой, поскольку встречается по крайней мере один раз в жизни у 75 % женщин [1], причем у 40–45 % – два и более раза, а у 10–20 % может развиваться вариант кандидоза с осложнениями.

Основным возбудителем кандидозов вульвы и влагалища является *Candida albicans*. Хотя в роде кандида выделяют более 80 видов дрожжеподобных грибов, не все из них патогенны, а наиболее патоген-

ными являются *C. albicans* [2]. Тем не менее принято не относить кандидоз к заболеваниям, передающимся половым путем, а лечение партнера осуществляется исключительно при наличии соответствующей симптоматики в соответствии с синдромным подходом. Риск рецидивов выше для пациентов с беременностью, диабетом или ВИЧ-инфекцией, также отмечается, что иногда на развитие рецидивирующего течения заболевания могут оказывать влияние антибиотики и оральные контрацептивы [3, 4].

Для лечения применяют противогрибковые препараты различных групп: производные имидазола (клотримазол), триазольные препараты (флуконазол), полиеновые препараты (натамицин). Натамицин – тетраеновый макролид, в состав которого входит лактонное кольцо из 25 атомов углерода. Показано, что натамицин существует в D-форме, в водных растворах проявляет амфотерные свойства, изоэлектрическая точка находится в районе pH = 6,5. Натамицин хорошо растворяется в органических растворителях, таких как ледяная уксусная кислота, метилпирролидон, диметилформамид, диметилсульфоксид, глицерин, пропиленгликоль, хлороформ, этилацетат, метанол и др. Натамицин практически нерастворим в петролейном эфире, гексане, бензоле, растворимость же натамицина в воде весьма ограниченна и составляет по разным оценкам от 20 до 50 мг/л[1] [5, 6].

Действие натамицина основано на подавлении роста грибковых клеток за счет специфического связывания с эргостеролом, участвующим в формировании клеточной стенки. Есть данные, что действие натамицина связано с взаимодействием с молекулой эргостерола, которое приводит к изменению конформации последнего и тем самым препятствует осуществлению им биологической функции в грибковой клетке. По-видимому, не происходит значительного изменения проницаемости мембраны, как в случае с нистатином. Натамицин отличается по механизму действия от остальных известных полиеновых противогрибковых препаратов, однако механизм его действия на данный момент не изучен [7].

В настоящее время среди вагинальных форм, содержащих натамицин в своем составе и предназначенных для вагинального применения, в государственном реестре лекарственных средств (ГРЛС) зарегистрированы суппозитории различного состава с содержанием действующего вещества 100 мг. Наиболее ранним зарегистрированным в ГРЛС препаратом, содержащим натамицин, является «Пимафуцин®, суппозитории вагинальные, 100 мг», производство «ЛЕО Фарма» (регистрационное удостоверение П N013552/01). Однако в ходе анализа ассортимента лекарственных средств, содержащих в качестве активного компонента натамицин, выяснилось, что в реестре содержатся сведения только о такой интервагинальной форме, как суппозитории. Представляет интерес создание лекарственного препарата (ЛП), попадающего под определение «гибридный лекарственный препарат». Обращаясь к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза, можно отметить, что при производстве нового ЛП у производителя есть несколько возможных путей регистрации: как воспроизведенный лекарственный препарат (генерик) или как гибридный лекарственный препарат. При этом, если воспроизведенный лекарственный препарат должен соответствовать оригинальному лекарственному препарату по количественному и качественному составу действующих веществ, иметь ту же лекарственную форму, что и референтный препарат, то гибридный лекарственный препарат может отличаться от оригинального ЛП комбинацией действующих веществ, показаниями к применению, дозировкой, лекарственной формой, путем введения. В качестве одного из этапов оценки биоэквивалентности ЛП используют тест сравнительной кинетики растворения *in vitro* (ТСКР). Для получения достоверных результатов используют профили растворения, полученные, как правило, в трех средах растворения с pH 1,2; 4,5; 6,8. Для того, чтобы тест «Растворение» был корректным, необходимо установить биофармацевтические свойства действующего вещества в соответствии с биофармацевтичечской системой классификации [8].

Цель настоящего исследования – разработка методики проведения теста «Растворение» для вагинальных суппозиториев Пимафуцин®.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – суппозитории вагинальные на липофильной основе Пимафуцин®, состав приведен в таблице 1.

Для проведения измерений использовалось следующее оборудование и реактивы: лабораторные аналитические весы Pioneer PA214C (OHAUS, США); тестер растворения DFZ II «Проточная ячейка» (ERWEKA GmbH, Германия); тестер растворения ERWEKA DT 820; высокоэффективный жидкостный хроматограф Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный диодно-матричным детектором; спектрофотометр СФ-104; хроматографическая колонка Nucleodur C18 Gravity, 250 × 4,6 мм, 5 мкм, размер пор 100 Å; термошейкер TS-100 (BioSan, Латвия); центрифуга «Микроспин» FV-2400 (BioSan, Латвия).

При проведении исследования использовались следующие реактивы: натрия ацетата тригидрат (ч.д.а., Merck KGaA, Германия), цетилтриметиламмония бромид (ос.ч., VWR International, LLC, США), ацетонитрил (HPLC gradient grade, J.T. Baker, США), натрия лаурилсульфат EMPICOL LX/N (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Рос-

[1] Evaluation of certain food additives and contaminants: fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9241209097. Accessed: 04.03.2024.

сия), хлористоводородная кислота (х.ч., ООО «АЛЬДОСА», Россия), трифторуксусная кислота (HPLC grade, PanReac, США), полисорбат-80 (Acros Organics Bvba, Бельгия), уксусная кислота ледяная (HPLC grade, Sharlau, Германия), калия дигидрофосфат (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия), натрия гидроксид (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия). Субстанция натамицина произведена North China Pharmaceutical Huasheng Co., Ltd. (Китай). В качестве стандартного образца был использован Natamycin USP CRS (кат. номер 1457505) серии R10990, чистота стандартного образца составляет 91,3 %.

Таблица 1. Состав суппозиториев Пимафуцин®

Table 1. Composition of suppositories Pimafucin®

№	Компонент Component	Масса на 1 суппозиторий, мг Mass per one suppository, mg	Содержание, % Content, %
1	Натамицин Natamycin	100	3,93
2	Цетиловый спирт Cetyl alcohol	690	27,13
3	Жир твердый Fats	700	27,53
4	Сорбитана триолеат Sorbitan trioleate	460	18,09
5	Полисорбат-80 Polysorbate 80	460	18,09
6	Натрия гидрокарбонат Sodium bicarbonate	69	2,71
7	Адипиновая кислота Adipic acid	64	2,52
8	Итого: In total:	2543	100

Исходя из вагинального способа применения ЛП Пимафуцин®, было принято решение использовать pH среды растворения, близкое по значению к pH влагалища (3,8–6,2) [9]. Для создания такого pH используются различные буферные среды, описанные в базе данных FDA Dissolution Methods: ацетатный, фосфатный, цитратный буферные растворы. В качестве ПАВ добавляются твин-80, твин-20, лаурилсульфат натрия, цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) [10–11].

В качестве среды растворения был выбран ацетатный буферный раствор с 0,5 % масс/об цетилтриметиламмония бромида, pH = 4,5, поскольку среды растворения с лаурилсульфатом натрия не позволяли добиться нужного высвобождения за 45 мин, что показано в более ранних исследованиях [12–20], а также поскольку именно в данных условиях удавалось получить лучшие значения растворимости натамицина (таблица 2).

Приготовление сред растворения с pH 1,2 (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты), 4,5 (натрия ацетатный буферный раствор с pH 4,5), 6,8 [фосфатный буферный раствор с pH 6,8 (4)] описано в Государственной фармакопее РФ XV издания[1, 2].

Приготовление 1%-го раствора додецилсульфата натрия в 0,1 М хлористоводородной кислоте. 10 г додецилсульфата натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл. Прибавляют около 600 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают до растворения и доводят объем раствора 0,1 М хлористоводородной кислотой до метки.

Приготовление 1%-го раствора твина-80, pH 4,5. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 10 г твина-80, прибавляют 600 мл натрия ацетатного буферного раствора с pH 4,5, перемешивают до растворения и доводят объем раствора растворителем до метки.

Приготовление 0,5%-го раствора цетилтетраметиламмония бромида, pH 4,5. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 5 г цетилтетраметиламмония бромида, 6,9 г натрия ацетата тригидрата, прибавляют около 800 мл воды очищенной и перемешивают до растворения навесок. Объем раствора доводят до метки водой очищенной, pH полученного раствора доводят до 4,5 уксусной кислотой ледяной.

Приготовление 30%-го раствора уксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 50 мл воды, прибавляют 30 г ледяной уксусной кислоты, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки.

Приготовление ацетатного буфера. В стакан вместимостью 100 мл помещают 13,8 г ацетата натрия тригидрата, количественно переносят навеску в мерную колбу вместимостью 2000 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. pH полученного раствора доводят до значения 4,5 ± 0,05 30%-й уксусной кислотой.

Приготовление среды растворения. В стакан вместимостью 100 мл навешивают 10 г ЦТАБ, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 2000 мл, растворяют в ацетатном буфере, перемешивают и доводят объем раствора до метки ацетатным буфером. Полученный буферный раствор фильтруют при помощи установки Millipore через PTFE-фильтры с размером пор 0,45 мкм.

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-2/rastvorenie-dlya-tvyerdykh-dozirovannykh-lekarstvennykh-form/ Ссылка активна на 04.03.2024.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Буферные растворы. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-3/bufernye-rastvory/ Ссылка активна на 04.03.2024.

Таблица 2. Результаты определения биофармацевтической растворимости натамицина

Table 2. Determination of natamycin biopharmaceutical solubility

№	Среда растворения Dissolution media	Концентрация натамицина, мг/мл Natamycin concentration, mg/ml	D/S	Биофармацевтическая растворимость Biopharmaceutical solubility
1	0,1 М хлористоводородная кислота, pH 1,2 0,1 M Hydrochloric acid, pH 1,2	0,078	1282	Низкая Low
2	Натрий-ацетатный буферный раствор, pH 4,5 Sodium acetate buffer solution, pH 4,5	0,031	3225	Низкая Low
3	Фосфатный буферный раствор (4), pH 6,8 Phosphate buffer solution (4) pH 6.8	0,035	2857	Низкая Low
4	1%-го раствора додецилсульфата натрия в 0,1 М хлористоводородной кислоте 1 % Sodium dodecyl sulfate solution in 0,1 M Hydrochloric acid	1,05	95	Высокая High
5	1%-го раствора твина-80, pH 4,5 1 % Tween-80 solution pH 4,5	0,48	208	Высокая High
6	0,5%-го раствора цетилтетраметиламмония бромида, pH 4,5 0,5 % Cetyltetramethylammonium bromide pH 4,5	0,59	169	Высокая High
7	60 : 40 % об. 0,5%-го раствора цетилтетраметиламмония бромида с pH 4,5 и изопропилового спирта 60 : 40 % vol. 0,5 % Cetyltetramethylammonium bromide pH 4,5: Isopropyl alcohol	4,12	24	Высокая High

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение биофармацевтической растворимости

Для определения биофармацевтической растворимости в 3 пробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл помещают навески натамицина 100 мг (точная навеска), прибавляют 1 мл полученной среды растворения. Пробирки помещают в термошейкер на 48 ч при температуре 37 °С и 1400 об/мин. Через сутки определяют содержание натамицина в растворе. Перед проведением хроматографии образцы центрифугируют, отбирают 100 мкл супернатанта и разбавляют в 10 раз раствором подвижной фазы.

Анализ проводят в изократическом режиме (подвижная фаза представляет собой 0,1%-й водный раствор трифторуксусной кислоты с ацетонитрилом в соотношении 60 : 40 %) со спектрофотометрическим детектированием при длине волны 304 нм, объем ввода – 20 мкл, температура термостата колонок – 25 °С. Стандартные растворы в диапазоне концентраций от 1 до 120 мкг/мл готовили, используя в качестве растворителя подвижную фазу. Типичные хроматограммы представлены на рисунках 1–2.

Биофармацевтическую растворимость определяли в различных средах растворения, кроме классических 0,1 н хлористоводородной кислоты с pH = 1,2; ацетатного буферного раствора с pH = 4,5; фосфатного буферного раствора с pH = 6,8; биофармацевтическую растворимость определяли в средах растворения, содержащих поверхностно-активные вещества (ПАВ) и также изопропиловый спирт. В качестве сред растворения, содержащих ПАВ, были использованы 1%-й раствор додецилсульфата натрия в 0,1 М хлористоводородной кислоте (pH = 1,2); 1%-й раствор твина-80 (pH = 4,5); 0,5%-й раствор цетилтетраметиламмония бромила (pH = 4,5); 60 : 40 % об. 0,5%-й раствор цетилтетраметиламмония бромида (pH = 4,5) и изопропилового спирта.

При проведении оценки биофармацевтической растворимости натамицина принималась во внимание растворимость натамицина в широком диапазоне pH. Известно, что растворы натамицина являются стабильными в диапазоне pH от 5 до 9, а также что натамицин показывает в водных растворах наибольшую растворимость в диапазоне значений pH от 5 до 6, причем растворимость снижается как с уменьшением, так и с увеличением значения pH водных растворов [18]. Также показано, что значения растворимости натамицина практически не изменяются в диапазоне pH от 4 до 10 для растворов, содержащих 25 % метанола, рост же растворимости при экстремальных значениях pH сопровождается деградацией натамицина [19]. В связи с вышеизложенным авторы не проводили дальнейшие исследования в средах растворения со значением pH выше 6,8.

Отбор проб проводился в нескольких временных точках, а именно 8, 24 и 48 ч. Следует отметить, что оптимальные значения, соответствующие насы-

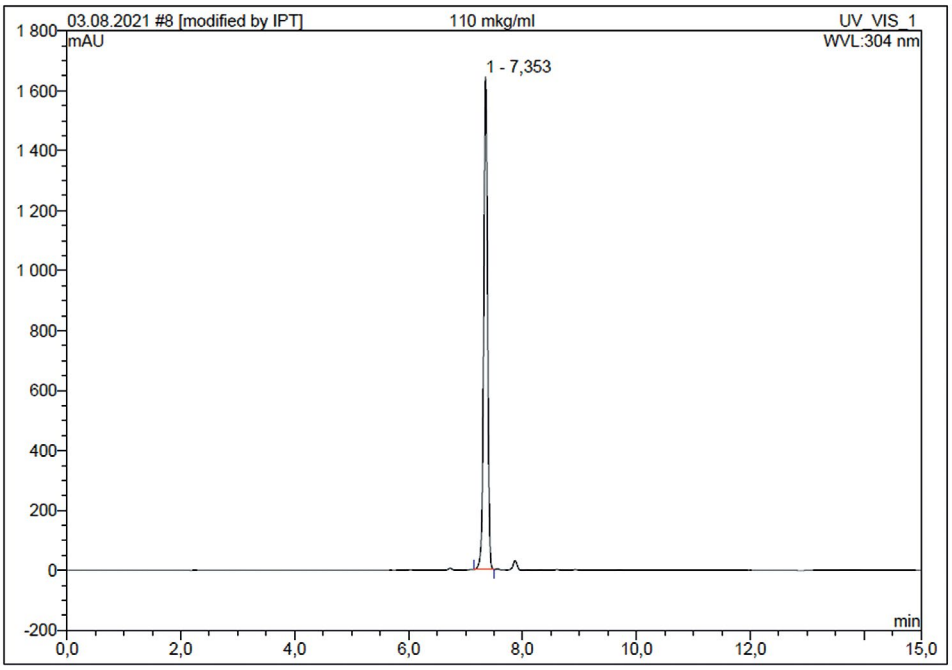


Рисунок 1. **Типичная хроматограмма стандартного раствора**

Figure 1. **Characteristic chromatogram of a standard solution**

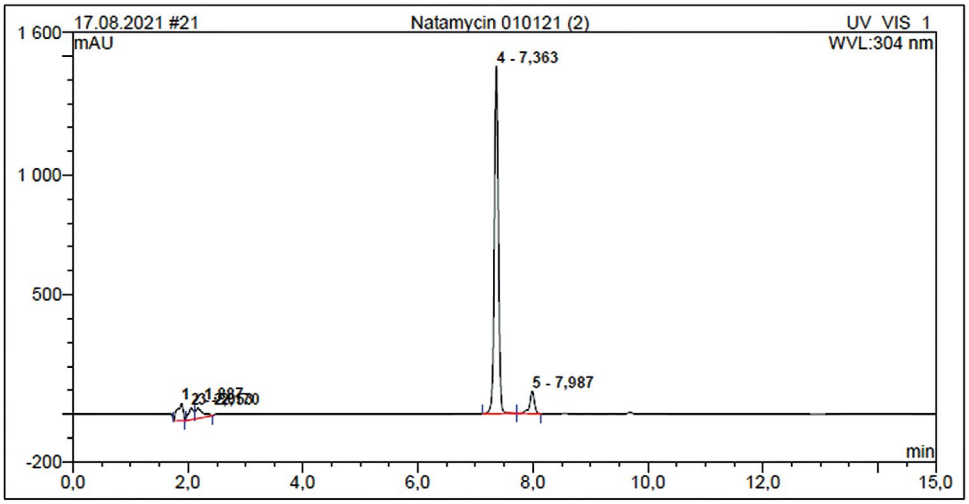


Рисунок 2. **Типичная хроматограмма испытуемого раствора**

Figure 2. **Characteristic chromatogram of a sample solution**

щению раствора, получали в точке 24 ч. Отбор проб через 8 ч не давал равновесных значений концентрации, которые наблюдались в точках 24 и 48 ч. Результаты определения биофармацевтической растворимости натамицина представлены в таблице 2 для точки 24 ч. Для классических сред растворения, применяемых в тесте сравнительной кинетики растворения, биофармацевстическая растворимость может быть определена как низкая (дозовое число превышает 250, что соотносится с литературными данными, согласно которым натамицин относится к IV группе лекарственных веществ, то есть обладает низкой растворимостью и низкой проницаемостью [13]). Тем не менее следует отметить, что это не отменяет терапевтической эффективности натамицина, обусловленной прежде всего его местным действием в очагах развития грибковых инфекций. Модификация среды растворения добавлением ПАВ или изопропи-

Таблица 3. Высвобождение натамицина из суппозиториев Пимафуцин® через 180 мин

Table 3. Natamycin dissolution value from Pimafucin® suppositories after 180 minutes

№	1	2	3	4	5	6	Среднее, % Average, %	RSD, %
Высвобождение в проточной ячейке, Q, % Dissolution value in flow cell, Q, %	77,1	78,6	83,9	78,3	80,2	79,4	79,6	3,0
Высвобождение во вращающейся корзинке, Q, % Dissolution value in basket, Q, %	77,3	69,8	71,4	81,3	73,9	78,2	75,3	5,8

лового спирта позволяет увеличить растворимость натамицина и делает эти среды более предпочтительными для разработки методики контроля качества.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что в растворах, представляющих собой среды растворения, используемые в процессе проведения ТСКР, натамицин не растворяется, его концентрация в точке 24 ч только для среды растворения с pH = 1,2 приближается к концентрации 0,11 мг/мл, которая соответствует 100%-му высвобождению для дозировки 100 мг и объема среды растворения 900 мл. Таким образом, приведенные буферные растворы не позволят достичь цели исследования, а именно добиться полного высвобождения натамицина из готовой лекарственной формы. Также стоит отметить, что стабильность натамицина показана в диапазоне значений pH от 5 до 9 [5]. Действительно, при проведении исследований с 0,1 М раствором соляной кислоты отмечалось наличие большого количества продуктов деградации натамицина, что не позволяет использовать среды растворения с низкими значениями pH раствора.

Подбор условий проведения теста «Растворение» для суппозиториев на липофильной основе, содержащих натамицин

После определения биофармацевтической растворимости был проведен тест «Растворение» в аппарате «Вращающаяся корзинка», который используется для суппозиториев на липофильной основе наряду с аппаратом «Проточная ячейка» согласно базе данных FDA[1] [15, 16].

Условия проведения испытания для аппарата «Проточная ячейка»:

- среда растворения – 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромид в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5);
- объем среды растворения – 900 мл;
- скорость потока – 32 мл/мин;
- температура – 37 ± 0,5 °С.

[1] FDA dissolution methods database. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/CDER/dissolution/dsp_getallData.cfm. Accessed: 16.08.2023.

Условия проведения испытания для аппарата «Вращающаяся корзинка»:

- среда растворения – 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромид в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5);
- объем среды растворения – 900 мл;
- скорость вращения – 100 об/мин;
- температура – 37 ± 0,5 °С

Исходя из проведенных ранее экспериментов, отбор проб осуществляли в нескольких временных точках: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 и 180 мин. Поскольку получение профиля высвобождения не является конечной целью данной работы, приведены значения для временных точек, в которых удавалось получить высвобождение свыше 70 % для 6 единиц лекарственного препарата, данное значение ниже указанного в фармакопее значения 75 %, что связано с низкой растворимостью натамицина. При выборе среды растворения стремились к тому, чтобы подобное значение можно было получить через 45 мин.

Высвобождение Q (%) по 6 единицам лекарственной формы через 180 мин составило от 70 до 78 % для каждой единицы, подробные результаты представлены в таблице 3.

Из полученных результатов следует, что возможность в данной среде растворения получить значения высвобождения для каждой единицы составляла не менее 70 % для 6 единиц лекарственной формы, причем среднее значение составило 75 %, тем не менее такие значения высвобождения наблюдались лишь через 180 мин, что говорит о невозможности использования данной среды и условий в качестве методики контроля качества для показателя «Растворение» суппозиториев Пимафуцин®. Поскольку не было выявлено значимых различий в высвобождении с использованием аппаратов «Проточная ячейка» и «Вращающаяся корзинка», дальнейшие исследования проводились с использованием «Вращающейся корзинки».

Для суппозиториев на липофильной основе могут применять в качестве сред растворения составы, содержащие органические растворители, как правило, изопропиловый спирт. Органические растворители, как и поверхностно-активные вещества, призваны повысить растворимость действующего

вещества в среде растворения и увеличить наблюдаемые значения высвобождения, что особенно важно для веществ, относящихся ко II и IV классам БКС, в том числе и для натамицина [10, 11, 13, 15]. Это подтверждается авторами, в частности, при исследовании биофармацевтической растворимости натамицина. Известно, что добавка органического растворителя является крайней мерой и применяется только в случае, когда невозможно достичь требуемых значений высвобождения никакими другими способами. Тем не менее накопленные экспериментальные данные по растворению суппозиториев в разных средах, не содержащих органические растворители, показали, что не удается достичь полного высвобождения менее чем за 120–180 мин, варьируя значения pH, буферную емкость и содержание поверхностно-активных веществ. Все вышеперечисленное говорит в пользу того, что добавление органического растворителя может быть возможным вариантом. В базе FDA также представлены среды растворения, в которых в качестве органического растворителя используется изопропиловый спирт, причем его содержание составляет 40 об. %. Безусловно, данное содержание органического компонента является достаточно высоким, тем не менее в такой концентрации он используется для таблеток атовакуона (II класс по системе БКС) [17], поэтому именно оно было выбрано для дальнейших исследований.

В результате были предложены следующие условия растворения:

- среда растворения – 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромид в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5) и изопропиловый спирт в объемном соотношении 60 : 40 % об.;
- объем среды растворения – 900 мл;
- прибор – вращающаяся корзинка;
- скорость вращения – 100 об/мин;
- температура – 37 ± 0,5 °C.

Приготовление среды растворения. В стакан вместимостью 100 мл навешивают 10 г ЦТАБ, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 2000 мл, растворяют в ацетатном буфере, перемешивают и доводят объем раствора до метки ацетатным буфером. Смешивают 1200 мл полученного раствора и 800 мл изопропилового спирта. Полученный буферный раствор фильтруют при помощи установки Millipore через PTFE-фильтры с размером пор 0,45 мкм.

Результаты растворения по 6 суппозиториям через 150 мин представлены в таблице 4.

Полученные результаты говорят о том, что в данных условиях высвобождение натамицина происходит лишь спустя значительный промежуток времени, а условия растворения не являются подходящими для стандартных требований теста «Растворение».

Как видно из полученных результатов, для высвобождения натамицина из суппозиториев требуется не менее 150 мин, что не отвечает стандартным условиям проведения теста «Растворение». Такие результаты могут отчасти объясняться свойствами самой субстанции, так как натамицин плохо растворим в воде и буферных средах. Также, по-видимому, недостаточное высвобождение объясняется свойствами самой основы суппозитория, так как для всех сред растворения и в любом из аппаратов не удавалось добиться полного растворения основы, не оказывала значительного влияния также и смена среды растворения (рисунок 3). При анализе оставшегося, нерастворившегося фрагмента суппозитория в нем обнаруживалось количество натамицина, пропорциональное не перешедшей в раствор части. Поскольку не удалось подобрать адекватные условия растворения для данного препарата, было при-

Рисунок 3. Суппозиторий «Пимафуцин» после 24 часов растворения со сменой среды растворения

Figure 3. «Pimafucin» suppository after 24 hour dissolution with media changing

Таблица 4. Высвобождение натамицина из суппозиториев Пимафуцин® в среде растворения с добавлением изопропилового спирта

Table 4. Natamycin dissolution value from Pimafucin® suppositories in dissolution media with isopropyl alcohol

№	1	2	3	4	5	6	Среднее, % Average, %	RSD, %
Высвобождение, Q, % Dissolution value, Q, %	66,6	65,3	70,8	69,1	77,2	81,2	71,8	6,7

нято решение проанализировать другой препарат, отличающийся по составу от исходных суппозиториев Пимафуцин®, но содержащий то же количество активного фармацевтического ингредиента.

В настоящее время на рынке зарегистрирован ряд препаратов, содержащих натамицин, в форме суппозиториев. Как представитель препаратов, зарегистрированных в соответствии с нормами ЕАЭС, может рассматриваться «Примацин», производство ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», регистрационное удостоверение ЛП-№(002651)-(РГ-RU). Состав данных суппозиториев представлен в таблице 5. Из таблицы видно, что они отличаются не только по составу, но и по количеству вспомогательных веществ: при той же дозировке натамицина 100 мг суппозиторий весит 1500 мг, в отличие от «Пимафуцина», масса которого составляет 2543 мг.

Таблица 5. Состав суппозиториев «Примацин»

Table 5. Composition of suppositories "Primacin"

№	Компонент Component	Масса на 1 суппозиторий, мг Mass per one suppository, mg	Содержание, % Content, %
1	Натамицин Natamycin	100,00	6,67
2	Макрогола глицерилгидроксистеарат Macrogol glycerol hydroxystearate	75,00	5,00
3	Кремния диоксид коллоидный Colloidal silica	20,00	1,33
4	Жир твердый (витепсол (марки H 15, W 35), Суппосир® (марки NA 15, NAS 50)) Fats (Witepsol (H 15, W 35), Suppocire® (NA 15, NAS 50)	1305,00	87,00
5	Итого: In total:	1500	100

Для суппозиториев «Примацин» было изучено растворение в стандартных средах, используемых при проведении теста сравнительной кинетики растворения, а именно в 0,1 М растворе соляной кислоты, натрий-ацетатном буферном растворе с pH 4,5, фосфатном буферном растворе (4) с pH 6,8. Результаты растворения представлены в таблице 6.

Представленные в таблице 6 результаты позволяют сделать вывод о необходимости по меньшей мере добавления ПАВ в среду растворения, также может потребоваться добавка органического растворителя. Сравнивая результаты для разных значений pH, можно сделать вывод, что его изменение относительно буферного раствора с pH 4,5 как в большую, так и в меньшую сторону не оказывает значительного влияния на высвобождение, тем не менее отклонение pH в сторону как сильно кислых, так и слабо щелочных, щелочных растворов может увеличивать деградацию натамицина, поэтому в дальнейших экспериментах использовались среды с pH 4,5.

Для данных суппозиториев удалось добиться высвобождения за меньшее время, был проведен тест «Растворение» для 6 единиц лекарственной формы в средах растворения, представленных выше, а именно в среде 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромида в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5) и 60 : 40 % об. 0,5 % (м/об) цетилтриметиламмония бромида в 50 мМ растворе ацетата натрия тригидрата (pH 4,5) и изопропилового спирта. В качестве аппарата растворения использовалась вращающаяся корзинка, скорость – 100 об/мин. Объем среды составлял 900 мл, а температура среды растворения – 37 °C. Результаты растворения представлены в таблице 7.

Исходя из полученных результатов, можно говорить о полном растворении натамицина в среде с добавлением изопропилового спирта: среднее значение превышает 85 %, что является стандартным требованием Фармакопеи РФ. Также для всех двенадцати единиц лекарственной формы высвобождение составило не менее 85 %, что говорит о применимости данных условий для теста «Растворение».

Таблица 6. Результаты растворения суппозиториев «Примацин» в средах растворения, использующихся при проведении ТСКР

Table 6. Dissolution test results for "Primacin" in media used in CDKT

№	Среда растворения Dissolution media	начение высвобождения в различных временных точках, Q, % Dissolution value in time, Q, %					
		5 мин 5 min	15 мин 15 min	30 мин 30 min	45 мин 45 min	60 мин 60 min	90 мин 90 min
1	0,1 М хлористоводородная кислота, pH 1,2 0,1 M Hydrochloric acid, pH 1,2	9,3	20,3	22,6	24,4	28,2	31,0
2	Натрий-ацетатный буферный раствор, pH 4,5 Sodium acetate buffer solution, pH 4,5	2,7	9,1	17,5	21,2	22,8	26,2
3	Фосфатный буферный раствор (4), pH 6,8 Phosphate buffer solution (4) pH 6.8	3,2	10,1	17,9	25,7	27,6	29,9

Таблица 7. Высвобождение натамицина из суппозиториев «Примацин» через 45 мин в различных средах растворения

Table 7. Natamycin dissolution value from "Primacin" suppositories in different dissolution medias after 45 minutes

№	1	2	3	4	5	6	Среднее, % Average, %	RSD, %
Высвобождение, %, в среде без добавления изопропилового спирта Dissolution value, Q, % in media without isopropyl alcohol	78,6	82,4	80,4	81,9	82,4	78,9	80,8	2,1
Высвобождение, %, в среде с добавлением изопропилового спирта Dissolution value, Q, % in media with isopropyl alcohol	97,1	94,5	93,8	99,8	95,7	96,7	96,3	2,2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной экспериментальной работы были подобраны условия проведения теста «Растворение» для суппозиториев на липофильной основе, содержащих в своем составе натамицин. Главной сложностью при подборе среды растворения для лекарственных форм с данной активной фармацевтической субстанцией является ее низкая растворимость в воде и буферных средах, о чем и говорит отнесение натамицина к IV классу соединений согласно биофармацевтической классификации. Для увеличения растворимости данной субстанции в среде растворения и получения полного высвобождения действующего вещества (Q ≥ 70 %) за 45 мин в данной работе использовалось поверхностно-активное вещество (цетилтриметиламмония бромид) и органический растворитель (изопропиловый спирт).

Было показано, что полное высвобождение действующего вещества из суппозиториев «Пимафуцин» недостижимо по причине крайне низкой растворимости основы и отсутствия диффузии действующего вещества в среду растворения.

Суппозитории «Примацин» имеют отличный от «Пимафуцина» состав, а соотношение вспомогательных веществ и активной фармацевтической субстанции позволяет ей полностью высвобождаться.

Таким образом, были подобраны условия проведения теста «Растворение» для суппозиториев вагинальных, содержащих в своем составе натамицин, позволяющие добиться полного высвобождения действующего вещества из суппозиторной основы для препарата «Примацин».

ЛИТЕРАТУРА

1. de Cássia Orlandi Sardi J., Silva D. R., Anibal P. C., Carvalho Moraes de Campos Baldin J. J., Rodrigues Ramalho S., Rosalen P. L., Rodrigues Macedo M. L., Francisco Hofling J. Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options. *Current Fungal Infection Reports*. 2021;15:32–40. DOI: 10.1007/s12281-021-00415-9.
2. Адаскевич В. П. Заболевания, передаваемые половым путем. Витебск: Издательство Витебского медицинского института,; 1997. 310 с.
3. Инфекции, передаваемые половым путем и иные инфекции репродуктивного тракта. Руководство по основам медицинской практики. Всемирная организация здравоохранения; 2004. 196 с.
4. Foessleitner P., Petricevic L., Boerger I., Steiner I., Kiss H., Rieger A., Touzeau-Roemer V., Farr A. HIV infection as a risk factor for vaginal dysbiosis, bacterial vaginosis, and candidosis in pregnancy: A matched case-control study. *Birth*. 2021;48:139–146. DOI: 10.1111/birt.12526.
5. Brik H. Natamycin. In: Florey K., editor. Analytical Profiles of Drug Substances. New York: Academic Press; 1981. P. 513–561.
6. Houssam M. A., Selim Sh. M., Zayed M. S. Natamycin Antibiotic Produced By Streptomyces sp.: Fermentation, Purification And Biological Activities. *Journal of American Science*. 2012;8(2):469–475.
7. Te Welscher Y. M., ten Napel H. H., Balagué M. M., Souza C. M., Riezman H., de Kruijff B., Breukink E. Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(10):6393–6401. DOI: 10.1074/jbc.M707821200.
8. Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):56–60.
9. Owen D. H., Katz D. F. A vaginal fluid simulant. *Contraception*. 1999;59:91–95. DOI: 10.1016/S0010-7824(99)00010-4.
10. Joiga H., Mehta T., Patel M. Evaluation of dissolution media containing a novel synthetic surfactant by in vitro testing of BCS Class II Drugs. *Dissolution Technologies*. 2009;3(16):14–19. DOI: 10.14227/DT160309P14.
11. Incecayir T. The effects of surfactants on the solubility and dissolution profiles of a poorly water-soluble basic drug, carvedilol. *Pharmacize*. 2015;70(12):784–790 DOI: 10.1691/ph.2015.5081.
12. Usta D. Y., Incecayir T. Modeling of in vitro dissolution profiles of carvedilol immediate-release tablets in different dissolution media. *AAPS PharmSciTech*. 2022:23:201. DOI: 10.1208/s12249-022-02355-0.

13. Velpandian T., Nirmal J., Sharma H. P, Sharma S., Sharma N., Halder N. Novel water soluble sterile natamycin formulation (Natasol) for fungal keratitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;163:105857. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105857.
14. Дружининская О. В., Смехова И. Е. Среды растворения, применяемые в разработке и контроле качества лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):144–150.
15. Orlova T. V., Nesterova A. V., Ogneschikova N. D. The investigation of nonsteroid anti-inflammatory suppositories by dissolution test. Materials of the international conference "Process Management and scientific development". 2021. P. 104–108.
16. Palmeri A. Suppository dissolution testing: apparatus design and release of aspirin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1981;2(7):247–259 DOI: 10.3109/03639048109057715.
17. Kathpalia H., Juvekar S., Shidhaye S. Design and in vitro evaluation of atovaquone nanosuspension prepared by pH based and anti-solvent based precipitation method. *Colloids and Interface Science Communications*. 2019;29:26–32. DOI: 10.1016/j.colcom.2019.01.002.
18. Fang S., Peng X., Liang X., Shen J., Wang J., Chen J., Meng Y. Enhancing water solubility and stability of natamycin by molecular encapsulation in methyl-β-cyclodextrin and its mechanisms by molecular dynamics simulations. *Food Biophysics*. 2020;15:188–195. DOI: 10.1007/s11483-019-09620-z.
19. Zeng X., Danquah M. K., Jing K., Woo M. W., Chen X. D., Xie Y., Lu Y. Solubility properties and diffusional extraction behavior of natamycin from *Streptomyces gilvosporeus* biomass. *Biotechnology Progress*. 2013;29:109–115. DOI: 10.1002/btpr.1659.

REFERENCES

1. de Cássia Orlandi Sardi J., Silva D. R., Anibal P. C., Carvalho Moraes de Campos Baldin J. J., Rodrigues Ramalho S., Rosalen P. L., Rodrigues Macedo M. L., Francisco Hofling J. Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options. *Current Fungal Infection Reports*. 2021;15:32–40. DOI: 10.1007/s12281-021-00415-9.
2. Adaskevich V. P. Sexually transmitted diseases. Vitebsk: Publishing House of the Vitebsk Medical Institute; 1997. 310 p. (In Russ.)
3. Sexually transmitted infections and other infections of the reproductive tract. Guide to the Fundamentals of Medical Practice. World Health Organization; 2004. 196 p. (In Russ.)
4. Foessleitner P., Petricevic L., Boerger I., Steiner I., Kiss H., Rieger A., Touzeau-Roemer V., Farr A. HIV infection as a risk factor for vaginal dysbiosis, bacterial vaginosis, and candidosis in pregnancy: A matched case-control study. *Birth*. 2021;48:139–146. DOI: 10.1111/birt.12526.
5. Brik H. Natamycin. In: Florey K., editor. Analytical Profiles of Drug Substances. New York: Academic Press; 1981. P. 513–561.
6. Houssam M. A., Selim Sh. M., Zayed M. S. Natamycin Antibiotic Produced By Streptomyces sp.: Fermentation, Purification And Biological Activities. *Journal of American Science*. 2012;8(2):469–475.
7. Te Welscher Y. M., ten Napel H. H., Balagué M. M., Souza C. M., Riezman H., de Kruijff B., Breukink E. Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(10):6393–6401. DOI: 10.1074/jbc.M707821200.
8. Demina N. B. Biopharmaceutical classificatiom system as a tool for the development of drug formulations and their designs. *Drug development & registration*. 2017;(2):56–60. (In Russ.)
9. Owen D. H., Katz D. F. A vaginal fluid simulant. *Contraception*. 1999;59:91–95. DOI: 10.1016/S0010-7824(99)00010-4.
10. Joiga H., Mehta T., Patel M. Evaluation of dissolution media containing a novel synthetic surfactant by in vitro testing of BCS Class II Drugs. *Dissolution Technologies*. 2009;3(16):14–19. DOI: 10.14227/DT160309P14.
11. Incecayir T. The effects of surfactants on the solubility and dissolution profiles of a poorly water-soluble basic drug, carvedilol. *Pharmacize*. 2015;70(12):784–790 DOI: 10.1691/ph.2015.5081.
12. Usta D. Y., Incecayir T. Modeling of in vitro dissolution profiles of carvedilol immediate-release tablets in different dissolution media. *AAPS PharmSciTech*. 2022:23:201. DOI: 10.1208/s12249-022-02355-0.
13. Velpandian T., Nirmal J., Sharma H. P, Sharma S., Sharma N., Halder N. Novel water soluble sterile natamycin formulation (Natasol) for fungal keratitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;163:105857. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105857.
14. Druzhininskaya O. V., Smekhova I. E. Dissolution media used in development and quality control of drugs. *Drug development & registration*. 2017;(3):144–150. (In Russ.)
15. Orlova T. V., Nesterova A. V., Ogneschikova N. D. The investigation of nonsteroid anti-inflammatory suppositories by dissolution test. Materials of the international conference "Process Management and scientific development". 2021. P. 104–108.
16. Palmeri A. Suppository dissolution testing: apparatus design and release of aspirin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1981;2(7):247–259 DOI: 10.3109/03639048109057715.
17. Kathpalia H., Juvekar S., Shidhaye S. Design and in vitro evaluation of atovaquone nanosuspension prepared by pH based and anti-solvent based precipitation method. *Colloids and Interface Science Communications*. 2019;29:26–32. DOI: 10.1016/j.colcom.2019.01.002.
18. Fang S., Peng X., Liang X., Shen J., Wang J., Chen J., Meng Y. Enhancing water solubility and stability of natamycin by molecular encapsulation in methyl-β-cyclodextrin and its mechanisms by molecular dynamics simulations. *Food Biophysics*. 2020;15:188–195. DOI: 10.1007/s11483-019-09620-z.
19. Zeng X., Danquah M. K., Jing K., Woo M. W., Chen X. D., Xie Y., Lu Y. Solubility properties and diffusional extraction behavior of natamycin from *Streptomyces gilvosporeus* biomass. *Biotechnology Progress*. 2013;29:109–115. DOI: 10.1002/btpr.1659.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.322; 615.076.7; 615.017

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1932

Check for updates

CC BY 4.0

Сравнительное микробиологическое и фитохимическое исследование извлечений из листьев сортовых форм рода *Mentha* L.

М. А. Казакова, В. А. Куркин✉, В. М. Рыжов, А. В. Лямин, А. В. Козлов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава Росси). 443099, Россия, Самарская область, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

✉ **Контактное лицо:** Куркин Владимир Александрович. **E-mail:** v.a.kurkin@samsmu.ru

ORCID: М. А. Казакова – https://orcid.org/0009-0008-3304-0750;
В. А. Куркин – https://orcid.org/0000-0002-7513-9352;
В. М. Рыжов – https://orcid.org/0000-0002-8399-9328;
А. В. Лямин – https://orcid.org/0000-0002-5905-1895;
А. В. Козлов – https://orcid.org/0000-0001-9384-6854.

Статья поступила: 11.09.2024 **Статья принята в печать:** 20.02.2025 **Статья опубликована:** 21.02.2025

Резюме

Введение. В связи с повышением резистентности к антимикробным препаратам разного спектра действия у населения вопрос поиска новых препаратов, обладающих антимикробной активностью, в настоящий момент наиболее актуален. Мята перечная (*Mentha piperita* L.) известна своими лекарственными свойствами, которые обусловлены наличием в лекарственном растении различных биологически активных соединений. Извлечения из листьев мяты перечной содержат в своем составе эфирное масло, основным компонентом которого является ментол, а также нелетучие фенольные соединения – флавоноиды (лютеолин и др.) и фенилпропаноиды (розмариновая кислота, сальвианоловая кислота, хлорогеновая кислота и др.).

Цель. Сравнительное исследование противомикробной активности экстрактов из образцов исследуемого растительного сырья и проведение их качественного анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материалы и методы. Объектами исследования являлись водно-спиртовые извлечения на 70%-м этиловом спирте исследуемого растительного сырья. Определение минимальной ингибирующей концентрации проводили методом двойных серийных разведений в питательном бульоне Мюллера – Хинтон (Bio-Rad, США). В качестве тестовых культур использовали штаммы *Staphylococcus aureus* (АТСС 29213), *Bacillus cereus* (АТСС 29213), *Candida albicans* (АТСС 90028), *Escherichia coli* (АТСС 25922), Pseudomonas aeruginosa (АТСС 27853). Хроматографический анализ осуществляли методом ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: градиентный режим, стальная колонка КАХ-6-80-4 (№ 2; 2 × 80 мм; Сепарон-С18, 7 мкм); элюентная система: ацетонитрил (ПФА) – 1%-й раствор уксусной кислоты (ПФБ) (1 : 9; 2 : 8; 3 : 7; 8 : 2), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 330 нм. Объемы инжектируемых проб – 2 мкл.

Результаты и обсуждение. Таким образом, установлено, что все исследуемые образцы дают стабильный превалирующий антимикробный эффект в отношении штаммов тестовых культур.

Заключение. Полученные в ходе проведенного исследования данные свидетельствуют о перспективности получения лекарственных растительных препаратов на основе листьев мяты различных видов и сортов, проявляющих противомикробную активность.

Ключевые слова: мята, *Mentha* L., листья, водно-спиртовые извлечения, антимикробная активность, ВЭЖХ

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

Вклад авторов. М. А. Казакова осуществляла заготовку и сушку образцов сырья, проводила пробоподготовку к проведению микробиологического анализа и пробоподготовку и проведение качественного анализа исследуемых образцов методом ВЭЖХ. В. А. Куркин – консультирование по методикам проведения фитохимического анализа и

© Казакова М. А., Куркин В. А., Рыжов В. М., Лямин А. В., Козлов А. В., 2025
© Kazakova M. A., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Lyamin A. V., Kozlov A. V., 2025

полученным результатам разделов «Заключение», «Обсуждение результатов». В. М. Рыжов, А. В. Лямин участвовали в обработке данных. А. В. Козлов проводил микробиологическое исследование, выращивал тестовые культуры. Все авторы участвовали в написании статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Казакова М. А., Куркин В. А., Рыжов В. М., Лямин А. В., Козлов А. В. Сравнительное микробиологическое и фитохимическое исследование извлечений из листьев сортовых форм рода *Mentha* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):265–273. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1932

Comparative microbiological and phytochemical study of extracts from leaves of varietal forms of the genus *Mentha* L.

Maria A. Kazakova, Vladimir A. Kurkin✉, Vitaly M. Ryzhov, Artem V. Lyamin, Andrey V. Kozlov

Samara State Medical University (SamSMU). 89, Chapaevskaya str., Samara, Samara region, 443099, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir A. Kurkin. **E-mail:** v.a.kurkin@samsmu.ru

ORCID: Maria A. Kazakova – https://orcid.org/0009-0008-3304-0750;
Vladimir A. Kurkin – https://orcid.org/0000-0002-7513-9352;
Vitaly M. Ryzhov – https://orcid.org/0000-0002-8399-9328;
Artem V. Lyamin – https://orcid.org/0000-0002-5905-1895;
Andrey V. Kozlov – https://orcid.org/0000-0001-9384-6854.

Received: 11.09.2024 **Accepted:** 20.02.2025 **Published:** 21.02.2025

Abstract

Introduction. Due to the increasing resistance to antimicrobial drugs of different spectrum of action in the population, the issue of searching for new drugs with antimicrobial activity is currently the most relevant. Peppermint (*Mentha piperita* L.) is known for its medicinal properties, which are due to the presence of many biologically active compounds in the medicinal plant. The composition of extracts from the leaves of peppermint includes essential oil, the main component of which is menthol, as well as non-volatile phenolic compounds – flavonoids (luteolin etc.) and phenylpropanoids (rosemary acid, salvianolic acid, chlorogenic acid etc.).

Aim. To screen and compare the antimicrobial activity of aqueous-alcoholic extracts from peppermint leaves and mint varieties and to perform comparative qualitative analysis by high performance liquid chromatography (HPLC).

Materials and methods. The objects of the study were aqueous-alcoholic extracts on 70 % ethyl alcohol obtained by fractional percolation method from leaves of varieties of peppermint (*Mentha* L.) and alcoholic solutions of standard samples of luteolin and menthol. The minimum inhibitory concentration was determined by double serial dilutions in Mueller – Hinton nutrient broth (Bio-Rad, USA). *Bacillus cereus* (ATCC 29213) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 90028) strains were used as test cultures. Chromatographic analysis was carried out by HPLC on a Milichrome-6 microcolumn liquid chromatograph (NPASC "Nauchpribor") under the following conditions: gradient mode, steel column KAX-6-80-4 (No. 2; 2 × 80 mm; Separon-C18, 7 μm), eluent system: acetonitrile (PFA) – 1 % acetic acid (PFB) solution (1 : 9; 2 : 8; 3 : 7; 8 : 2), elution rate – 100 μl/min, eluent volume – 2500 μl. The substances were detected at a wavelength of 330 nm. The volumes of injected samples were 2 μl.

Results and discussion. In the course of the study it was found that all the tested samples give a stable prevailing antimicrobial effect against the strains of test cultures.

Conclusion. The data obtained in the course of the conducted study indicate the prospect of obtaining medicinal herbal preparations based on mint leaves of different species and varieties, showing antimicrobial activity, and their introduction into medical and pharmaceutical practice.

Keywords: mint, *Mentha* L., leaves, water-alcoholic extracts, antimicrobial activity, HPLC

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

Contribution of the authors. Maria A. Kazakova carried out the preparation and drying of raw material samples, sample preparation for microbiological analysis and sample preparation and qualitative analysis of the studied samples by HPLC. Vladimir A. Kurkin advised on the methods of phytochemical analysis and obtained results of the sections "Conclusion", "Discussion of results". Vitaly M. Ryzhov, Artem V. Lyamin participated in data processing. Andrey V. Kozlov conducted microbiological research and grew test cultures. All authors participated in writing the article and discussing the results.

For citation: Kazakova M. A., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Lyamin A. V., Kozlov A. V. Comparative microbiological and phytochemical study of extracts from leaves of varietal forms of the genus *Mentha* L. *Drug development & registration*. 2025;14(1):265–273. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1932

ВВЕДЕНИЕ

Листья мяты перечной (*Mentha piperita* L.) служат источником целого ряда лекарственных растительных средств, широко применяемых в медицинской практике [1–7]. Сырье данного растения применяется также в пищевой, сельскохозяйственной и парфюмерной промышленности [8–10]. Также широко культивируются различные сорта мяты перечной, отличающиеся содержанием эфирного масла, ментола и устойчивостью к грибковым болезням и вредителям. Из большого разнообразия произрастающих и широко культивируемых сортов мяты фармакопейным видом в настоящее время является только мята перечная (*Mentha piperita* L.) (ФС.2.5.0029.15)[1, 2] [12, 13]. Актуален поиск новых видов растительного сырья, проявляющих противомикробную активность. В рамках настоящего исследования был проведен анализ противомикробной активности водно-спиртовых извлечений на 70%-м этиловом спирте из листьев мяты разных видов и сортов, культивируемых в условиях Ботанического сада Самарского университета (г. Самара) и Никитского ботанического сада (г. Ялта) и сравнительный фитохимический анализ методом ВЭЖХ – для установления концентрации целевых биологически активных веществ, проявляющих противомикробную активность.

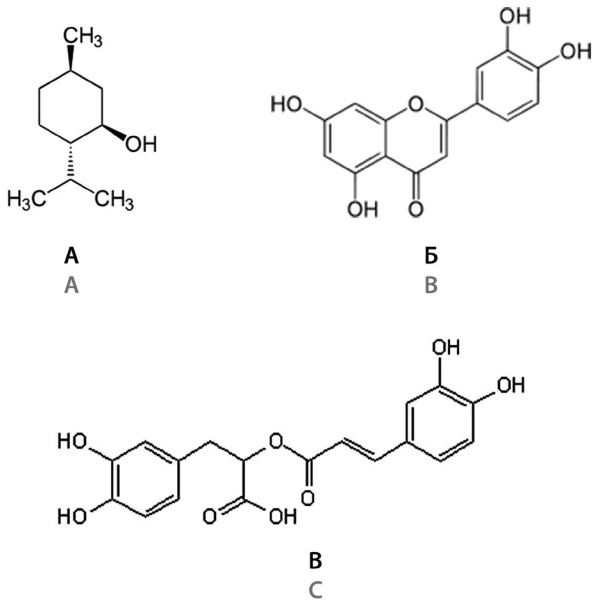
Escherichia coli (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 90028) являются широко известными микроорганизмами, вызывающими различные инфекционные заболевания.

Ранее нами были выявлены антимикробные свойства водно-спиртовых извлечений различных концентраций из листьев мяты перечной (рисунок 1). Также нами выявлено, что доминирующим биологически активным соединением является розмариновая кислота [14, 15], одним из фармакологических действий которой является противомикробное [16, 17]. По результатам проведенного анализа было выявлено, что наибольшей противомикробной активностью обладают водно-спиртовые извлечения, полученные методом дробной перколяции на 70%-м спирте этиловом, используемом в качестве экстрагента.

Цель

Проведение сравнительного фитохимического анализа и анализа противомикробной активности водно-спиртовых экстрактов листьев мяты.

В задачи исследования входили приготовление экстрактов (1 : 5) из сухого растительного сырья, проведение определения противомикробной активности объектов исследования с помощью метода двойных серийных разведений в бульоне Мюллера – Хинтона, определение качественных показателей водно-спиртовых извлечений методом ВЭЖХ с целью выявления наиболее эффективных образцов, обладающих противомикробным действием.



А
A

Б
B

В
C

Рисунок 1. Структурные формулы важнейших биологически активных соединений листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.):

А – ментол; Б – лютеолин; В – розмариновая кислота

Figure 1. Structural formulas of the most important biologically active compounds from the leaves of peppermint (*Mentha piperita* L.):

A – menthol; B – luteolin; C – rosmarinic acid

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись водно-спиртовые извлечения на 70%-м этиловом спирте из исследуемого растительного сырья.

Анализируемые образцы сырья

Листья мяты перечной (*Mentha piperita* L.), мяты перечной, сорт Шоколадная (*Mentha piperita* L. cv. Chocolate); мяты круглолистной, сорт Ананасная (*Mentha rotundifolia* (L.) Huds. cv. Ananasminze); мяты перечной, сорт Карамельная (*Mentha piperita* L. cv. Карамельная); мяты перечной, сорт Ментоловая (*Mentha piperita* L. cv. Ментоловая), собранных в Ботаническом саду Самарского университета (г. Самара), и листья мяты перечной (*Mentha piperita* L.), собранной в Никитском ботаническом саду (г. Ялта), заготовленные в июне 2022 года.

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том IV. Доступно по: https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol4/1102/#zoom=z. Accessed: 11.09.2024.

[2] Европейская фармакопея VIII издания Peppermint leaf 01/2011:0406.

Препараты сравнения

Препаратами сравнения являлись спиртовой раствор рабочего стандартного образца (СО) лютеолина 0,06%-го (содержание не менее 98 %, Sigma-Aldrich, США) и спиртовой раствор СО ментола 5%-го (в соответствии с ФС 387) [18].

Тестовые культуры

Тест-культурами являлись штаммы *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 90028).

Методы исследования

Определение МИК проводили методом двойных серийных разведений в бульоне в соответствии с методиками, описанными в ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам». Метод двойных серийных разведений по сравнению с диффузионными методами позволяет качественно оценить наличие антимикробного эффекта путем визуальной оценки в сравнении со стандартом и определения минимальной ингибирующей концентрации изучаемого образца, которая обеспечивает замедление роста исследуемых штаммов микроорганизмов [19, 20]. В качестве питательной среды использовали питательный бульон Мюллера – Хинтона (Bio-Rad, США).

Хроматографический анализ осуществляли методом ВЭЖХ в градиентном режиме на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: градиентный режим, стальная колонка КАХ-6-80-4 (№ 2; 2 × 80 мм; Сепарон-С18, 7 мкм); элюентная система: ацетонитрил (ПФА) (в соответствии с СТП ТУ СОМР 3-074-06 для ВЭЖХ) – 1%-й раствор уксусной кислоты (ПФБ) (1 : 9; 2 : 8; 3 : 7; 8 : 2) (таблица 1), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 330 нм. Объемы инжектируемых проб – 2 мкл.

Методика

Приготовление рабочего раствора

Для проведения исследования использовали микрометод, тестирование проводили при величине конечного объема 100 мкл. Рабочие растворы вносили в планшеты для микроразведений по 50 мкл на лунку. При помощи многоканальных пипеток 96-луночный стерильный планшет для иммунологических исследований (с плоским дном) с крышкой заполняли двойными серийными разведениями исследуемых извлечений. Затем разведения инокулировали приготовленной суспензией исследуемого микроорганизма. Инкубацию проводили в обычной атмосфере при температуре 35 °С. При проведении инкубации планшет закрывали крышкой для предотвращения высыхания содержимого лунок.

Приготовление инокулюма

Инокулюм готовили путем суспензирования колоний, отобранных из ночной культуры, выросшей на 5%-м кровяном агаре (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия). Окончательная микробная нагрузка в инокулюме составляла $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Для приготовления инокулюма с необходимой концентрацией микроорганизмов использовали 100 мкл суспензии, эквивалентной 0,5 стандарта Мак-Фарланда, которую переносили в пробирку, содержащую 9,9 мл (разведение 1 : 100) бульона, что позволяло получить суспензию с концентрацией клеток $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, при добавлении 50 мкл которой к равному объему (50 мкл) исследуемого раствора получали окончательный состав инокулюма. Инокулюм вносился в пробирки с разведениями образца не позднее 15 мин с момента его приготовления. Планшеты с тестируемыми штаммами инкубировали при температуре 35 °С в течение 20–24 ч.

Таблица 1. Профиль градиента хроматографического разделения

Table 1. Chromatographic separation gradient profile

Время, мин Time, min	**ПФА, %** PFA, %	**ПФБ, %** PFB, %	**Режим** Mode
0–4	10,0	90,0	Изократический Isocratic
4–10	10,0 → 20,0	90,0 → 80,0	Линейный градиент Linear Gradient
10–17,5	20,0 → 30,0	80,0 → 70,0	Линейный градиент Linear Gradient
17,5–25	30,0 → 80,0	70,0 → 20,0	Линейный градиент Linear Gradient

Оценка роста микроорганизмов

Для определения наличия роста микроорганизма лунки планшетов с посевами просматривали в проходящем свете. Рост культуры в присутствии тестируемого образца наблюдали при сравнении с лункой отрицательного контроля. МПК определяли по наименьшей концентрации тестируемого образца, которая подавляет видимый рост микроорганизма.

Оценка результатов эксперимента

Оценку результатов проводили визуально по наличию/отсутствию роста микроорганизмов в лунках стерильного планшета для иммунологических исследований с соответствующими разведениями исследуемых образцов. Минимальной ингибирующей концентрацией являлась самая низкая концентрация изучаемого образца, которая полностью подавляла рост штамма микроорганизмов. При этом, согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010, а также рекомендациям Стандарта производительности для тестов на чувствительность к антимикробным препаратам (CLSI), наличие мутности и обнаружение незначительного количества микроорганизмов (одна колония) не учитывали при регистрации результата эксперимента (в трех повторностях). Количество повторений каждого эксперимента было равным трем.

Хроматографический анализ осуществляли методом ВЭЖХ в градиентном режиме на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: градиентный режим, стальная колонка КАХ-6-80-4 (№ 2; 2 × 80 мм; Сепарон-С18, 7 мкм); элюентная система: ацетонитрил (ПФА) – 1%-й раствор уксусной кислоты (ПФБ) (1 : 9; 2 : 8; 3 : 7; 8 : 2), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 330 нм. Объемы инжектируемых проб – 2 мкл.

Для подтверждения соответствия образцов листьев мяты перечной и некоторых других видов и сортов требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания ранее нами были проведены исследования методом дифференциальной спектрофотометрии в УФ-области. Определено, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах варьируется от 1,26 ± 0,03 % до 8,35 ± 0,03 %, что соответствует требованиям ФС.2.5.0029.15 (нижний предел содержания суммы флавоноидов – не менее 0,6 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного сравнительного анализа исследуемые образцы показали значительную противомикробную активность в отношении штаммов *Bacillus cereus* (ATCC 29213) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853), Candida albicans* (ATCC 90028) (таблица 2). Результаты тестирования препаратов контроля представлены в таблице 3.

Таблица 2. Результаты тестирования извлечений из листьев изучаемых образцов рода мята (*Mentha* L.)

Table 2. Test results of extracts from leaves of the studied specimens of the genus Mentha (*Mentha* L.)

Кратность разведения* Dilution ratio*		Образцы** Samples**							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Pseudomonas aeruginosa									
1	1 : 2	–	–	–	–	–	–	–	–
2	1 : 4	–	–	–	–	–	–	–	–
3	1 : 8	–	–	–	–	–	–	–	–
4	1 : 16	–	–	–	–	–	+	+	–
5	1 : 32	+	+	+	+	+	+	+	+
6	1 : 64	+	+	+	+	+	+	+	+
7	1 : 128	+	+	+	+	+	+	+	+
Staphylococcus aureus									
1	1 : 2	–	–	–	–	–	–	–	–
2	1 : 4	–	–	–	–	–	–	–	–
3	1 : 8	–	–	–	–	–	–	–	–
4	1 : 16	–	–	–	–	–	–	–	–
5	1 : 32	–	–	+	+	–	–	+	–
6	1 : 64	+	+	+	+	+	+	+	+
7	1 : 128	+	+	+	+	+	+	+	+

Окончание таблицы 2

Кратность разведения* Dilution ratio*		**Образцы**** Samples**							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Escherichia coli									
1	1 : 2	–	–	–	–	–	–	–	–
2	1 : 4	–	–	–	–	–	–	–	–
3	1 : 8	–	–	–	–	–	+	+	+
4	1 : 16	+	+	+	+	+	+	+	+
5	1 : 32	+	+	+	+	+	+	+	+
6	1 : 64	+	+	+	+	+	+	+	+
7	1 : 128	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus cereus									
1	1 : 2	–	–	–	–	–	–	–	–
2	1 : 4	–	–	–	–	–	–	–	–
3	1 : 8	–	–	–	–	–	–	–	–
4	1 : 16	+	–	+	+	–	+	–	–
5	1 : 32	+	+	+	+	+	+	+	–
6	1 : 64	+	+	+	+	+	+	+	+
7	1 : 128	+	+	+	+	+	+	+	+
Candida albicans									
1	1 : 2	–	–	–	–	–	–	–	–
2	1 : 4	–	–	–	–	–	–	–	–
3	1 : 8	–	–	–	–	–	+	–	–
4	1 : 16	–	–	–	–	–	+	+	–
5	1 : 32	+	–	+	+	+	+	+	+
6	1 : 64	+	+	+	+	+	+	+	+
7	1 : 128	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. * «+» – наличие роста микроорганизма; «–» – отсутствие роста микроорганизма.

** 1 – водно-спиртовое извлечение из листьев мяты перечной (г. Самара); 2 – водно-спиртовое извлечение из листьев мяты перечной (г. Ялта); 3 – водно-спиртовое извлечение из листьев мяты перечной (сорт Карамельная); 4 – водно-спиртовое извлечение из листьев мяты круглолистной (сорт Ананасная); 5 – водно-спиртовое извлечение из листьев мяты перечной (сорт Ментоловая); 6 – водно-спиртовое извлечение из листьев мяты перечной (сорт Шоколадная); 7 – спиртовой раствор лютеолина 0,06%-й; 8 – спиртовой раствор ментола 5%-й.

Note. * «+» – presence of microbial growth; «–» – absence of microbial growth.

** 1 – aqueous-alcoholic extract from peppermint leaves (Samara); 2 – aqueous-alcoholic extract from peppermint leaves (Yalta) (70 % ethyl alcohol); 3 – aqueous-alcoholic extract from peppermint leaves (variety Caramel); 4 – aqueous-alcoholic extraction from the leaves of peppermint round-leaved (variety Pineapple); 5 – aqueous-alcoholic extract from the leaves of peppermint (variety Menthol); 6 – aqueous-alcoholic extract from the leaves of peppermint (variety Chocolate); 7 – alcoholic solution of luteolin 0.06 %; 8 – alcoholic solution of menthol 5 %.

Растворы лютеолина, ментола проявили высокую противомикробную активность, но в случае раствора СО ментола при пятикратном разведении бактерицидное действие сохранялось, что может послужить основанием для предположения, что в образцах растительного сырья, где процент содержания ментола больше, противомикробная активность была более высокой, чем в других водно-спиртовых извлечениях.

Наличие розмариновой кислоты в исследуемых водно-спиртовых извлечениях из листьев видов и сортовых форм мяты определяли методом ВЭЖХ путем сравнения значений времени удерживания пиков веществ на хроматограмме испытуемого раствора и раствора стандартного образца розмариновой кислоты (степень чистоты не менее 96 %, Sigma-Aldrich, США) (рисунок 2).

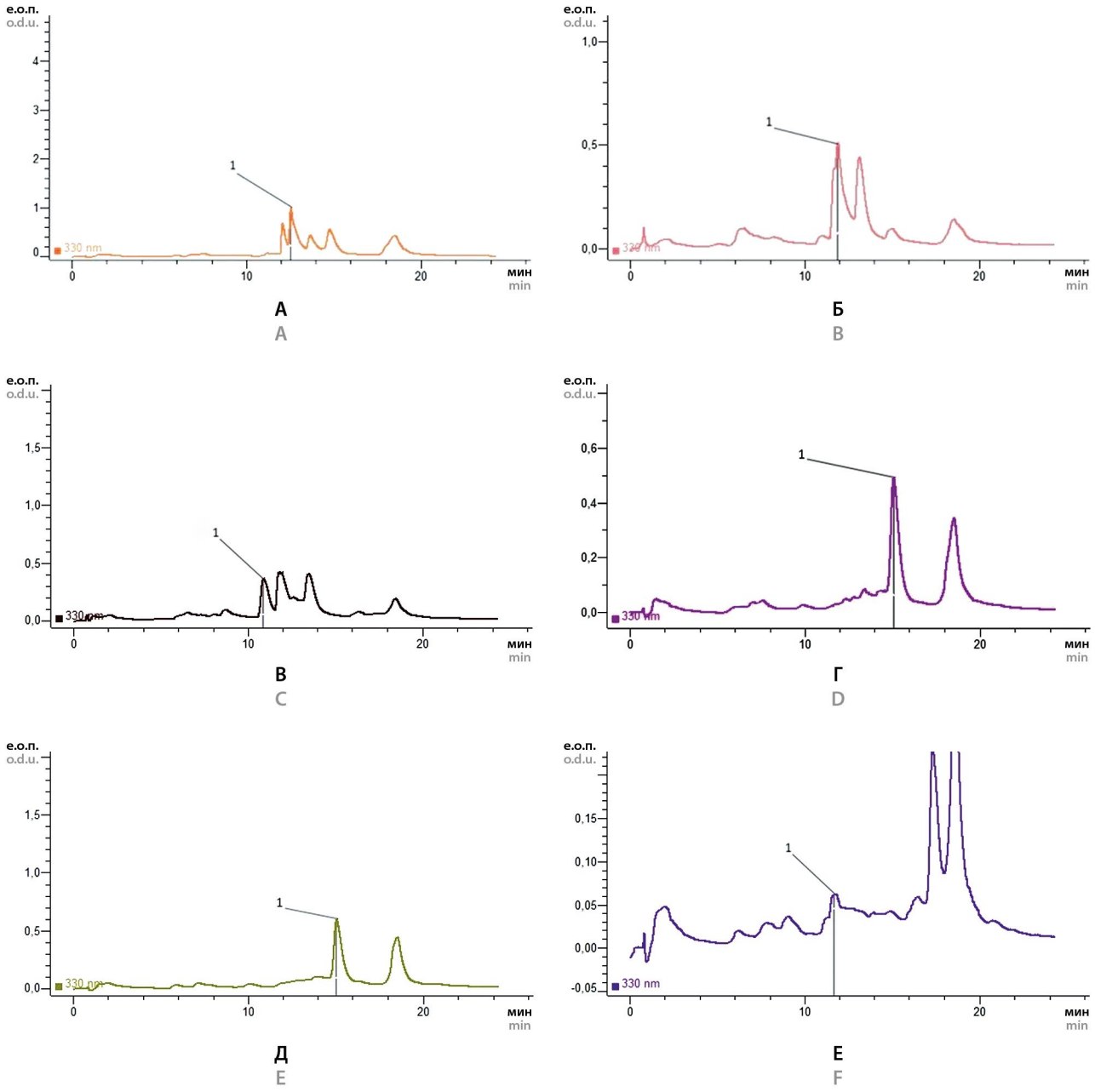


Рисунок 2. ВЭЖХ-профиль водно-спиртовых извлечений видов и сортовых форм рода *Mentha* L.

А – листьев мяты перечной (сорт Шоколадная); Б – листьев мяты круглолистной (сорт Ананасная); В – листьев мяты перечной (сорт Карамельная); Г – листьев мяты перечной (сорт Ментоловая); Д – листьев мяты перечной, собранной в Ботаническом саду Самарского университета; Е – листьев мяты перечной, собранной в Никитском ботаническом саду: 1 – розмариновая кислота в пробе

Figure 2. HPLC-profile of water-alcohol extracts of species and soft forms of the genus *Mentha* L.

A – leaves of peppermint leaves of Chocolate variety; B – leaves of *Mentha rotundifolia* (L.) Huds. cv. Ananasminze; C – leaves of peppermint cultivar Caramel; D – the leaves of peppermint cultivar Menthol; E – leaves of peppermint, collected in the Botanical garden of Samara University; F – leaves of peppermint, collected in Nikita Botanical Garden: 1 – rosmarinic acid in the sample

В качестве доминирующего компонента розмариновая кислота обнаружена в водно-спиртовых извлечениях из листьев мяты перечной, сорт Шоколадная (рисунок 2, А), мяты круглолистной, сорт Ананасная (рисунок 2, Б), мяты перечной, сорт Ментоловая (рисунок 2, Г) и мяты перечной, собранной в ботаническом саду Самарского университета (рисунок 2, Д), однако при этом четкой корреляции между уровнем

Таблица 3. Результаты тестирования препаратов контроля

Table 3. Results of testing of control preparations

Образцы / кратность разведения Samples / dilution factor		*Pseudomonas aeruginosa*		*Staphylococcus aureus*		*Escherichia coli*		*Bacillus cereus*		*Candida albicans*	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1 : 2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	1 : 4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	1 : 8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	1 : 16	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	1 : 32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	1 : 64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	1 : 128	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. * «+» – наличие роста микроорганизма; «–» – отсутствие роста микроорганизма.
** 1 – 70%-й спирт этиловый; 2 – 96%-й спирт этиловый.

Note. * «+» – presence of microbial growth; «–» – absence of microbial growth.
** 1 – 70 % ethyl alcohol; 2 – 96 % ethyl alcohol.

содержания данного компонента и противомикробной активностью исследуемых извлечений нами не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследуемые образцы растительного сырья рода мята (*Mentha* L.) обладают антимикробным действием. Полученные в ходе проведенного исследования данные позволяют сделать вывод о целесообразности создания новых антибактериальных препаратов на основе листьев мяты перечной, а также других видов и сортов мяты, которые показали выраженный противомикробный эффект в отношении тестовых культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркин В. А. Фармакогнозия. Самара: ООО «Полиграфическое объединение «Стандарт», ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России; 2020. 1278 с.
2. Куркина А. В. Флавоноиды фармакопейных растении. Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России; 2012. 260 с.
3. Барсегян М. А., Евсеева С. Б., Степанова Э. Ф. Разработка и технологические исследования ректальной противогеморроидальной мази с фитокомпозицией. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2010;22(93–12/2):129–132.
4. Гончарова Т. С., Лукашук С. П. Возможность использования лекарственного растительного сырья при лечении онкологических заболеваний. *Фармация и фармакология*. 2015;3(1(8)):11–13. DOI: 10.19163/2307-9266-2015-3-1(8)-11-13.
5. Махамматова С. Х. Химический состав мяты, ее значение в производстве лекарств и применение в народной медицине. *Экономика и социум*. 2023;4(1(107)):715–718.
6. Студеникин В. М., Турсунхужаева С. Ш., Шелковский В. И., Кузенкова Л. М. Седативные препараты растительного происхождения в детской неврологии. *Эффективная фармакотерапия*. 2013;3:28–30.
7. Любчик В. Н., Мирошниченко Н. В., Голубова Т. Ф. Классификация растений и их эфирных масел, применяемых в аэрофитотерапии, их лечебные эффекты. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2012;2(1–2(5–6)):94–97.
8. Судакова Н. В., Стаценко Е. Н. Применение эфирных масел в пищевой промышленности. *Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета*. 2012;3(32):129–131.
9. Белявская И. Г., Алексеенко Е. В., Капустина К. Ф., Исабаев И. Б. Разработка технологии хлебобулочных изделий с использованием мяты перечной. *Health, Food & Biotechnology*. 2019;1(4):53–69. DOI: 10.36107/hfb.2019.i4.s276.
10. Клецкина Е. В. Возможность применения лекарственных растений в технологии мармеладных изделий. *Образование и наука без границ: социально-гуманитарные науки*. 2016;3:328–332.
11. Капустина К. Ф. Разработка технологии безглютеновых хлебобулочных изделий с использованием пищевкусовой добавки из мяты перечной. *Молодой ученый*. 2020;24(314):99–105.
12. Шерякова А. А., ред. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Том 3. Контроль качества фармацевтических субстанций. УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». Минск: Минский государственный ПТК полиграфии им. В. Хоружей; 2009.
13. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. Алматы: Издательский дом «Жибек жолы»; 2008. 592 с.
14. Казакова, М. А., Куркин В. А., Мубинов А. Р. Исследование компонентного состава листьев мяты перечной методом ВЭЖХ. *Фармация*. 2023;72(8):33–38. DOI: 10.29296/25419218-2023-08-05.
15. Gudzenko A. Development and validation of a method for the determination of rosmarinic acid in *Mentha piperita* L. using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode

array detection. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2013;5(9):40–45.
16. Бадекова К. Ж., Левая Я. К., Атажанова Г. А., Жолдасбаев М. Е. Биологические свойства розмариновой кислоты. *Фармация Казахстана*. 2020;7-8:29–34.
17. Попов А. М., Кривошапко О. Н., Климович А. А., Артюков А. А. Биологическая активность и механизмы лечебного действия розмариновой кислоты, лютеолина и его сульфатированных производных. *Биомедицинская химия*. 2016;62(1):22–30. DOI: 10.18097/PBMC20166201022.
18. Государственная фармакопея Союза Советских Социалистических Республик. 10-е изд. Москва: Медицина; 1968. 1075 с.
19. Рябов Н. А., Рыжов В. М., Куркин В.мА. Методика количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого *Quercus robur* L. *Фармация и фармакология*. 2021;9(5):356–366. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-5-356-366.
20. Golus J., Sawicki R., Widelski J., Ginalska G. The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 2016;121(5):1291–1299. DOI: 10.1111/jam.13253.

REFERENCES

1. Kurkin V. A. Pharmacognosy. Samara: LLC "Poligraficheskoe obieedinenie "Standart", Samara State Medical University; 2020. 1278 p. (In Russ.)
2. Kurkina A. V. Flavonoids of pharmacopoeial plants. Samara: LLC "Ofort", Samara State Medical University; 2012. 260 p. (In Russ.)
3. Barsegyan M. A., Yevseyeva S. B., Stepanova E. Ph. The development and technological research of rectal Ointment with complex herbal extract. *Scientific bulletins of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*. 2010;22(93(12/2)):129–132. (In Russ.)
4. Goncharova T. S., Lukashuk P. S. Possibility of plants active parts usage for oncological diseases treatment. *Pharmacy & Pharmacology*. 2015;3(1(8)):11–13. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2015-3-1(8)-11-13.
5. Makhammatova S. Kh. Chemical composition of mint, its significance in the production of medicines and application in traditional medicine. *Economics and Society*. 2023;4(1(107)):715–718. (In Russ.)
6. Studenikin V. M., Tursunkhuzhaeva S. Sh., Shelkovsky V. I., Kuzenkova L. M. Sedatives of plant origin in pediatric neurology. *Effektivnaia farmakoterapiia*. 2013;3:28–30. (In Russ.)
7. Lyubchik V. N., Miroshnichenko N. V., Golubova T. F. Classification of plants and their essential oils used in aerophytotherapy, their medicinal effects. *Krymskii zhurnal eksperimentalnoi i klinicheskoi meditsiny*. 2012;2(1–2(5–6)):94–97. (In Russ.)
8. Sudakova N. V., Statsenko E. N. Application of essential oils in the food industry. *Newsletter of North-Caucasus Federal University*. 2012;3(32):129–131. (In Russ.)
9. Belyavskaya I. G., Alekseenko E. V., Kapustina K. F., Isabaev I. B. The Development of Bread Technology with Peppermint Products. *Health, Food & Biotechnology*. 2019;1(4):53–69. (In Russ.) DOI: 10.36107/hfb.2019.i4.s276.
10. Kletskina E. V. Possibility of using medicinal plants in the technology of marmalade products. *Obrazovanie i nauka bez granits sotsialno-gumanitarnye nauki*. 2016;3:328–332. (In Russ.)
11. Kapustina K. F. Development of technology for gluten-free bakery products using a food flavoring additive from peppermint. *Molodoi uchenyi*. 2020;24(314):99–105. (In Russ.)
12. Sheryakova A. A., editor. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus. Volume 3. Quality control of pharmaceutical substances. Unitary Enterprise "Center for Expertise and Testing in Healthcare". Minsk: Minskii gosudarstvennyi PTK poligrafii im V KHoruzhei; 2009. (In Russ.)
13. State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. T. 1. Almaty: Izdatelskii dom "Zhibek zholy"; 2008. 592 p. (In Russ.)
14. Kazakova M. A., Kurkin V. A., Mubinov A. R. Study of the component composition of peppermint leaves by HPLC method. *Pharmacy*. 2023;72(8):33–38. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2023-08-05.
15. Gudzenko A. Development and validation of a method for the determination of rosmarinic acid in *Mentha piperita* L. using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2013;5(9):40–45.
16. Badekova K. J., Levaya Y. K., Atazhanova G. A., Zholdasbaev M. E. Biological properties of rosmarinic acid. 2020;7-8:29–34. (In Russ.)
17. Popov A. M., Krivoshapko O. N., Klimovich A. A., Artyukov A. A. Biological activity and mechanisms of therapeutic action of rosmarinic acid, luteolin and its sulphated derivatives. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2016;62(1):22–30. (In Russ.) DOI: 10.18097/PBMC20166201022.
18. State Pharmacopoeia of the Union of Soviet Socialist Republics. 10th ed. Moscow: Medicine; 1968. 1075 p. (In Russ.)
19. Ryabov N. A., Ryzhov V. M., Kurkin V. A. Methods for quantitative determination of total flavonoids in *Quercus robur* L. buds. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(5):356–366. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-5-356-366.
20. Golus J., Sawicki R., Widelski J., Ginalska G. The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 2016;121(5):1291–1299. DOI: 10.1111/jam.13253.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.322; 543.545.2; 615.356

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1946

Check for updates

CC BY 4.0

Применение метода капиллярного электрофореза в анализе водорастворимых витаминов представителей рода *Rubus* L.

М. Б. Ильина✉, **Е. В. Сергунова**

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:** Ильина Маргарита Борисовна. **E-mail:** rita221096@yandex.ru

ORCID: М. Б. Ильина – https://orcid.org/0000-0003-1989-4545;
Е. В. Сергунова – https://orcid.org/0000-0002-7194-5525.

Статья поступила: 11.10.2024 **Статья принята в печать:** 20.02.2025 **Статья опубликована:** 21.02.2025

Резюме

Введение. Капиллярный электрофорез – метод разделения смеси веществ в поле высокого напряжения. Метод используется для анализа соединений органической и неорганической природы и имеет ряд преимуществ: невысокую стоимость, безопасность, простоту оборудования. Также метод набирает популярность в анализе химического состава растительного сырья.

Цель. Изучение витаминного состава растительного сырья представителей рода *Rubus* L. методом капиллярного электрофореза.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись высушенные листья и/или плоды таких растений, как *Rubus caesius* L. (ежевика сизая), *Rubus nessensis* Hall (ежевика несская), *Rubus allegheniensis* Porter (ежевика аллеганская), *Rubus ulmifolius* Scott (ежевика вязолистная), *Rubus saxatilis* L. (костяника), *Rubus idaeus* L. (малина обыкновенная), *Rubus chamaemorus* L. (морошка), *Rubus arcticus* L. (княженика). Обнаружение и количественное определение водорастворимых витаминов проводилось в системе капиллярного электрофореза Капель-104Т (ГК «Люмэкс», Россия). Анализ осуществлялся в варианте капиллярного электрофореза – мицеллярной электрокинетической хроматографии.

Результаты и обсуждение. В заданных условиях анализа удалось идентифицировать 5 витаминов группы В (никотинамид, рибофлавин, пиридоксин, никотиновая кислота, тиамин) и витамин С (аскорбиновая кислота). Содержание витаминов в различных видах сырья варьировалось. Отмечено, что рибофлавин, аскорбиновая и никотиновая кислоты присутствуют практически во всех изучаемых объектах. По количественному содержанию преобладающими витаминами в листьях являются никотинамид, аскорбиновая кислота и пиридоксин, в плодах – аскорбиновая кислота и тиамин. Суммарное содержание витаминов в листьях выше, чем в плодах, что объясняется разными условиями сушки.

Заключение. Методом капиллярного электрофореза удалось обнаружить и провести количественное определение водорастворимых витаминов в раститель=ном сырье на примере некоторых представителей рода *Rubus* L., некоторые из них – *R. caesius* L. и *R. saxatilis* L. – отмечены наибольшим количеством этих соединений.

Ключевые слова: *Rubus* L., ежевика, малина, морошка, костяника, княженика, листья, плоды, витамины, капиллярный электрофорез

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

Вклад авторов. М. Б. Ильина осуществляла заготовку сырья, проведение валидации методики и анализа витаминов в системе капиллярного электрофореза, подготовку текста статьи. Е. В. Сергунова приняла участие в обсуждении результатов, предоставила консультативную помощь в подготовке окончательной версии рукописи.

Для цитирования: Ильина М. Б., Сергунова Е. В. Применение метода капиллярного электрофореза в анализе водорастворимых витаминов представителей рода *Rubus* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):274–283. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1946

© Ильина М. Б., Сергунова Е. В., 2025
© Ilina M. B., Sergunova E. V., 2025

Application of the capillary electrophoresis method in the analysis of water-soluble vitamins of representatives of the genus *Rubus* L.

Margarita B. Ilina✉, **Ekaterina V. Sergunova**

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:** Margarita B. Ilina. **E-mail:** rita221096@yandex.ru

ORCID: Margarita B. Ilina – https://orcid.org/0000-0003-1989-4545;
Ekaterina V. Sergunova – https://orcid.org/0000-0002-7194-5525.

Received: 11.10.2024 **Accepted:** 20.02.2025 **Published:** 21.02.2025

Abstract

Introduction. Capillary electrophoresis is a method of separating a mixture of substances in a high voltage field. The method is used to analyze compounds of organic and inorganic nature and has a number of advantages: cheapness, safety, simplicity of equipment. The method is also gaining popularity in the analysis of the chemical composition of plant raw materials.

Aim. The study of the vitamin composition in plant raw materials of representatives of the genus *Rubus* L. by capillary electrophoresis.

Materials and methods. The objects of the study were the dried leaves and/or fruits of plants such as *Rubus caesius* L. (European dewberry), *Rubus nessensis* Hall (European blackberry), *Rubus allegheniensis* Porter (allegany blackberry), *Rubus ulmifolius* Scott (elmleaf blackberry), *Rubus saxatilis* L. (roebuck berry), *Rubus idaeus* L. (raspberry), *Rubus chamaemorus* L. (cloudberry), *Rubus arcticus* L. (arctic raspberry). Detection and quantitative determination of water-soluble vitamins was carried out in the capillary electrophoresis system Kapel-104T (Group of Companies "Lumex", Russia). The analysis was carried out in a variant of capillary electrophoresis – micellar electrokinetic chromatography.

Results and discussion. Under the specified analysis conditions, 5 B vitamins (nicotinamide, riboflavin, pyridoxine, nicotinic acid, thiamine) and vitamin C (ascorbic acid) were identified. The vitamin content in different types of raw materials varied. It is noted that riboflavin, ascorbic and nicotinic acids are present in almost all the studied objects. In terms of quantitative content, the predominant vitamins in the leaves are nicotinamide, ascorbic acid and pyridoxine, in fruits – ascorbic acid and thiamine. The total vitamin content in the leaves is higher than in the fruits, which is explained by different drying conditions.

Conclusion. By the method of capillary electrophoresis, it was possible to detect and quantify water-soluble vitamins in plant raw materials using the example of some representatives of the genus *Rubus* L. In general, the vitamin content in the studied raw materials is low, some of them are marked by the largest number of these compounds – *R. caesius* L. and *R. saxatilis* L.

Keywords: *Rubus* L., blackberry, raspberry, cloudberry, roebuck berry, arctic raspberry, leaves, fruits, vitamins, capillary electrophoresis

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

Contribution of the authors. Margarita B. Ilina carried out the procurement of raw materials, validation of the methodology and analysis of vitamins in the capillary electrophoresis system, preparation of the text of the article. Ekaterina V. Sergunova took part in the discussion of the results, provided advisory assistance in preparing the final version of the manuscript.

For citation: Ilina M. B., Sergunova E. V. Application of the capillary electrophoresis method in the analysis of water-soluble vitamins of representatives of the genus *Rubus* L. *Drug development & registration*. 2025;14(1):274–283. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1946

ВВЕДЕНИЕ

Одним из методов эффективного разделения сложных смесей соединений является капиллярный электрофорез. В основе метода лежат электрокинетические явления. В электрическом поле высокого напряжения происходит движение частиц и пассивное движение жидкости, в результате чего проба в капилляре разделяется на отдельные компоненты (рисунок 1).

Данный метод анализа во многом схож с высокоэффективной жидкостной хроматографией, однако в отличие от этого метода капиллярный электрофорез имеет ряд преимуществ [1]:

- высокую эффективность разделения;
- отсутствие необходимости использования дорогостоящих органических растворителей;
- отсутствие колонки;
- простую и недорогую аппаратуру;
- низкую себестоимость единичного анализа.

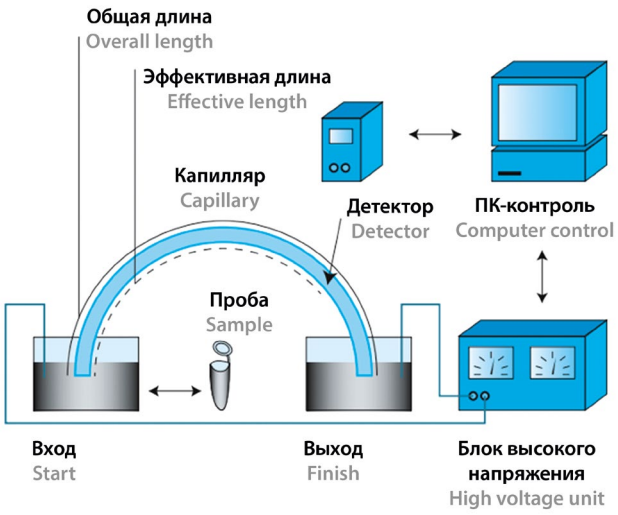


Рисунок 1. Устройство системы капиллярного электрофореза

Figure 1. The device of the capillary electrophoresis system

Существует два основных варианта капиллярного электрофореза: капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) и мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭХ). Первый вариант более пригоден для разделения ионогенных компонентов смеси, второй служит для разделения в том числе и нейтральных молекул.

В настоящее время метод капиллярного электрофореза применяется в анализе как неорганических, так и органических соединений при контроле качества воды, напитков, алкогольной продукции, продуктов питания, лекарственных препаратов, биологически активных добавок. Несмотря на широкое использование капиллярного электрофореза во многих областях знаний, в анализе лекарственного растительного сырья данный метод только набирает популярность. Имеется ряд отечественных работ, посвященных идентификации и количественному определению в сырье алкалоидных соединений [2, 3], аминокислот [4–7], органических кислот [8–9], углеводов [10–11], фенольных соединений [12]. Также метод капиллярного электрофореза для анализа биологически активных веществ (БАВ) в растительном сырье применяют зарубежные исследователи [13–15].

Интересным для изучения родом растительного царства, объединяющим многие хорошо известные виды, является род *Rubus* L. семейства розоцветных (*Rosaceae*). Среди представителей данного таксона – малина, ежевика, морошка и др. Обобщенная схема систематического положения рода представлена на рисунке 2.

Род *Rubus* L. включает 1803 подтвержденных вида согласно системе APG IV [16].

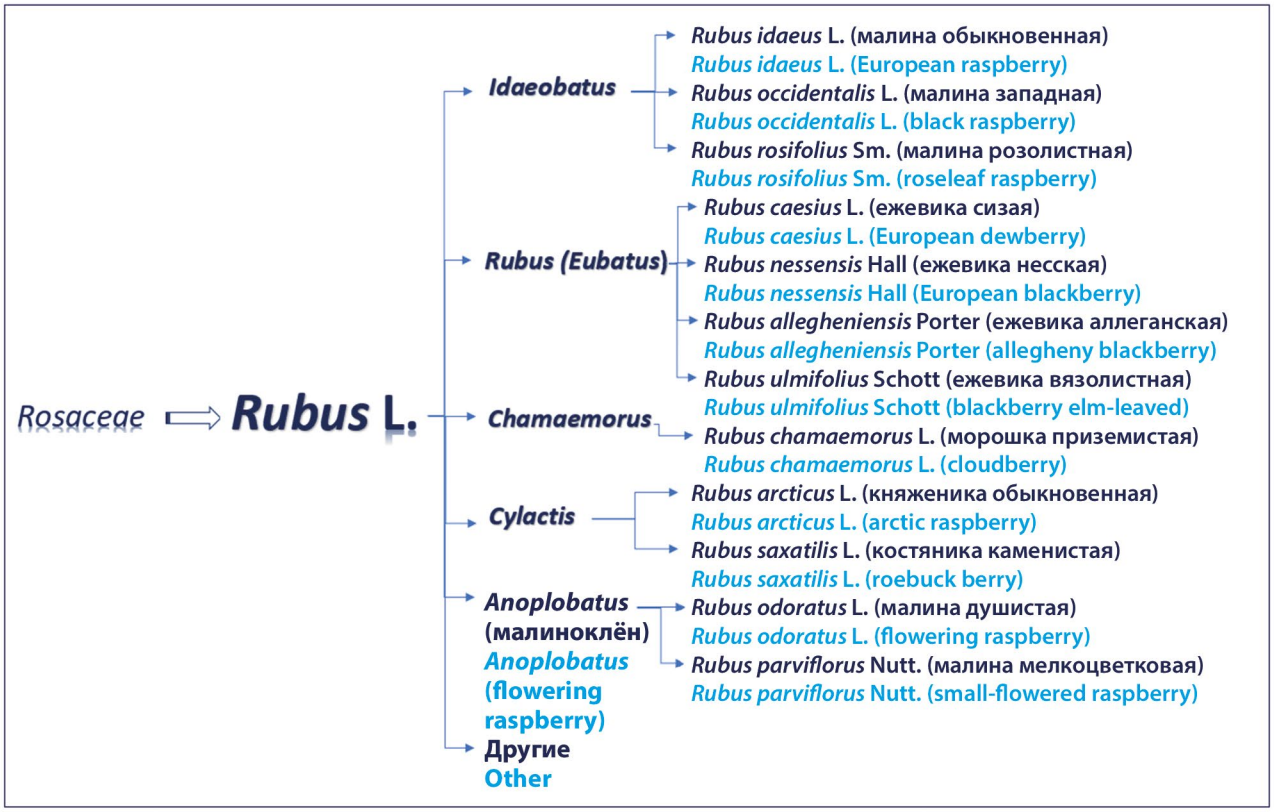


Рисунок 2. Некоторые представители различных подродов рода *Rubus* L.

Figure 2. Some representatives of various subgenera of the genus *Rubus* L.

Основная область применения плодов или, реже, листьев растений рода *Rubus* L. – пищевая промышленность. Плоды малины, ежевики служат для изготовления сиропов, варенья, джемов, конфетных изделий. В последние годы, однако, представители *Rubus* L. становятся предметом внимания ученых относительно химического состава и фармакологической активности. Так, при исследовании листьев и плодов малины обыкновенной установлено, что они обладают антиоксидантной, противоопухолевой активностью [17–20]. Имеется ряд исследований, в которых доказана антиоксидантная активность плодов [21] и листьев [22–24] ежевики. Также изучен состав листьев [25] и плодов [26] морошки. В гораздо меньшей степени изучены такие виды, как *R. saxatilis* L. и *R. arcticus* L.

Целью настоящего исследования являлся анализ витаминного профиля растительного сырья представителей рода *Rubus* L. методом капиллярного электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили листья и плоды *Rubus caesius* L. (ежевики сизой), листья *Rubus nessensis* Hall (ежевики несской), листья и плоды *Rubus allegheniensis* Porter (ежевики аллеганской), листья *Rubus ulmifolius* Scott (ежевики вязолистной), листья *Rubus saxatilis* L. (костяники каменистой), листья и плоды *Rubus idaeus* L. (малины обыкновенной), плоды *Rubus chamaemorus* L. (морошки), листья и плоды *Rubus arcticus* L. (княженики). Листья подвергались воздушно-теневой сушке, плоды – искусственной сушке при температуре 60–80 °C.

Заготовка образцов производилась в период 2021–2024 гг., в фазу наиболее полного развития растения и накопления биологически активных соединений в нем (фаза цветения – для листьев, фаза плодоношения – для плодов). Сбор осуществлялся на территории Москвы: в природно-историческом парке «Кузьминки-Люблино» (*R. idaeus*), поселении Роговское (*R. allegheniensis*); Московской области (г. Химки) (*R. caesius, R. nessensis, R. ulmifolius*); Тверской области (*R. saxatilis*); Республики Карелия (*R. chamaemorus*); Архангельской области (*R. arcticus*).

Влажность образцов после сушки составляла 5–13 %.

Анализ водорастворимых витаминов проводился в системе капиллярного электрофореза Капель-104Т (ГК «Люмэкс», Россия) в следующих условиях:

- Капилляр: 60/50 см – $L_{эфф.}$, 75 мкм – диаметр.
- Ведущий электролит: боратный буфер + додецилсульфат натрия 8 мМ.
- Температура анализа – 40 °C время анализа – 20 мин.
- Ввод пробы – 30 мбар.
- Напряжение – 25 Кв, давление – 0 мбар.

Экстракция проводилась на ультразвуковой бане ODA-LD30 (Китай) с диапазоном температуры нагрева 0–80 °C, частотой ультразвука 40 кГц, мощностью 270 Вт.

В работе также использовалась центрифуга Liston C 2201 (Россия).

Анализ водорастворимых витаминов проводился по модифицированной методике ГОСТ 31483-2012 «Премиксы. Определение содержания витаминов: B_1 (тиаминхлорида), B_2 (рибофлавина), B_3 (пантотеновой кислоты), B_5 (никотиновой кислоты и никотинамида), B_6 (пиридоксина), B_c (фолиевой кислоты), C (аскорбиновой кислоты) методом капиллярного электрофореза».

В ходе исследования были использованы реактивы: кислота соляная (ос.ч., ООО «СигмаТек», Россия), кислота щавелевая (ч.д.а, ООО «База химической продукции «Югреактив», Россия), натрия гидроксид (ч.д.а., ООО «Компонент-Реактив», Россия) борная кислота (х.ч., ГОСТ 9656-75, «Мосхимлаб», Россия), натрий тетраборнокислый 10-водный, стандарт-титр (ООО «РЕАХИМПРИБОР», Россия), натрия лаурилсульфат, 95 % (ч.д.а., Scharlab, Испания), а также стандартные образцы ООО «ХромЛаб» (Россия): витамин С (аскорбиновая кислота), не менее 99 %, витамин РР (никотинамид), не менее 99 %, витамин РР (никотиновая кислота), не менее 99 %, витамин B_1 (тиамина гидрохлорид), не менее 99 %, витамин B_2 (рибофлавин), не менее 99 %, витамин B_6 пиридоксина гидрохлорид), не менее 99 %.

Методика: 1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц 0,4 мм, помещают в колбу объемом 50 мл, добавляют 25 мл воды очищенной и помещают на ультразвуковую баню. Экстрагируют в течение 30 мин, периодически перемешивая. Извлечение фильтруют в мерную колбу объемом 25 мл, доводя объем водой очищенной до метки. Часть извлечения переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин. Полученный раствор над осадком отделяют (раствор А).

К 0,5 мл раствора А прибавляют 1,065 мл тетрабората натрия 0,01 М, 0,24 мл кислоты щавелевой 1%-й, 0,06 мл кислоты хлористоводородной 1%-й. Полученную смесь тщательно перемешивают, 0,5 мл помещают в чистую пробирку типа Эппендорфа.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы Microsoft Office Excel 2016 (США). Данные в таблицах представлены в виде «среднее значение ± стандартное отклонение».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях предложенной методики удалось идентифицировать ряд водорастворимых витаминов: никотинамид (витамин B_3-амид), рибофлавин (витамин B_2), пиридоксин (витамин B_6), аскорбиновую кислоту (витамин С), никотиновую кислоту (витамин B_3-кислота), тиамин (витамин B_1). Электрофореграмма стандартных образцов представлена на рисунке 3. Поскольку никотинамид является нейтральной молекулой, то он мигрирует в зоне нейтральных компонентов вместе с электроосмотической подвижностью (ЭОП). Разделение подобных со-

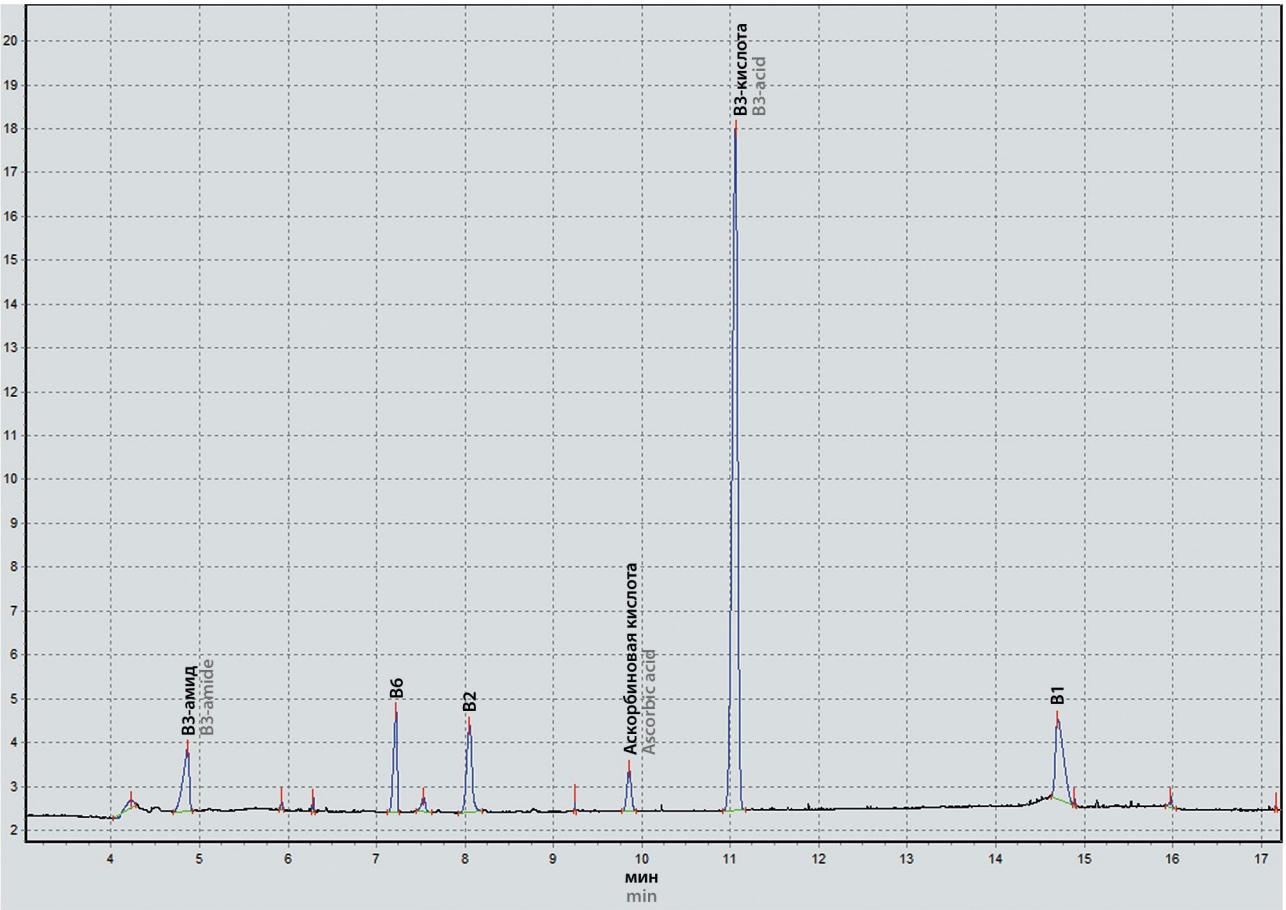


Рисунок 3. Электрофореграмма стандартных образцов водорастворимых витаминов, полученная методом мицеллярной электрокинетической хроматографии

Figure 3. Electrophoregram of reference standards of water-soluble vitamins obtained by micellar electrokinetic chromatography

единений становится возможным при введении в состав ведущего электролита поверхностно-активных веществ (ПАВ), которым в нашем случае являлся додецилсульфат натрия. Таким образом, полное разделение витаминов осуществляется в условиях варианта капиллярного электрофореза – МЭХ.

Предложенная методика количественного определения водорастворимых витаминов была валидирована по характеристикам «линейность», «внутрилабораторная прецизионность», «повторяемость», «правильность». Валидация методики проводилась на примере сырья ежевики сизой. Для изучения линейности методики были взяты аликвоты извлечения в объемах, соответствующих следующим концентрациям аскорбиновой кислоты в растворе: 0,11; 0,2; 0,56; 0,63 мг/г сырья. Была построена зависимость площади пика от концентрации аскорбиновой кислоты, представленная на рисунке 4.

Для анализа повторяемости методики проводилось определение содержания витаминов в сырье в 6 повторах в течение одного дня одним аналитиком. Рассчитывалось значение относительного стандартного отклонения (RSD, %) времени миграции компонентов витаминного состава и их содержания (таблица 1).

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики проводилась в течение двух дней двумя химиками-аналитиками на одном и том же оборудовании. Определялось значение RSD суммы витаминов B_2, B_1, аскорбиновой и никотиновой кислот в трех повторах. Результаты испытания представлены в таблице 2.

Для определения правильности методики к извлечению из листьев ежевики сизой с заведомо известным содержанием витамина С добавляли стандартный образец аскорбиновой кислоты в определенном количестве. Полученные результаты показали, что значение относительного стандартного отклонения открываемости составило 90,9 % (таблица 3).

В результате изучения витаминного состава исследованы 12 образцов сырья растений рода *Rubus* L. Полученное количественное содержание витаминов в 1 мг на 1 кг сырья представлено в таблице 4.

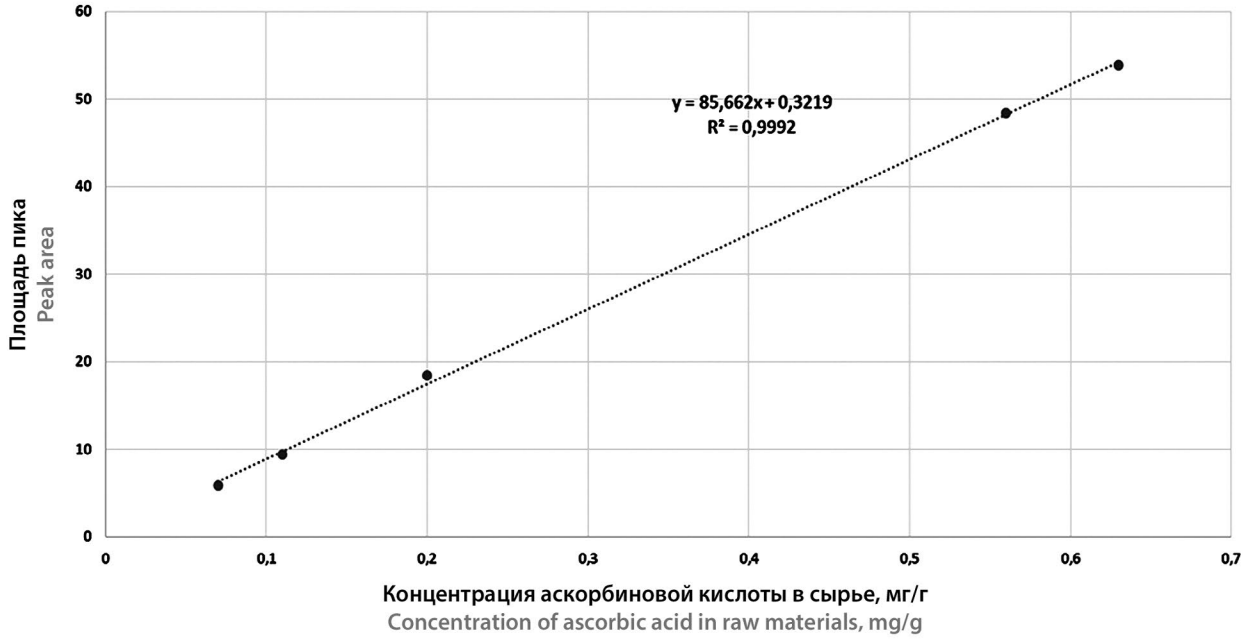


Рисунок 4. Линейность методики количественного определения водорастворимых витаминов в листьях ежевики сизой

Figure 4. The linearity of the methodology for the quantitative determination of water-soluble vitamins in *Rubus caesius* leaves

Таблица 1. Анализ повторяемости методики (P = 95%, $t(P; f)$ = 2,57)

Table 1. Method replication analysis (P = 95 %, $t(P; f)$ = 2.57)

Повтор Replication	B_6		B_2		Аскорбиновая кислота Ascorbic acid		Никотиновая кислота Nicotinic acid		B_1	
	t, мин *t*, min	*X*, мг/г *X*, mg/g	*t*, мин *t*, min	*X*, мг/г *X*, mg/g	*t*, мин *t*, min	*X*, мг/г *X*, mg/g	*t*, мин *t*, min	*X*, мг/г *X*, mg/g	*t*, мин *t*, min	*X*, мг/г *X*, mg/g
1	6,98	0,038	8,157	0,052	9,84	0,158	12,512	0,065	15,91	0,037
2	7,1	0,037	8,23	0,051	10,105	0,154	12,763	0,070	16,738	0,039
3	6,785	0,041	8,292	0,055	10,012	0,165	10,992	0,067	15,002	0,038
4	6,627	0,038	8,138	0,051	9,373	0,148	11,115	0,066	15,663	0,04
5	6,687	0,036	8,095	0,048	9,233	0,156	11,212	0,067	16,102	0,036
6	6,834	0,040	7,935	0,055	9,597	0,162	11,920	0,063	16,407	0,04
Среднее, мг/г Average, mg/g	6,835	0,038	8,141	0,055	9,690	0,157	11,752	0,066	15,97	0,038
RSD, %	2,38	4,43	1,38	4,45	3,31	3,49	5,92	3,22	3,46	3,89

Таблица 2. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности методики (n = 3, f = 2, P = 95 %, $T(f, P)$ = 4,3020)

Table 2. The results of determining the intra-laboratory precision of the method (n = 3, f = 2, P = 95 %, $T(f, P)$ = 4.3020)

	День 1 Day 1	День 2 Day 2
Аналитик 1 Analytical chemist 1	RSD = 0,93 %	RSD = 1,06 %
Аналитик 2 Analytical chemist 2	RSD = 2,38 %	RSD = 3,30 %

При анализе полученных результатов отчетливо видно, что содержание витаминов в листьях суммарно выше, чем в плодах, что можно объяснить разностью в условиях сушки сырья и термолабильностью витаминов, а также таким фактором, как разные условия и места произрастания производящих растений.

В целом в листьях практически всех изучаемых объектов найдены такие соединения, как рибофлавин, аскорбиновая и никотиновая кислоты, однако для многих видов их содержание невелико. Количественно преобладают витамин B_3 (никотинамид), ви-

тамин B_6 и аскорбиновая кислота. Наиболее богатыми витаминами были листья видов *R. caesius* L., *R. saxatilis* L., *R. nessensis* Hall.

Таблица 3. Открываемость методики

Table 3. Recovery of the method

Содержание аскорбиновой кислоты в сырье, мг/г The content of ascorbic acid in the raw material, mg/g	Добавлен СО аскорбиновой кислоты, мг Added a RS of ascorbic acid, mg	Получено теоретически, мг/г Theoretically obtained, mg/g	Получено практически, мг/г Practically obtained, mg/g	Открываемость, % Recovery, %
0,040	0,136	0,176	0,15	85,2
	0,190	0,230	0,21	91,3
	0,272	0,312	0,3	96,1
Среднее значение открываемости, % Average recovery, %				90,9
RSD, %				4,91

В плодах всех видов рода *Rubus* L. обнаружены витамин С и витамин B_1, содержание которых заметно преобладает у плодов *R. caesius* L. Все 6 изучаемых витаминов в небольшом количестве были обнаружены в плодах *R. allegheniensis* Porter.

Обобщая все результаты работы, можно заключить, что содержание витаминов в сырье представителей рода *Rubus* L. невелико. Наиболее ценными в плане суммарного содержания водорастворимых витаминов являются ежевика сизая (*R. caesius* L.) и костяника каменистая (*R. saxatilis* L). Таким образом, для удовлетворения суточной потребности человека в водорастворимых витаминах (100 мг/сутки для аскорбиновой кислоты, 1,5 мг/сутки для витамина B_1, 1,8 мг/сутки для витамина B_2, 2,0 мг/сутки для витамина B_6, 20 мг/сутки для витамина B_3 согласно методическим рекомендациям МР 2.3.1.0253-21 «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации») рекомендуется потреблять водные извлечения на основе сырья из данных двух видов рода *Rubus* L.

Содержание водорастворимых витаминов, определяемое иными методами анализа, в некоторых ранее проводимых исследованиях отличалось. Так, авторами данной статьи проводилось изучение витаминов в листьях *Rubus caesius* методом ВЭЖХ-анализа [27], где содержание некоторых из них оказалось ниже, чем в настоящей работе. Например, согласно упомянутому источнику содержание витамина B_1 – 1,1 мг/кг (в настоящей статье – 60,0 мг/кг), а содержание витамина B_2 – 0,53 мг/кг (в настоящей статье – 80,0 мг/кг). Для сырья *Rubus chamaemorus* и *Rubus idaeus* содержание определенных витаминов (аскорбиновая кислота), согласно имеющимся источникам, зачастую значительно выше, чем было обнаружено в нашем исследовании [28–30]. Так, согласно исследованию Я. Л. Страх и О. С. Игнатовец плоды морошки приземистой *Rubus chamaemorus* содержат 2200–2300 мг/кг витамина С, тогда как нами найдено 23,4 мг/кг. В обзорном исследовании Е. В. Жбановой обнаружено, что содержание аскорбиновой кислоты в плодах малины варьируется в диапазоне 50,0–400,0 мг/кг (в нашей работе – 3,9 мг/кг).

Таблица 4. Содержание водорастворимых витаминов в сырье представителей рода *Rubus* L., мг/кг

Table 4. The content of water-soluble vitamins in the raw materials of representatives of the genus *Rubus* L., mg/kg

Образцов сырья растений рода *Rubus* L. Samples of raw materials from plants of the genus *Rubus* L.	B_3-амид B_3-amid	B_6	B_2	C	B_3-кислота B_3-acid	B_1
Листья Leaves						
R. caesius L.	–	170,0 ± 40,0	80,0 ± 21,0	110,2 ± 40,3	70,0 ± 30,4	60,0 ± 8,1
R. idaeus L.	–	–	10,1 ± 1,2	13,3 ± 3,1	4,2 ± 1,1	1,9 ± 0,5
R. nessensis Hall	–	–	30,1 ± 1,8	70,0 ± 5,0	3,0 ± 0,9	20,2 ± 5,2
R. ulmifolius Scott	–	–	2,7 ± 0,3	8,0 ± 1,5	10,3 ± 1,0	–
R. saxatilis L.	600,0 ± 20,3	–	5,2 ± 1,8	44,2 ± 2,5	14,2 ± 2,0	–
R. allegheniensis Porter	4,9 ± 0,3	–	39,9 ± 0,3	4,4 ± 0,4	6,0 ± 0,1	–
R. arcticus L.	–	0,7 ± 0,3	–	5,3 ± 0,3	5,2 ± 0,2	0,50 ± 0,02
Плоды Fruits						
R. idaeus L.	1,41 ± 0,02	–	4,5 ± 0,3	3,90 ± 0,07	–	5,2 ± 0,2
R. allegheniensis Porter	1,1 ± 0,1	5,2 ± 0,2	0,7 ± 0,02	0,8 ± 0,3	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,09
R. caesius L.	–	50,3 ± 3,8	59,0 ± 7,4	139,2 ± 4,2	–	280,3 ± 30,2
R. chamaemorus L.	5,3 ± 0,1	4,9 ± 0,3	–	23,4 ± 0,4	4,2 ± 0,1	2,5 ± 0,2
R. arcticus L.	0,30 ± 0,06	–	2,8 ± 0,2	2,80 ± 0,03	0,80 ± 0,05	6,1 ± 0,1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе был изучен состав витаминов в растительном сырье разных видов одного рода *Rubus* L. с применением современного и перспективного метода – капиллярного электрофореза. В условиях метода в листьях и плодах представителей изучаемого рода удалось идентифицировать 6 водорастворимых витаминов: никотинамид, пиридоксин, рибофлавин, аскорбиновую кислоту, никотиновую кислоту, тиамин. Содержание указанных соединений различается среди видов, а также в разных морфологических группах сырья. Преобладающими витаминами в листьях являются B_3, С и B_6, в плодах – С и B_1. В общем итоге во всех 12 объектах исследования самыми часто встречающимися витаминами (в том числе в небольшом количестве) являлись B_2, С и B_3 (никотиновая кислота).

ЛИТЕРАТУРА

1. Комарова Н. В. Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: ООО «Веда»; 2006. 212 с.
2. Виноградова А. К., Офицеров Е. Н. Определение никотина в растительном сырье при помощи капиллярного электрофореза. *Успехи в химии и химической технологии*. 2020;34(7):56–57.
3. Абдуллаева М. У., Халилова Н. Ш., Олимов Н. К., Сидаметова З. Э. Хамидуллаев Ш. А. Исследование наркотических средств на основе мака опийного методом капиллярного электрофореза. *Journal of Modern Educational Achievements*. 2024;6(6):34–41.
4. Хочава М. Р., Онбыш Т. Е. Изучение аминокислотного состава леспедецы двуцветной, произрастающей в Краснодарском крае. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2023;25(8):34–40. DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2023-25-8.
5. Хантургаева В. А., Хамаганова И. В. Анализ и исследование состава белково-витаминного продукта из растительного сырья. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 2022;84(1):49–57. DOI: 10.20914/2310-1202-2022-1-49-57.
6. Аджиахметова С. Л., Червонная Н. М., Поздняков Д. И., Оганесян Э. Т. Изучение суммарного содержания антиоксидантов, полисахаридов, элементного состава и аминокислот растительного сырья смородины черной. *Химия растительного сырья*. 2021;3:265–274. DOI: 10.14258/jcprm.2021037774.
7. Соломенцева А. С., Солонкин А. В., Беляев А. И. Оценка аминокислотного и биохимического состава плодов видов *Rosa* L. И *Ribes aureum* Pursh. в засушливой зоне. *Химия растительного сырья*. 2023;2:123–132. DOI: 10.14258/jcprm.20230212036.
8. Тринеева О. В., Рудая М. А. Комплексное исследование профиля свободных органических кислот плодов облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) различных сортов. *Химия растительного сырья*. 2021;4:231–240. DOI: 10.14258/jcprm.2021049215.
9. Чистякова А. С., Гудкова А. А., Сливкин А. И., Чупандина Е. Е. Изучение профиля органических кислот видов рода горец (*Persicaria* Mill.). *Фармация и фармакология*. 2022;10(1):44–54. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-44-54.
10. Тринеева О. В., Сливкин А. И. Изучение углеводного комплекса плодов облепихи крушиновидной различными методами. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2020;2:91–98.
11. Тринеева О. В. Сравнительная характеристика определения сахаров различными методами в листьях крапивы двудомной. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):91–97. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-91-97.
12. Никифорова Е. Б., Шевченко А. И., Хочава М. Р., Доркина Е. Г. Изучение химического состава и антиоксидантной активности сухого экстракта травы посконника конопляного. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2023;25(1):18–23. DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2023-25-1.
13. Przybylska A., Gackowski M., Koba M. Application of capillary electrophoresis to the analysis of bioactive compounds in herbal raw materials. *Molecules*. 2021;26(8):2135. DOI: 10.3390/molecules26082135.
14. Gackowski M., Przybylska A., Kruszewski S., Koba M., Mądra-Gackowska K., Bogacz A. Recent applications of capillary electrophoresis in the determination of active compounds in medicinal plants and pharmaceutical formulations. *Molecules*. 2021;26(14):4141. DOI: 10.3390/molecules26144141.
15. Li Z., Wu Q., Zhang X., Chen G. Advances in the Applications of Capillary Electrophoresis to Tobacco Analysis. *Current Analytical Chemistry*. 2023;19(1):77–99. DOI: 10.2174/1573411018666220927094137.
16. Chase M. W., Christenhusz M. J. M., Fay M. F., Byng J. W., Judd W. S., Soltis D. E., Mabberley D. J., Sennikov A. N., Soltis P. S., Stevens P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016;181(1):1–20. DOI: 10.1111/boj.12385.
17. De Santis D., Carbone K., Garzoli S., Laghezza Masci V., Turchetti G. Bioactivity and chemical profile of *Rubus idaeus* L. leaves steam-distillation extract. *Foods*. 2022;11(10):1455. DOI: 10.3390/foods11101455.
18. Lopez-Corona A. V., Valencia-Espinosa I., González-Sánchez F. A., Sánchez-López A. L., Garcia-Amezquita L. E., Garcia-Varela R. Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of phenolic compound family extracted from raspberries (Rubus idaeus): A general review. *Antioxidants*. 2022;11(6):1192. DOI: 10.3390/antiox11061192.
19. Ispiryan A., Atkociuniene V., Makstutiene N., Sarkinas A., Salaseviciene A., Urbonaviciene D., Viskelis J., Pakeltiene R., Raudone L. Correlation between Antimicrobial Activity Values and Total Phenolic Content/Antioxidant Activity in *Rubus idaeus* L. *Plants*. 2024;13(4):504. DOI: 10.3390/plants13040504.
20. Garjonyte R., Budiene J., Labanauskas L., Judzentiene A. In vitro antioxidant and prooxidant activities of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) stem extracts. *Molecules*. 2022;27(13):4073. DOI: 10.3390/molecules27134073.
21. Chaves V. C., Soares M. S. P., Spohr L., Teixeira F., Vieira A., Constantino L. S., Dal Pizzol F., Lencina C. L., Spanevello R. M., Freitas M. P., Simões C. M. O., Reginatto F. H., Stefanello F. M. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. *Neuroscience Letters*. 2020;714:134566. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134566.

22. Paczkowska-Walendowska M., Gościniak A., Szymanowska D., Szwajgier D., Baranowska-Wójcik E., Szulc P., Dreczka D., Simon M., Cielecka-Piontek J. Blackberry Leaves as New Functional Food? Screening Antioxidant, Anti-Inflammatory and Microbiological Activities in Correlation with Phytochemical Analysis. *Antioxidants*. 2021;10(12):1945. DOI: 10.3390/antiox10121945.
23. Veličković I., Grujić S., Džamić A., Krivošej Z., Marin P. D. In vitro antioxidant activity of dewberry (Rubus caesius L. var. aquáticus Weihe. & Nees.) leaf extracts. *Archives of Biological Sciences*. 2015;67(4):1323–1330. DOI: 10.2298/ABS150414109V.
24. Hering A., Stefanowicz-Hajduk J., Hałasa R., Olech M., Nowak R., Kosiński P., Ochocka J. R. Polyphenolic Characterization, Antioxidant, Antihyaluronidase and Antimicrobial Activity of Young Leaves and Stem Extracts from Rubus caesius L. *Molecules*. 2022;27(19):6181. DOI: 10.3390/molecules27196181.
25. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Serebryakov E. B., Smirnov S. N., Proksh P., Ionov N. S., Poroikov V. V., Luzhanin V. G. Phytochemical analysis of polyphenol secondary metabolites in cloudberry (Rubus Chamaemorus L.) leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55:253–258. DOI: 10.1007/s11094-021-02407-y.
26. Faleva A. V., Ul'yanovskii N. V., Onuchina A. A., Falev D. I., Kosyakov D. S. Comprehensive characterization of secondary metabolites in fruits and leaves of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Metabolites*. 2023;13(5):598. DOI: 10.3390/metabo13050598.
27. Ильина М. Б., Сергунова Е. В. Состав и содержание некоторых витаминов в листьях ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) и водных извлечениях на их основе. *Фармация*. 2024;(3):33–37. DOI: 10.29296/25419218-2024-03-05.
28. Страх Я. Л., Игнатовец О. С. Химический состав и биологическая активность метаболитов *Rubus chamaemorus* L. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2022;67(3):321–331. DOI: 10.29235/1029-8940-2022-67-3-321-331.
29. Матистов Н. В., Валуйских О. Е., Ширшова Т. И. Химический состав и содержание микронутриентов в плодах морошки (*Rubus chamaemorus* L.) на европейском Северо-Востоке России. *Известия Коми научного центра УРО РАН*. 2012;1(9):41–45.
30. Жбанова Е. В. Плоды малины *Rubus idaeus* L. как источник функциональных ингредиентов. *Техника и технология пищевых производств*. 2018;48(1):5–14. DOI: 10.21603/2074-9414-2018-1-5-14.

REFERENCES

1. Komarova N. V., Kamentsev Ya. S. Practical guide to the use of capillary electrophoresis systems "Kapel". St. Petersburg: LLC "Veda"; 2008. 212 p. (In Russ.)
2. Vinogradova A. K., Ofitcerov E. N. Determination of nicotine in natural raw materials by electrophoresis. *Uspehi v himii i himicheskoj tehnologii*. 2020;34(7):56–57. (In Russ.)
3. Abdullayeva M. U., Khalilova N. Sh., Olimov N. K., Sidametova Z. E. Khamidullaev Sh. A. Investigation of narcotic drugs based on opium poppy by capillary electrophoresis. *Journal of Modern Educational Achievements*. 2024;6(6):34–41. (In Russ.)
4. Hochava M. R., Onbysh T. E. Study of the amino acid composition of bi-color lespedesia growing in the Krasnodar region. *Medical & Pharmaceutical Journal "Pulse"*. 2023;25(8):34–40. (In Russ.) DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2023-25-8.
5. Khanturgaeva V. A., Hamaganova I. V. The analysis and research of the composition a protein-vitamins product from plant materials. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2022;84(1):49–57. (In Russ.) DOI: 10.20914/2310-1202-2022-1-49-57.
6. Hadjiakhmetova S. L., Chervonnaya N. M., Pozdnyakov D. I., Oganesyan E. T. Study of the total content of antioxidants, polysaccharides, elemental composition and amino acids of vegetable raw materials of *Ribes nigrum* L. *Chemistry of plant raw material*. 2021;3:265–274. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021037774.
7. Solomentseva A. S., Solonkin A. V., Belyaev A. I. Evaluation of the amino acid and biochemical composition of fruits of *Rosa* L. and *Ribes aureum* Pursh. species in arid zone. *Chemistry of plant raw material*. 2023;2:123–132. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.20230212036.
8. Trineeva O. V., Rudaya M. A. Comprehensive study of the profile of free organic acids in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) of various varieties. *Chemistry of plant raw material*. 2021;4:231–240. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021049215.
9. Chistyakova A. S., Gudkova A. A., Slivkin A. I., Chupandina E. E. Study of organic acids profile of genus *Persicaria* Mill. species. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(1):44–54. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-44-54.
10. Trineeva O. V., Slivkin A. I. Study of the carbohydrate complex of fruits of sea buckthorn of various methods. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020;2:91–98. (In Russ.)
11. Trineeva O. V. Comparative Characteristics of Sugar Determination by Different Methods in Leaves of Nettle. *Drug development & registration*. 2020;9(2):91–97. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-91-97.
12. Nikiforova E. B., Shevchenko A. I., Hochava M. R., Dorkina E. G. Study of the chemical composition and antioxidant activity of the dry extract of of the Eupatorium cannabinum herb. *Medical & Pharmaceutical Journal "Pulse"*. 2023;25(1):18–23. (In Russ.) DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2023-25-1.
13. Przybylska A., Gackowski M., Koba M. Application of capillary electrophoresis to the analysis of bioactive compounds in herbal raw materials. *Molecules*. 2021;26(8):2135. DOI: 10.3390/molecules26082135.
14. Gackowski M., Przybylska A., Kruszewski S., Koba M., Mądra-Gackowska K., Bogacz A. Recent applications of capillary electrophoresis in the determination of active compounds in medicinal plants and pharmaceutical formulations. *Molecules*. 2021;26(14):4141. DOI: 10.3390/molecules26144141.
15. Li Z., Wu Q., Zhang X., Chen G. Advances in the Applications of Capillary Electrophoresis to Tobacco Analysis. *Current Analytical Chemistry*. 2023;19(1):77–99. DOI: 10.2174/1573411018666220927094137.
16. Chase M. W., Christenhusz M. J. M., Fay M. F., Byng J. W., Judd W. S., Soltis D. E., Mabberley D. J., Sennikov A. N., Soltis P. S., Stevens P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016;181(1):1–20. DOI: 10.1111/boj.12385.
17. De Santis D., Carbone K., Garzoli S., Laghezza Masci V., Turchetti G. Bioactivity and chemical profile of *Rubus idaeus* L. leaves steam-distillation extract. *Foods*. 2022;11(10):1455. DOI: 10.3390/foods11101455.

18. Lopez-Corona A. V., Valencia-Espinosa I., González-Sánchez F. A., Sánchez-López A. L., Garcia-Amezquita L. E., Garcia-Varela R. Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of phenolic compound family extracted from raspberries (Rubus idaeus): A general review. *Antioxidants*. 2022;11(6):1192. DOI: 10.3390/antiox11061192.
19. Ispiryan A., Atkociuniene V., Makstutiene N., Sarkinas A., Salaseviciene A., Urbonaviciene D., Viskelis J., Pakeltiene R., Raudone L. Correlation between Antimicrobial Activity Values and Total Phenolic Content/Antioxidant Activity in *Rubus idaeus* L. *Plants*. 2024;13(4):504. DOI: 10.3390/plants13040504.
20. Garjonyte R., Budiene J., Labanauskas L., Judzentiene A. In vitro antioxidant and prooxidant activities of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) stem extracts. *Molecules*. 2022;27(13):4073. DOI: 10.3390/molecules27134073.
21. Chaves V. C., Soares M. S. P., Spohr L., Teixeira F., Vieira A., Constantino L. S., Dal Pizzol F., Lencina C. L., Spanevello R. M., Freitas M. P., Simões C. M. O., Reginatto F. H., Stefanello F. M. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. *Neuroscience Letters*. 2020;714:134566. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134566.
22. Paczkowska-Walendowska M., Gościniak A., Szymanowska D., Szwajgier D., Baranowska-Wójcik E., Szulc P., Dreczka D., Simon M., Cielecka-Piontek J. Blackberry Leaves as New Functional Food? Screening Antioxidant, Anti-Inflammatory and Microbiological Activities in Correlation with Phytochemical Analysis. *Antioxidants*. 2021;10(12):1945. DOI: 10.3390/antiox10121945.
23. Veličković I., Grujić S., Džamić A., Krivošej Z., Marin P. D. In vitro antioxidant activity of dewberry (Rubus caesius L. var. aquáticus Weihe. & Nees.) leaf extracts. *Archives of Biological Sciences*. 2015;67(4):1323–1330. DOI: 10.2298/ABS150414109V.
24. Hering A., Stefanowicz-Hajduk J., Hałasa R., Olech M., Nowak R., Kosiński P., Ochocka J. R. Polyphenolic Characterization, Antioxidant, Antihyaluronidase and Antimicrobial Activity of Young Leaves and Stem Extracts from Rubus caesius L. *Molecules*. 2022;27(19):6181. DOI: 10.3390/molecules27196181.
25. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Serebryakov E. B., Smirnov S. N., Proksh P., Ionov N. S., Poroikov V. V., Luzhanin V. G. Phytochemical analysis of polyphenol secondary metabolites in cloudberry (Rubus Chamaemorus L.) leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55:253–258. DOI: 10.1007/s11094-021-02407-y.
26. Faleva A. V., Ul'yanovskii N. V., Onuchina A. A., Falev D. I., Kosyakov D. S. Comprehensive characterization of secondary metabolites in fruits and leaves of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Metabolites*. 2023;13(5):598. DOI: 10.3390/metabo13050598.
27. Ilina M. B., Sergunova E. V. The composition and content of some vitamins in the leaves of European dewberry (Rubus caesius L.) and aqueous extracts based on them. *Pharmacy*. 2024;(3):33–37. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2024-03-05.
28. Strakh Ya. L., Ignatovets O. S. Chemical composition and biological activity of metabolites of *Rubus chamaemorus* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological serie*. 2022;67(3):321–331. (In Russ.) DOI: 10.29235/1029-8940-2022-67-3-321-331.
29. Matistov N. V., Valuiskikh O. E., Shirshova T. I. Chemical composition and micronutrient content in cloudberry fruits (*Rubus chamaemorus* L.) in the European North-East of Russia. *Izvestiya Komi nauchnogo centra URO RAN*. 2012;1(9):41–45. (In Russ.)
30. Zhbanova E. V. Fruit of raspberry Rubus Idaeus L. as a source of functional ingredients. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2018;48(1):5–14. (In Russ.) DOI 10.21603/2074-9414-2018-1-5-14.

pharmtech & ingredients

27-я Международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства

27th International exhibition of equipment, raw materials and technologies for pharmaceutical production

25–28.11.2025

Москва, Крокус Экспо
Crocus Expo, Moscow, Russia

Забронируйте стенд

Book your stand

pharmtech-expo.ru

+7 495 799 55 85
pharmtech@ite.group

ITE ОРГАНИЗАТОР ORGANISER

0+

Оригинальная статья / Research article

УДК 616-035.1

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1948

Check for updates

CC BY 4.0

Оценка эффективности и безопасности цитофлавина в качестве нейропротектора на основе систематического обзора

Е. К. Красова✉, **И. А. Титович, К. О. Сидоров, С. В. Оковитый**

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

✉ **Контактное лицо:** Красова Елена Константиновна. **E-mail:** elena.krasova@spcpu.ru

ORCID: Е. К. Красова – https://orcid.org/0000-0001-7785-4256;
И. А. Титович – https://orcid.org/0000-0002-1343-4663;
К. О. Сидоров – https://orcid.org/0000-0002-7573-1719;
С. В. Оковитый – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Статья поступила: 14.10.2024 **Статья принята в печать:** 19.12.2024 **Статья опубликована:** 20.12.2024

Резюме

Введение. Неврологические заболевания занимают одно из первых мест по показателю DALY (Disability-adjusted life year) и выступают второй причиной смертности в мире. Наблюдается тенденция к омоложению и увеличению заболеваемости этой группы патологий. Лекарственная терапия, направленная на нейропротекцию и улучшение восстановления неврологических функций, согласно клиническим рекомендациям, включает в себя сукцинатсодержащий препарат – Цитофлавин®. Однако эти рекомендации основаны на очень ограниченном количестве исследований (для Цитофлавина® – 4 исследования). В связи с огромным количеством работ в области применения сукцинатсодержащих препаратов в качестве нейропротекторов, отсутствием количественной оценки результатов исследований перспективным представляется проведение систематических обзоров и метаанализов в этой области.

Цель. Оценка эффективности и безопасности применения Цитофлавина® в качестве нейропротектора на основе систематического обзора.

Материалы и методы. Систематический обзор результатов исследований был проведен согласно критериям PRISMA 2020. Поиск публикаций проводили по базам данных PubMed, Medline, а также российским научным электронным библиотекам eLibrary.Ru и РИНЦ. Также осуществляли поиск материалов в системах отечественного и международного реестра клинических исследований.

Результаты и обсуждение. В обзор вошло 18 публикаций, включающих описание терапии 10 патологий неврологического генеза. Наибольшая часть исследований была посвящена терапии ишемического инсульта (n = 4/18; 22,22 %) и проявлениям когнитивной дисфункции (n = 5/18; 27,78 %). Пул материалов включал в себя разнообразные по дизайну исследования, однако большая часть была представлена открытыми сравнительными рандомизированными/нерандомизированными исследованиями. Анализ источников показал, что положительный эффект при применении Цитофлавина® и целесообразность включения его в схему терапии отмечается во всех публикациях. Однако многие исследования имеют низкую статистическую мощность ввиду маленьких размеров выборок пациентов, их гетерогенности и неполноты представления данных о лечении, отсутствия рандомизации.

Заключение. По результатам большинства клинических исследований показано, что применение Цитофлавина® является безопасным, а его назначение при неврологических заболеваниях различного генеза является целесообразным в связи со снижением частоты неблагоприятных неврологических исходов у пациентов. Для объективного результата исследований требуется проведение метааналитической оценки включенных в обзор публикаций.

Ключевые слова: нейропротекция, систематический обзор, Цитофлавин®, неврологические расстройства

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

Вклад авторов. Е. К. Красова и И. А. Титович осуществляли поиск материалов, проводили скрининг и экстракцию данных, участвовали в написании систематического обзора. С. В. Оковитый отвечал за концепцию обзора, редактирование текста статьи, научное консультирование и утверждение окончательного варианта статьи для публикации. К. О. Сидоров осуществлял редактирование и оформление текста статьи.

© Красова Е. К., Титович И. А., Сидоров К. О., Оковитый С. В., 2025
© Krasova E. K., Titovich I. A., Sidorov K. O., Okovityi S. V., 2025

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России».

Для цитирования: Красова Е. К., Титович И. А., Сидоров К. О., Оковитый С. В. Оценка эффективности и безопасности цитофлавина в качестве нейропротектора на основе систематического обзора. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):285–318. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1948

Evaluation of the efficacy and safety of cytoflavin as a neuroprotector based on a systematic review

Elena K. Krasova✉, Irina A. Titovich, Kirill O. Sidorov, Sergey V. Okovityi

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

✉ **Corresponding author:** Elena K. Krasova. **E-mail:** elena.krasova@spcpu.ru

ORCID: Elena K. Krasova – https://orcid.org/0000-0001-7785-4256;
Irina A. Titovich – https://orcid.org/0000-0002-1343-4663;
Kirill O. Sidorov – https://orcid.org/0000-0002-7573-1719;
Sergey V. Okovityi – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Received: 14.10.2024 **Accepted:** 19.12.2024 **Published:** 20.12.2024

Abstract

Introduction. Currently, neurological diseases occupy one of the first places in terms of the DALY (Disability-adjusted life year) index and are the second cause of death in the world. There is a tendency towards rejuvenation and an increase in morbidity. Drug therapy aimed at neuroprotection and improving the restoration of neurological functions according to clinical recommendations includes a succinate-containing drug – Cytoflavin. However, these recommendations are based on a very limited number of studies (4 studies for cytoflavin). Due to the huge amount of work in the field of the use of succinate-containing drugs as neuroprotectors, the lack of quantitative assessment of research results, it seems promising to conduct systematic reviews and meta-analysis in this area.

Aim. Evaluation of the efficacy and safety of cytoflavin as a neuroprotector based on a systematic review.

Materials and methods. A systematic review of the research results was conducted according to the criteria of PRISMA 2020. The search for publications was carried out using PubMed, Medline databases, as well as Russian scientific electronic libraries eLibrary.Ru and RSCI. Materials were also searched in the systems of the national and international registry of clinical trials.

Results and discussion. The review included 18 publications, including a description of the therapy of 10 pathologies of neurological origin. The largest part of the studies was devoted to the treatment of ischemic stroke (n = 4/18; 22.22 %) and manifestations of cognitive dysfunction (n = 5/18; 27.78 %). The pool of materials included studies of various designs, but most of them were represented by open comparative randomized/non-randomized studies. An analysis of the sources showed that the positive effect of the use of cytoflavin and the expediency of including its therapy regimen is noted in all publications. However, many studies have low statistical power due to the small sample sizes of patients, their heterogeneity and incompleteness of providing treatment data and the lack of randomization.

Conclusion. According to the results of most clinical studies, it has been shown that the use of cytoflavin is safe, and its administration in neurological diseases of various origins is advisable due to a decrease in the frequency of adverse neurological outcomes in patients. For an objective research result, a meta-analytical assessment of the publications included in the review is required.

Keywords: neuroprotection, systematic review, cytoflavin, neurological disorders

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 K. Krasova and Irina A. Titovich searched for materials, conducted screening and data extraction, participated in writing a systematic review. Sergey V. Okovity was responsible for the concept of the review, editing the text of the article, scientific advice and approval of the final version of the article for publication. Kirill O. Sidorov carried out editing and formatting of the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using equipment the Core Shared Research Facilities "Analytical Center" of the Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation: Krasova E. K., Titovich I. A., Sidorov K. O., Okovityi S. V. Evaluation of the efficacy and safety of cytoflavin as a neuroprotector based on a systematic review. *Drug development & registration*. 2025;14(1):285–318. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1948

ВВЕДЕНИЕ

Доказательная медицина представляет собой раздел медицины, основанный на доказательствах, предполагающий поиск, сравнение, обобщение и широкое распространение полученных доказательств для использования в интересах больных [10]. Основная цель внедрения принципов доказательной медицины в практику здравоохранения – оптимизация качества оказания медицинской помощи с точки зрения безопасности, эффективности, стоимости и других значимых факторов [11]. Оптимизация аналитической оценки доказательной информации может быть проведена при помощи систематического обзора и метаанализа. Эти методы занимают вершину в иерархии доказательств.

Неврологические заболевания, включая столбняк, менингиты, инсульты, черепно-мозговые травмы, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, опухоли центральной нервной системы и др., занимают одно из первых мест по показателю DALY (Disability-adjusted life year) и выступают второй причиной смертности в мире. В 2016 году они были диагностированы у 276 миллионов человек, при этом за последние тридцать лет общее число летальных исходов возросло на 61 % [1, 2]. Также наблюдается тенденция к омоложению и увеличению количества случаев неврологических расстройств [3].

Традиционно с целью терапии неврологических нарушений, например таких, как ишемический инсульт, черепно-мозговая травма, применяется комплексный сукцинатсодержащий препарат – Цитофлавин®, включающий в себя инозин, никотинамид, рибофлавин, янтарную кислоту, обладающий антигипоксическим действием[1] [4].

Янтарная кислота является естественным субстратом сукцинатдегидрогеназы – одного из комплексов дыхательной энерготранспортной цепи, основной функцией которого является восстановление FAD. В условиях гипоксии FAD-зависимое звено цикла трикарбоновых кислот угнетается позже NAD-зависимых оксидаз, поэтому в клетке некоторое время поддерживается энергетический обмен при наличии сукцината, как субстрата для окисления в митохондриях. Янтарная кислота выступает в качестве интермедиата различных биохимических циклов и лиганда специфических рецепторов (SUCNR1, GPR91), расположенных на поверхности цитоплазматической мембраны и сопряженных с G-белками. При активации рецепторов усиливается процесс реабсорбции фосфата и глюкозы, глюконеогенеза, повышается артериальное давление [4, 5]. Рибофлавин, как кофермент, повышает активность сукцинатдегидрогеназы, а также способен восстанавливать глутатион, что оказывает непрямое антиоксидантное действие. Никотинамид, также обладая коферментными свойствами, способствует активации NAD-зависимых ферментных систем, но в меньшей степени, чем NAD. Инозин, входящий в состав, повышает количество пуриновых нуклеотидов, участвующих в ресинтезе макроэргов – АТФ и ГТФ, вторичных мессенджеров – цАМФ и цГМФ, а также нуклеиновых кислот. Исследования также демонстрируют способность инозина несколько снижать активность ксантиноксидазы, что приводит к подавлению продукции высокоактивных форм и соединений кислорода [4].

Стоит отметить, что клинические рекомендации в отношении применения Цитофлавина® основаны на очень ограниченном количестве исследований: всего 4 исследования, из которых два – многоцентровые рандомизированные [6, 7], одно – открытое рандомизированное контролируемое исследование [8], одно – рандомизированное сравнительное исследование [9].

В связи с большим количеством исследований в области применения сукцинатсодержащих препаратов в качестве нейропротекторов, отсутствием количественной оценки степени согласованности или расхождения результатов исследований перспективным представляется проведение систематических обзоров и метаанализа в этой области.

Целью нашего исследования является оценка эффективности и безопасности Цитофлавина® в качестве нейропротектора на основе систематического обзора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Систематический обзор результатов исследований был проведен согласно критериям PRISMA 2020 [12, 13]. Протокол исследования был составлен в октябре 2023 года.

Поиск публикаций проводили по базам данных PubMed, Medline, а также российским научным электронным библиотекам eLibrary.Ru и РИНЦ. Также осуществляли поиск материалов в системах официального реестра клинических исследований Минздрава России[2] и международного реестра клинических исследований[3].

Для поиска информации в базах eLibrary.Ru и РИНЦ были использованы следующие ключевые слова: «Цитофлавин», «клинические исследования», «нейропротектор». Чтобы провести поиск точных словосочетаний, при запросе словосочетание заключали в кавычки. Так, в случае eLibrary.Ru поиск посредством доступной на сайте опции «расширенный поиск» проводили с внесением в диалоговое окно сочетания слов «Цитофлавин» AND «клинические исследования» AND «нейропротектор».

[1] Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых. Клинические рекомендации. М.: Всероссийское общество неврологов; 2021. 260 с.

[2] Государственный реестр клинических исследований. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermitionReg.aspx. Ссылка активна на 09.10.2023.

[3] National Library of Medicine:ClinicalTrials.gov Available at: https://clinicaltrials.gov/ Accessed: 09.10.2023.

В базах данных PubMed и Medline поиск проводили по ключевым словам: (cytoflavin) AND (clinical studies)) AND (neuroprotector). Ограничения по датам и языкам публикаций отсутствовали. При поиске публикаций с использованием разных баз данных часть фильтров в них была идентичной. Вместе с тем некоторые из них имели ограниченные опции выбора, что представляло определенные трудности при обобщении и представлении результатов поиска. Ниже приведен перечень баз данных с указанием использованных фильтров.

Поиск в базах данных PubMed и Medline ограничивали по дизайну исследований, включая такие типы дизайна, как Clinical Study, Clinical Trial, Comparative Study, Controlled Clinical Trial, Evaluation Study, Multicenter Study, Observational Study, Randomized Controlled Trial. В базе данных eLibrary.Ru и РИНЦ в диалоговом окне «Где искать?» поиск осуществляли по следующим критериям: «в названии», «в аннотации», «в ключевых словах». «Тип публикации» определяли как «статьи в журналах». Дополнительными критериями поиска служили параметры «искать с учетом морфологии» и «искать в публикациях, имеющих полный текст на eLibrary.Ru».

В обзор включались исследования, соответствующие следующим критериям:

1. *Участники*: дети от года и взрослые с диагностированными неврологическими расстройствами.
2. *Концепт*: нейропротекторная терапия неврологических расстройств препаратом Цитофлавин®. В обзор включали публикации, основанные на исследовании по оценке эффективности и безопасности нейропротекции в формате монотерапии по сравнению с отсутствием вмешательства (использование плацебо). Путь введения – внутривенный, пероральный. Вместе с тем добавлялись публикации, имеющие сведения о влиянии на неврологический статус, динамику когнитивных функций у пациентов на фоне терапии, показатель смертности и частоты возникновения н бежелательных лекарственных реакций.
3. *Контекст*: все вмешательства, проводимые у пациентов, выполнялись в условиях стационарных отделений медицинских организаций (отделение реанимации / отделение реанимации и интенсивной терапии).
4. *Источники доказательств*: рандомизированные контролируемые (проспективные) испытания с двойным или тройным слепым контролем, открытые экспериментальные исследования (обсервационные проспективные и ретроспективные), опубликованные в журналах, сборниках трудов конференций; протоколы планирующихся/текущих исследований в реестрах клинических исследований.

Извлечение данных производили с использованием стандартизированных форм, которые включали в себя общую информацию (наименование статьи, авторы, год, спонсор, цель исследования, заявленная авторами), дизайн исследований, наличие сокрытия распределения, рандомизации, ослепления, критериев включения/исключения, объем выборки, возраст, пол. Дополнительная информация включала полноту представления данных / выборочное представление данных, продолжительность исследований, описание вмешательства, контрольной группы, дозу, продолжительность терапии, нежелательные явления, снижение частоты неблагоприятных неврологических исходов у пациентов, показатель смертности.

Для характеристики включенных в обзор исследований был использован описательный статистический анализ. Полученные результаты аккумулированы в формате таблиц, схем и инфографики (рисунок 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация, скрининг, включение в обзор доказательств

Алгоритм поэтапного поиска исследований представлен на рисунке 1. На первом этапе было получено следующее количество публикаций, удовлетворяющих совокупным критериям: 1 публикация, индексированная в PubMed и Medline, 220 – в eLibrary.Ru, РИНЦ. Также на этапе предварительного отбора включены 6 клинических исследований из системы официального реестра клинических исследований Минздрава России и 5 – из международного реестра клинических исследований. Материалы, полученные из этих систем, удовлетворяли всем вышеприведенным критериям поиска. Таким образом, на этапе идентификации суммарно пул материалов был представлен 232 исследованиями.

Этап идентификации включал в себя, помимо системного поиска по критериям, отбор по названиям и абстрактам публикаций. На этом этапе два исследователя независимо друг от друга провели скрининг, по результатам которого были удалены нерелевантные публикации ($n = 111$). В случае расхождения мнений о включении публикаций в дальнейший процесс скрининга консенсус был достигнут после обсуждения. Далее проводили исключение дублированных статьей (всего было исключено 11 публикаций). По результатам этапа идентификации, число отобранных статей составило 110.

На этапе скрининга в результате независимой работы двух исследователей с абстрактами в совокупности 47 исследований были исключены из обзора. Основные причины исключения включали несоответствие основной теме обзора, возраста популяции, а также те случаи, когда статьи являлись клиническими рекомендациями или клиническими случаями. Далее проводили отбор полнотекстовых версий публикаций и их результатов. В результате было исключено 9 исследований. Дальнейшую оценку на критерии приемлемости проводили для 54 публикаций.

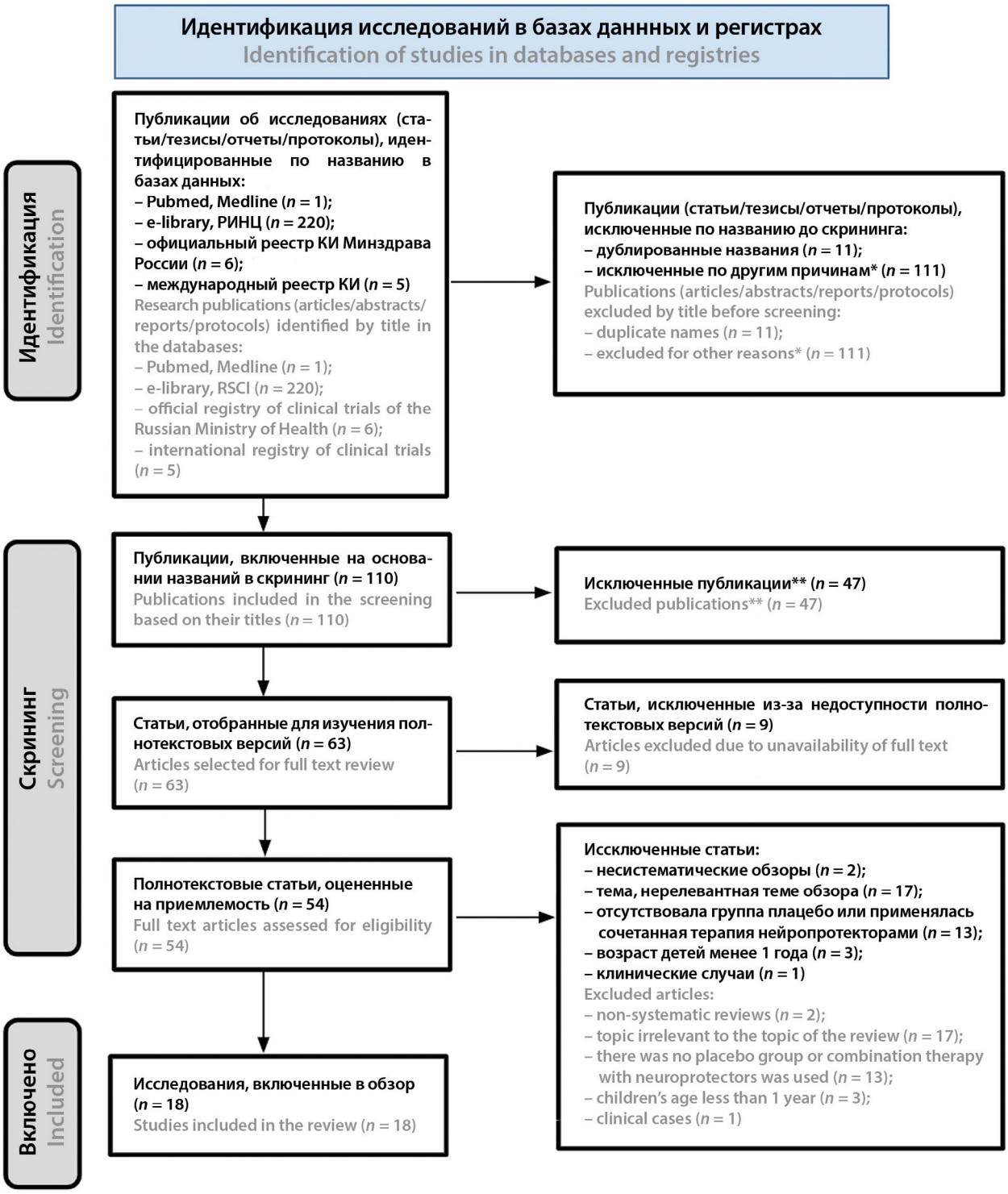


Рисунок 1. Диаграмма систематического обзора. Использован макет PRISMA 2020 [13]

Примечания: * Критерии исключения: не соответствуют основной цели обзора; исследования на животных; является обзором, как заявлен в названии.
**** Критерии исключения: тезисы (абстракты) не соответствует основной цели данного обзора; являются клиническими рекомендациями; являются клиническими случаями; возраст исследуемой популяции не соответствует цели данного обзора**

Figure 1. Systematic review diagram. PRISMA 2020 layout used [13]

Notes: * Exclusion criteria: not relevant to the main purpose of the review; animal research; is a review as stated in the title.
**** Exclusion criteria: abstracts (abstracts) do not correspond to the main purpose of this review; are clinical recommendations; are clinical cases; The age of the study population is not appropriate for the purpose of this review**

В итоге 36 исследований, индексированных в eLibrary.Ru, РИНЦ, были исключены из обзора, так как представляли собой несистематические обзоры литературы (*n* = 2), клинические случаи (*n* = 1), не соответствовали теме настоящего обзора (*n* = 17), возраст исследуемой популяции был менее 1 года (*n* = 3), в исследовании отсутствовала группа плацебо или применялась сочетанная терапия нейропротекторами (*n* = 13). Всего 18 исследований полностью соответствовали заявленным критериям отбора и были оценены как приемлемые для анализа и обобщения при последующем написании обзора.

Характеристика исследований

Все статьи, вошедшие в обзор, представляют собой исследования, опубликованные в медицинских журналах. Динамика публикаций исследований по годам представлена на рисунке 2. Подавляющее число исследований было выполнено на территории Российской Федерации (*n* = 16/18; 89 %), небольшая часть – в Казахстане (*n* = 1/18; 5,5 %) и Республике Беларусь (*n* = 1/18; 5,5 %). Подробное распределение испытаний по странам и городам приведено на рисунке 3. Среднее количество участников составило более 116 человек. Соотношение между запланированным числом участников и реальным значением сошлось в 94,5 % исследований (*n* = 17/18).

Стоит отметить разнообразный спектр патологий, включенных в обзор. Наибольшая часть исследований была посвящена терапии ишемического инсульта (*n* = 4/18; 22,22 %) и проявлениям когнитивной дисфункции (*n* = 5/18; 27,78 %). В меньшей степени встречались стенозы или окклюзии артерий (*n* = 2/18; 11,11 %). Единичные исследования были посвящены нейропротекторной терапии Цитофлавином® при геморрагическом инсульте (*n* = 1/18; 5,56 %), диабетической полинейропатии (*n* = 1/18; 5,56 %), астеническом синдроме (*n* = 1/18; 5,56 %), нейросифилисе (*n* = 1/18; 5,56 %), рассеянном склерозе (*n* = 1/18; 5,56 %), транзиторных ишемических атаках (*n* = 1/18; 5,56 %). Средний возраст пациентов в исследования составил 47,3 года.

Большая часть исследований была проведена с включением пациентов обоих полов (*n* = 13/18; 72,22 %). В 22,22 % исследований данные о половой принадлежности пациентов отсутствовали.

В 27,78 % публикаций (*n* = 5/18) авторы описывали дизайн как открытое сравнительное исследование (3-я категория). Открытые сравнительные рандомизированные исследования (2-я категория) встречались в 11,11 % (*n* = 2/18). В 4 статьях дизайн был определен как проспективное рандомизированное исследование (22,22 %) (2-я категория). Многоцентровые двойные плацебоконтролируемые рандомизированные исследования встретились в 16,67 % публикаций (*n* = 3/18) (1-я категория). Единично в выборку вошли многоцентровое рандомизированное пострегистрационное контрольно-сравнительное исследование (*n* = 1/18; 5,56 %) (1-я категория), открытое простое проспективное исследование (*n* = 1/18; 5,56 %) (3-я категория), открытое проспективное рандомизированное исследование (*n* = 1/18; 5,56 %) (2-я категория).

Только в 5 исследованиях было дано описание метода рандомизации (*n* = 5/18; 27,78 %). В остальных публикациях описание методологии рандомизации отсутствовало (*n* = 7/18; 38,89 %).

Продолжительность исследований была описана во всех публикациях, вошедших в обзор, и составила в среднем 83 дня (размах: 2 суток – 1 год).

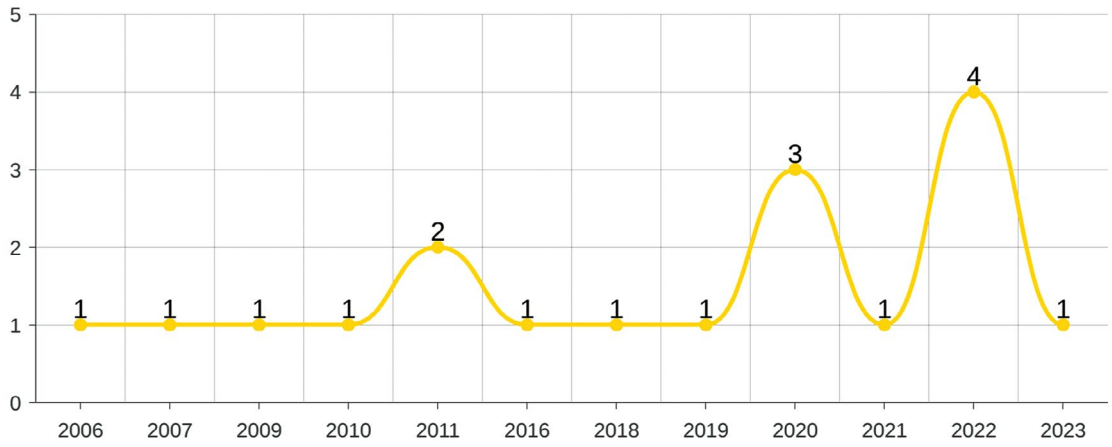


Рисунок 2. Динамика публикаций исследований по годам

Figure 2. Dynamics of research publications by year

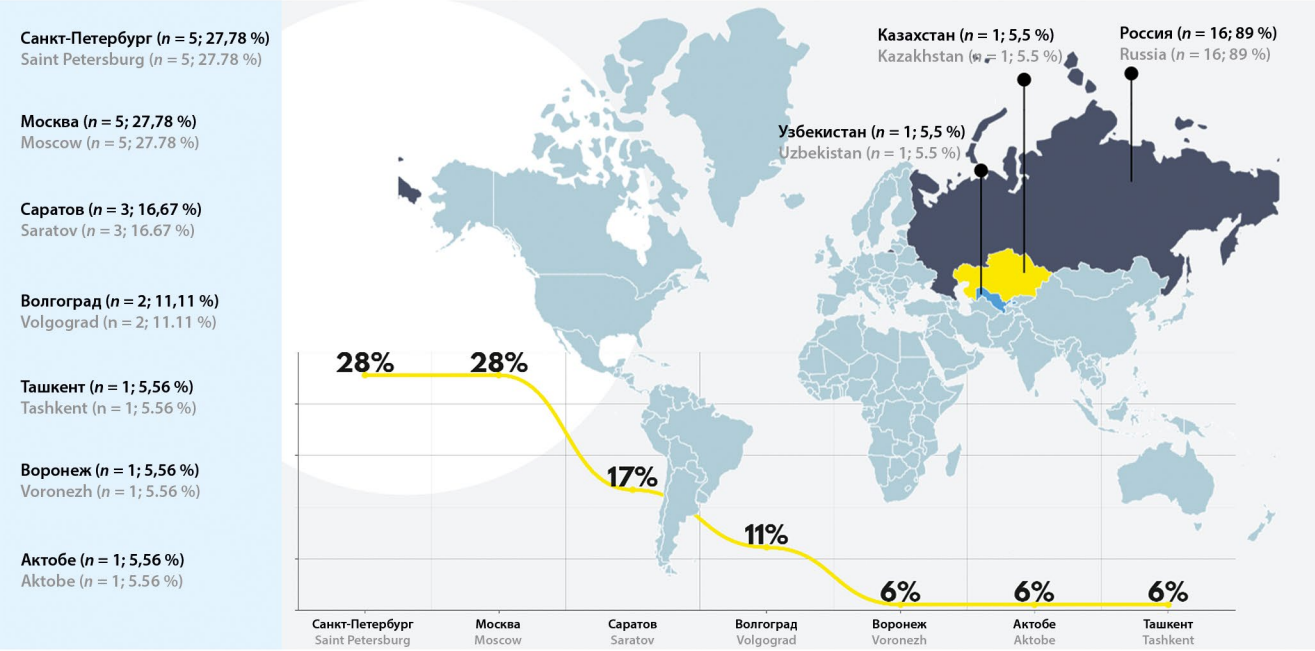


Рисунок 3. Распределение исследований по странам и городам

Figure 3. Distribution of studies by countries and cities

Все исследования, вошедшие в обзор, были разделены на 3 категории в зависимости от дизайна. Краткая характеристика каждого испытания приведена в таблице 1.

Анализ целей вошедших в систематический обзор исследований показал, что в 61,11 % публикаций авторы оценивали только эффективность терапии Цитофлавином® (n = 11/18), в 38,89 % – проводилась комплексная оценка эффективности и безопасности применения препарата (n = 7/18).

В подавляющем большинстве статей оценивалась динамика неврологического статуса у пациентов (n = 16/18; 88,89 %) и когнитивных функций (n = 6/18; 33,33 %). С целью оценки неврологического статуса и когнитивных нарушений применялись специализированные тесты и шкалы (MMSE; тест Лурия; MoCA и др.) и осмотры специалистов. Единичные исследования учитывали динамику астенического синдрома (n = 1/18; 5,56 %), объема очага острой ишемии (n = 1/18; 5,56 %) и показатель летальности (n = 2/18; 11,11 %). В 38,89 % публикаций проводилась оценка нежелательных лекарственных реакций на прием Цитофлавина® (n = 7/18).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние десятилетия наблюдается отчетливая тенденция к увеличению числа публикаций по теме нейропротекции, что обусловливает актуальность систематизации полученных в клинических исследованиях результатов и их обобщения путем проведения систематических обзоров и метаанализа для более качественного формирования терапевтических стратегий.

Проведенный систематический обзор включил 18 публикаций в индексированных базах данных PubMed, eLibrary.Ru, РИНЦ. В источниках было описано 10 патологий неврологического генеза. Во всех публикациях авторами сообщалось о положительном эффекте при применении Цитофлавина® и целесообразности включении его в схему терапии. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованным систематическим обзором с метааналитической оценкой применения Цитофлавина® как нейропротектора [32].

Анализ динамики объема очага ишемического поражения проводился в публикации С. А. Румянцевой и соавторов. В исследовании было отмечено положительное влияние Цитофлавина® на морфологическую картину на 21 день терапии. Наблюдалось снижение объема очага на 26 % по сравнению с контрольной группой [22].

Показатель летальности был оценен в 2 публикациях у пациентов с ишемическим инсультом. А. И. Федин и соавторы отмечали снижение смертности в 2,4 раза при введении препарата в период 6–12 ч от начала инсульта, в 1,8 раза – при введении через 12–24 ч [14]. В исследовании О. Юденковой и Жукова В. применение Цитофлавина® в течение 10 дней позволило снизить показатель трехнедельной летальности на 13,5 % по сравнению с больными, получающими только базисную терапию [31].

Таблица 1. **Характеристика исследований, вошедших в обзор**

Table 1. **Characteristics of studies included in the review**

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
1 категория 1 category								
10	Оценка эффективности применения Цитофлавина® в качестве метаболического нейропротектора в терапии больных ишемическим инсультом в остром периоде (первые 6–24 ч от начала заболевания) Evaluation of the effectiveness of Cytoflavin® as a metabolic neuroprotector in the treatment of patients with ischemic stroke in the acute period (the first 6–24 hours from the onset of the disease)	Многоцентровое двойное слепое плацебоконтролируемое исследование Multicenter, double-blind, placebo-controlled study	600 пациентов (295 мужчин; 305 женщин); возраст 45–60 лет 600 patients (295 men; 305 women); age 45–60 years	Ишемический инсульт в остром периоде Ischemic stroke in the acute period	**1 группа** – Цитофлавин® вводили 2 р/сут в/в капельно на 400 мл 5 % раствора глюкозы 10 суток на фоне базисной терапии. **2 группа (контрольная)** – вводили активное плацебо **Group 1** – Cytoflavin® was administered 2 times a day intravenously in 400 ml of 5 % glucose solution for 10 days against the background of basic therapy. **Group 2 (control)** – active placebo was administered.	Шкала MMSE; шкала NIH; индекс Бартела MMSE scale; NIH scale; Barthel index	1. Применение Цитофлавина® в первые 6–12 ч от начала развития инсульта способствовало более ↑ регрессу очаговых неврологических расстройств и ↓ периода реабилитации. 2. Отмечалось ↓ летальности в 2,4 раза при введении препарата в период 6–12 ч от начала инсульта, в 1,8 раза – при введении через 12–24 ч. 3. Статистически значимые результаты получены по показателю неврологического статуса на 120 сутки. Индекс Бартела составлял 78,3 % против 56,82 % у группы плацебо. 4. Нежелательные лекарственные реакции отсутствовали 1. The use of Cytoflavin® in the first 6–12 hours from the onset of stroke contributed to more ↑ regression of focal neurological disorders and ↓ rehabilitation period. 2. There was a ↓ mortality rate of 2.4 times when the drug was administered within 6–12 hours from the onset of stroke, and 1.8 times when administered after 12–24 hours. 3. Statistically significant results were obtained in terms of neurological status on day 120. The Barthel index was 78.3 % versus 56.82 % for the placebo group. 4. There were no adverse drug reactions	[14]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
2	Оценка эффективности и безопасности применения Цитофлавина® на фоне базовой терапии больных с рецидивирующе-ремиттирующим рассеянным склерозом в стадии обострения Evaluation of the effectiveness and safety of the use of Cytoflavin® against the background of basic therapy for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis in the acute stage	Многоцентровое рандомизированное пострегистрационное контрольно-сравнительное исследование Multicenter randomized post-registration control and comparative study	94 пациента (нет данных о половой принадлежности); возраст 18–55 лет 94 patients (no data on gender); age 18–55 years	Рецидивирующе-ремиттирующий и вторично-прогрессирующий рассеянный склероз (РС) в стадии обострения Relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis (MS) in the acute stage	**1 группа** – Цитофлавин® на фоне базисной терапии РС. **2 группа** – только базисная терапия. Через 5 дней терапии на основании результатов каждая группа была разделена на 2 подгруппы: подгруппа 1А – Цитофлавин® с базисной терапией; подгруппа 1Б – + получала кортикостероиды (КС) (пульс-терапия в течение 3–5 дней); подгруппа 2А – базисная терапия; подгруппа 2Б – + получала КС (пульс-терапия в течение 3–5 дней) **Group 1** – Cytoflavin® against the background of basic therapy for MS. **Group 2** – basic therapy only. After 5 days of therapy, based on the results, each group was divided into 2 subgroups: subgroup 1A – Cytoflavin® with basic therapy; subgroup 1B – + received corticosteroids (CS) (pulse therapy for 3–5 days); subgroup 2A – basic therapy; subgroup 2B – + received CS (pulse therapy for 3–5 days)	Шкалы EDSS и FS; осмотр офтальмологом; клинический и биохимический анализы крови; опросник когнитивных неудач; тест повторения цифр; шкала MMSE; опросник ИОКЖ EDSS and FS scales; examination by an ophthalmologist; clinical and biochemical blood tests; Cognitive Failures Questionnaire; digit repetition test; MMSE scale; IQL questionnaire	1. В группе 1 41,5 % (22 человека) не нуждались в назначении КС по сравнению с группой 2 – 34 % (14 больных) ($p < 0,001$). 2. У 83 из 94 (88,3 %) больных наблюдался частичный ↓ симптомов заболевания и ↓ степени тяжести по шкале EDSS. 3. Применение Цитофлавина® купировало обострение РС и ↓ неврологическую симптоматику у всех больных. 4. В подгруппе 1Б степень инвалидизации по шкале EDSS ↓ примерно на 0,17 балла по сравнению с группой без введения Цитофлавина® 1. In group 1, 41.5 % (22 people) did not need to prescribe CS compared to group 2 – 34 % (14 patients) ($p < 0.001$). 2. 83 out of 94 (88.3 %) patients had partial ↓ symptoms of the disease and ↓ severity on the EDSS scale. 3. The use of Cytoflavin® relieved exacerbation of MS and ↓ neurological symptoms in all patients. 4. In subgroup 1B, the degree of disability on the EDSS scale is ↓ by approximately 0.17 points compared to the group without Cytoflavin® administration	[15]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
3	Оценка эффективности и безопасности комбинированного метаболического препарата, содержащего инозин, никотинамид, рибофлавин и янтарную кислоту, для лечения диабетической нейропатии Evaluation of the effectiveness and safety of a combination metabolic drug containing inosine, nicotinamide, riboflavin and succinic acid for the treatment of diabetic neuropathy	Многоцентровое двойное слепое плацебоконтролируемое рандомизированное клиническое исследование Multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial	216 пациентов (мужчины и женщины); возраст 45–74 года 216 patients (men and women); age 45–74	Диабетическая полинейропатия (ДПН) Diabetic polyneuropathy (DPN)	**1 группа** – схема: 1–10 день – Цитофлавин® в/в 1 р/день в дозе 20 мл, разбавленный 200 мл физиологического раствора, со скоростью 3–4 мл/мин; 11–86 день – Цитофлавин® по 2 таблетки 2 р/день п/о (утром и вечером не позднее 18:00). **2 группа** – активное плацебо, аналогичная 1 группе схема терапии **Group 1** – scheme: days 1–10 – Cytoflavin® IV 1 time per day at a dose of 20 ml, diluted with 200 ml of saline solution, at a rate of 3–4 ml/min; Days 11–86 – Cytoflavin® 2 tablets 2 times a day p/o (morning and evening no later than 18:00). **Group 2** – active placebo, treatment regimen similar to group 1	Шкала TSS; шкала NIS-LL; тест зрительного сканирования и рабочей памяти, тест TMT; шкала FAS TSS scale; NIS-LL scale; visual scanning and working memory test, TMT test; FAS scale	1. В группе Цитофлавина® изменение по шкале TSS через 12 недель составило –2,65 (±1,46) против –1,73 (±1,51) в группе плацебо ($p < 0,0001$). 2. Анализ показателей TSS выявил статистически значимые межгрупповые различия в динамике интенсивности парестезии и онемения начиная с 11 дня ($p = 0,035$ и $p = 0,001$). 3. ↓ симптомов ДПН было отмечено в группе Цитофлавина® вне зависимости от уровня компенсации сахарного диабета 2 типа, однако ↑ результаты наблюдались у больных с исходным значением TSS <7,5 балла. 4. К 57 дню статистически значимые межгрупповые различия были выявлены по динамике интенсивности компонента «жжение» ($p = 0,005$). 5. Цитофлавин® показал приемлемый профиль безопасности 1. In the Cytoflavin® group, the change in TSS after 12 weeks was –2.65 (±1.46) versus –1.73 (±1.51) in the placebo group ($p<0.0001$). 2. Analysis of TSS indicators revealed statistically significant intergroup differences in the dynamics of the intensity of paresthesia and numbness starting from day 11 ($p = 0.035$ and $p = 0.001$). 3. ↓ symptoms of DPN were noted in the Cytoflavin® group, regardless of the level of compensation for type 2 diabetes mellitus, however, ↑ results were observed in patients with an initial TSS value <7.5 points. 4. By day 57, statistically significant intergroup differences were identified in the dynamics of the intensity of the "burning" component ($p = 0.005$). 5. Cytoflavin® showed an acceptable safety profile	[16]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
4	Оценка возможности профилактики когнитивных расстройств после длительных хирургических операций у пациентов пожилого возраста с помощью оригинального нейрометаболического сукцинатсодержащего препарата Assessing the possibility of preventing cognitive disorders after long-term surgical operations in elderly patients using an original neurometabolic succinate-containing drug	Многоцентровое двойное слепое плацебоконтролируемое рандомизированное исследование Multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized trial	200 пациентов (мужчины и женщины; 5 пациентов досрочно выбыли из исследования в предоперационный период); возраст 60–80 лет 200 patients (male ranks and women; 5 patients dropped out of the study early during the preoperative period); age 60–80 years	Когнитивные расстройства после длительных хирургических операций Cognitive impairment after long-term surgery	**Основная группа** – в/в Цитофлавин® по схеме 20 мл в 200 мл натрия хлорида, капельно, 1 р/сут до 5 суток, затем по 2 таблетки за 30 мин до приема пищи 2 р/день. **Контрольная группа** – плацебо, аналогичная основной группе схема **Main group** – IV Cytoflavin® according to the regimen of 20 ml in 200 ml of sodium chloride, drip, 1 time per day for up to 5 days, then 2 tablets 30 minutes before meals 2 rubles/day. **Control group** – placebo, scheme similar to the main group	Шкала МоСА; оценка частоты нежелательных явлений (НЯ), серьезных нежелательных явлений (СНЯ) MoCA scale; assessment of the frequency of adverse events (AEs), serious adverse events (SAEs)	1. К концу терапии общий балл по шкале МоСА составил 26,4 ± 1,96 в основной группе и 25,0 ± 2,83 в контрольной группе ($p < 0,001$). К 31 дню разница между группами по среднему изменению общего балла составила 1,56 балла (95 % ДИ 1,015; 2,113; $p < 0,0001$) в пользу исследуемого препарата. 2. Цитофлавин продемонстрировал приемлемый профиль безопасности 1. By the end of therapy, the total MoCA score was 26.4 ± 1.96 in the main group and 25.0 ± 2.83 in the control group ($p < 0.001$). By day 31, the difference between groups in the mean change in total score was 1.56 points (95 % CI 1.015, 2.113; $p < 0.0001$) in favor of the study drug. 2. Cytoflavin demonstrated an acceptable safety profile	[17]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
2 категория 2 category								
5	Оценка эффективности комплексной терапии больных нейросифилисом, в которой специфическая противосифилитическая терапия была поддержана комбинированным нейропротектором – Цитофлавином® Evaluation of the effectiveness of complex therapy for patients with neurosyphilis, in which specific antisyphilitic therapy was supported by a combined neuroprotector - Cytoflavin®	Открытое сравнительное рандомизированное исследование Open comparative randomized trial	46 пациентов (26 мужчин; 20 женщин); возраст 25–67 лет 46 patients (26 men; 20 women); age 25–67 years	Нейросифилис Neurosyphilis	**Основная группа** – Цитофлавин® в/в инфузии 10 дней в дозе 10 мл на 100 мл 0,9 % раствора хлорида натрия; затем п/о прием по 2 таблетки 2 р/день на протяжении 25 дней. **Группа «активное плацебо»** – плацебо вводилось по схеме основной группы **Main group** – Cytoflavin® intravenous infusion for 10 days at a dose of 10 ml per 100 ml of 0.9 % sodium chloride solution; then p/o take 2 tablets 2 times a day for 25 days. **"Active placebo" group** – placebo was administered according to the scheme of the main group	Клинические данные в динамике наблюдения; дуплексное сканирование церебральных сосудов, МРТ, ЭНМ, нейропсихологическое тестирование Clinical data during observation; duplex scanning of cerebral vessels, MRI, ENM, neuropsychological testing	Динамика жалоб через 6 месяцев после начала терапии у больных основной группы статистически отличалась от группы 2 в отношении показателей: – головная боль (16,0 % против 33,3 % в группе плацебо, $p = 0,009$); – головокружение (8,0 % против 28,6 % в группе плацебо, $p = 0,032$); – снижение зрения (20,0 % против 28,6 % в группе плацебо, $p = 0,044$); – боль (8,0 % против 33,3 % в группе плацебо, $p = 0,044$), – симптомы неврастении (8,0% против 52,4 % в группе плацебо, $p = 0,004$); – вегетативное расстройство (12,0 % против 57,1 % в группе плацебо, $p = 0,012$) The dynamics of complaints 6 months after the start of therapy in patients of the main group were statistically different from group 2 in terms of indicators: – headache (16.0% versus 33.3 % in the placebo group, $p = 0.009$); – dizziness (8.0 % versus 28.6 % in the placebo group, $p = 0.032$); – decreased vision (20.0 % versus 28.6% in the placebo group, $p = 0.044$); – pain (8.0 % versus 33.3 % in the placebo group, $p = 0.044$), – symptoms of neurasthenia (8.0 % versus 52.4 % in the placebo group, $p = 0.004$); – autonomic disorder (12.0 % versus 57.1 % in the placebo group, $p = 0.012$)	[18]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
6	Оценка клинической эффективности интраоперационного применения Цитофлавина® в профилактике и коррекции нарушений когнитивных функций у хирургических пациентов с неотягощенным неврологическим и психосоматическим анамнезом Evaluation of the clinical effectiveness of intraoperative use of Cytoflavin® in the prevention and correction of cognitive impairment in surgical patients with an uncomplicated neurological and psychosomatic history	Проспективное клиническое контролируемое рандомизированное исследование Prospective clinical controlled randomized trial	60 пациентов (женщины); данных о возрасте нет 60 patients (women); no age information	Послеоперационная когнитивная дисфункция Postoperative cognitive dysfunction	**Основная группа** – за 30 мин до операции больным проводили инфузию 20,0 мл Цитофлавина®, разведенного в 200,0 мл 5 % глюкозы. **Контрольная группа** – плацебо вводилось по схеме основной группы **Main group** – 30 minutes before surgery, patients received an infusion of 20.0 ml of Cytoflavin® diluted in 200.0 ml of 5 % glucose. **Control group** – placebo was administered according to the scheme of the main group	Исследование слуховой памяти по Лурия, шкала MMSE, определение интегрального показателя общих умственных способностей по КОТ, таблицы Шульте Study of auditory-verbal memory according to Luria, MMSE scale, determination of the integral indicator of general mental abilities according to CAT, Schulte tables	Применение Цитофлавина® способствовало достоверному ↓ постнаркозной реабилитации в 1,3 раза; ↑ восстановлению исходного когнитивного статуса (результаты по шкале MMSE до операции: в контрольной группе – 28,31 балла, в основной – 27,93 балла; после операции: 27,8 и 28,4 балла соответственно); ↑ уровня концентрации и стойкости внимания The use of Cytoflavin® contributed to a significant ↓ post-anesthesia rehabilitation by 1.3 times; ↑ restoration of the initial cognitive status (results on the MMSE scale before surgery: in the control group - 28.31 points, in the main group - 27.93 points; after surgery: 27.8 and 28.4 points, respectively); ↑ level of concentration and attention span	[19]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
7	Оценка влияния Цитофлавина® на степень функционального восстановления пациентов при включении его в комплексную терапию в раннем и позднем восстановительных периодах ишемического инсульта Evaluation of the effect of Cytoflavin® on the degree of functional recovery of patients when included in complex therapy in the early and late recovery periods of ischemic stroke	Открытое сравнительное рандомизированное исследование Open comparative randomized trial	95 пациентов (мужчины и женщины); возраст 18–70 лет 95 patients (men and women); age 18–70 years	Ишемический инсульт Ischemic stroke	**Основная группа** – Цитофлавин® на фоне базисной терапии по схеме: 1–10 день – в/в по 10 мл на 200 мл 0,9 % раствора хлорида натрия 1 р/день, затем 25 дней п/о по 2 таблетки 2 р/день. **Контрольная группа** – только базисная терапия Main group – Cytoflavin® against the background of basic therapy according to the scheme: days 1–10 – iv 10 ml per 200 ml of 0.9 % sodium chloride solution 1 time per day, then 25 days po 2 tablets 2 rubles/day. **Control group** – basic therapy only	Оригинальная анкета для оценки клинических симптомов, шкала NIHSS и Рэнкина; Ноттингемская шкала; индекс Бартела Original Clinical Symptom Questionnaire, NIHSS and Rankin Scale; Nottingham scale; Barthel index	1. Отмечена позитивная динамика от терапии Цитофлавином®. Шкала NIHSS: основная группа: до лечения – 12,3 ± 6,3 балла, после лечения – 7,4 ± 3,2; у контроля: 11,9 ± 4,7 и 9,5±4,3 (p<0,05). 2. По шкале Бартела: 42,5 ±7,5 балла до лечения и 68,3 ± 6,2 балла после курса терапии в основной группе против 43,7 ± 4,5 и 52,8 ± 5,7 балла в контрольной группе ($p < 0,05$). 3. У пациентов основной группы после проведенной терапии наблюдались достоверно ↓ показатели времени центрального моторного проведения при исследовании верхних и нижних конечностей с помощью транскраниальной магнитной стимуляции, центрального времени проведения N9–N20 и латентных периодов N20 и N30 при исследовании верхних конечностей с помощью коротколатентных соматосенсорных вызванных потенциалов 1. Positive dynamics from Cytoflavin® therapy were noted. NIHSS scale: main group: before treatment – 12.3 ± 6.3 points, after treatment – 7.4 ± 3.2; in the control: 11.9±4.7 and 9.5 ± 4.3 ($p < 0.05$). 2. According to the Barthel scale: 42.5 ± 7.5 points before treatment and 68.3 ± 6.2 points after the course of therapy in the main group versus 43.7 ± 4.5 and 52.8 ± 5.7 points in the control group group ($p < 0.05$). 3. In patients of the main group after therapy, there were significantly ↓ indicators of central motor conduction time when studying the upper and lower extremities using transcranial magnetic stimulation, central conduction time N9–N20 and latent periods N20 and N30 when studying the upper extremities using short-latency somatosensory evoked potentials	[20]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
8	Оценка эффективности и безопасности применения препарата Цитофлавин® в комплексной терапии пациентов, перенесших среднетяжелую форму COVID-19, с развитием легких когнитивных расстройств в исходе патологии Evaluation of the effectiveness and safety of the use of the drug Cytoflavin® in complex therapy of patients who have suffered a moderate form of COVID-19 with the development of mild cognitive impairment as a result of the pathology	Открытое проспективное рандомизированное исследование Open-label, prospective, randomized study	54 пациента (30 мужчин и 24 женщины); возраст 40–60 лет 54 patients (30 men and 24 women); age 40–60 years	Среднетяжелая форма COVID-19 с развитием легких когнитивных расстройств в исходе патологии Moderate form of COVID-19 with the development of mild cognitive impairment as a result of pathology	**Основная группа** – Цитофлавин® в дозе 10 мл на 100 мл 0,9 % раствора натрия хлорида в/в капельно 10 дней. **Группа сравнения** – «активное плацебо» по схеме основной группы **Main group** – Cytoflavin® at a dose of 10 ml per 100 ml of 0.9 % sodium chloride solution intravenously for 10 days. **The comparison group** was "active placebo" according to the scheme of the main group	Шкалы MoCA; опросник SF-36 MoCA scales; SF-36 questionnaire	1. Через 10 дней терапии у пациентов основной группы исследования отмечено ↓ частоты жалоб на головные боли, головокружение и ↓ умственной работоспособности ($p < 0,05$). 2. В основной группе балл по шкале MoCA был на 7,1 % ($p < 0,05$) ↑, чем у группы сравнения. Достоверные результаты получены для показателей «регуляторные навыки», «зрительно-пространственные навыки», «внимание», «литеральные ассоциации», «повторение фразы». 3. По итогам исследования с применением опросника SF-36 (сравнение до терапии и через 10 дней) достоверные результаты получены в отношении ↑ показателей физического функционирования и общего состояния (в 1,3 и 1,2 раза соответственно) в группе Цитофлавина® 1. After 10 days of therapy, patients in the main study group showed ↓ frequency of complaints of headaches, dizziness and ↓ mental performance ($p < 0.05$). 2. In the main group, the MoCA score was 7.1 % ($p < 0.05$) ↑ than that of the comparison group. Reliable results were obtained for the indicators "regulatory skills", "visuospatial skills", "attention", "literal associations", "phrase repetition". 3. Based on the results of the study using the SF-36 questionnaire (comparison before therapy and after 10 days), reliable results were obtained in relation to ↑ indicators of physical functioning and general condition (1.3 and 1.2 times, respectively) in the Cytoflavin® group	[21]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
9	Оценка эффективности применения ступенчатой схемы приема Цитофлавина® в качестве энергокорректора, антиоксиданта и нейропротектора у больных в остром периоде ишемического инсульта в аспекте ее сопряженности с динамикой очаговой неврологической симптоматики, морфологических изменений мозга, свободнорадикальных и других клинико-лабораторных показателей, а также функционального исхода заболевания Evaluation of the effectiveness of using a stepwise regimen of Cytoflavin® as an energy corrector, antioxidant and neuroprotector in patients in the acute period of ischemic stroke in terms of its association with the dynamics of focal neurological symptoms, morphological changes in the brain, free radical and other clinical and laboratory parameters, as well as the functional outcome of the disease	Рандомизированное сравнительное проспективное клинико-инструментальное исследование Randomized comparative prospective clinical and instrumental study	30 пациентов (нет данных о половой принадлежности); возраст 44–75 лет 30 patients (no data on gender); age 44–75 years	Ишемический инсульт Ischemic stroke	**1 (основная) группа** – Цитофлавин® на фоне базисной терапии по схеме: 1–10 сутки – по 20 мл/сут в/в капельно на 400 мл 5–10 % раствора глюкозы или физраствора; далее 11–35 сутки – по 2 таблетки 2 р/сут. **2 группа (сравнения)** – только базисная терапия **1 (main) group** – Cytoflavin® against the background of basic therapy according to the scheme: days 1–10 – 20 ml/day intravenously in 400 ml of 5–10% glucose solution or saline; further 11–35 days – 2 tablets 2 times a day. **Group 2 (comparison)** – basic therapy only	Общий и неврологический осмотр; МРТ головного мозга; исследование оксидантного стресса; ЭКГ; шкала комы Глазго и NIH-NIHSS; индекс Бартела; модифицированная шкала Рэнкина; шкала MMSE General and neurological examination; MRI of the brain; oxidative stress research; ECG; Glasgow Coma Scale and NIH-NIHSS; Barthel index; modified Rankin scale; MMSE scale	1. К 21 суткам отмечено статистически значимое уменьшение объема ишемии ($p < 0,05$) по сравнению с группой 2. 2. К 35 суткам по шкале комы Глазго более ↑ регресс сознания и неврологической недостаточности (шкала NIH) в основной группе ($p < 0,05$) по сравнению с группой 2. 3. На 35 сутки наблюдалось улучшение ментально-психических функций при исследовании по шкале MMSE в основной группе – 24,5 ± 3,5 балла и в контрольной – 17,4 ± 8,7 ($p < 0,05$). 4. Снижение инвалидизации на 23,2 % (21 сутки). На 35 сутки у 43,8 % пациентов регистрировали 100 баллов по индексу Бартела 1. By day 21, a statistically significant decrease in the volume of ischemia was noted ($p < 0.05$) compared to group 2. 2. By day 35, according to the Glasgow Coma Scale, there was more ↑ regression of consciousness and neurological impairment (NIH scale) in the main group ($p < 0.05$) compared to group 2. 3. On day 35, there was an improvement in mental and psychological functions when examined on the MMSE scale in the main group – 24.5 ± 3.5 points and in the control group – 17.4 ± 8.7 ($p < 0.05$). 4. Reduction in disability by 23.2 % (21 days). On day 35, 43.8 % of patients recorded 100 points on the Barthel index	[22]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
10	Оценка частоты нарушения когнитивных функций у детей от 3 до 7 лет после перенесенной интраоперационной комбинированной сбалансированной анестезии и возможность их профилактики препаратом Цитофлавин® Assessment of the frequency of cognitive impairment in children aged 3 to 7 years after undergoing intraoperative combined balanced anesthesia and the possibility of their prevention with the drug Cytoflavin®	Проспективное рандомизированное исследование Prospective randomized study	85 пациентов; возраст 3–7 лет 85 patients; age 3–7 years	Послеоперационная когнитивная дисфункция Postoperative cognitive dysfunction	**Основная группа** – пациенты получали однократную инфузию Цитофлавина® интраоперационно (режим дозирования не описан). **Контрольная группа** – хирургическое вмешательство проводилось без введения Цитофлавина® **The main group** – patients received a single infusion of Cytoflavin® intraoperatively (dosage regimen not described). **Control group** – surgery was performed without the administration of Cytoflavin®	Тестирование с использованием матриц Равена; корректурные пробы; шкала MMSE; тесты на на механический и ассоциативный компоненты памяти Testing using Raven matrices; proofreading tests; MMSE scale; tests on mechanical and associative memory components	1. В исследовании наблюдалось снижение следующих показателей через 1 сутки после операции по сравнению с исходным уровнем: – **снижение внимания** у 7,1 % пациентов по результатам 3 тестов; – **снижение памяти** на 20 % по 2 тестам у 6% детей. 2. Через месяц практически у всех детей проявления когнитивных нарушений нивелировались. Статистически значимых отличий между группами пациентов не было, что может быть связано с размерами выборок 1. The study observed a decrease in the following indicators 1 day after surgery compared to the baseline: – **decreased attention** in 7.1 % of patients according to the results of 3 tests; – **memory decline** by 20 % on 2 tests in 6% of children. 2. After a month, in almost all children, the manifestations of cognitive impairment were leveled out. There were no statistically significant differences between the patient groups, which may be due to sample sizes	[23]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
11	Оценка эффективности и безопасности применения препарата Цитофлавин® у пациентов с астеническим синдромом после перенесенной COVID-19-ассоциированной пневмонией Evaluation of the effectiveness and safety of the drug Cytoflavin® in patients with asthenic syndrome after COVID-19-associated pneumonia	Проспективное рандомизированное исследование Prospective randomized study	40 пациентов (15 мужчин и 25 женщин); возраст 35–68 лет 40 patients (15 men and 25 women); age 35–68 years	Астенический синдром Asthenic syndrome	**Основная группа** – стандартное лечение, направленное на устранение остаточных симптомов COVID-19-ассоциированной пневмонии, с Цитофлавином® по схеме: 1–10 день – в/в капельно по 20 мг/сут в разведении на 200 мл 5 % р-ра глюкозы; затем п/о форма по 2 таблетки 2 р/день 25 дней. **Контрольная группа** получала только стандартную терапию **The main group** is standard treatment aimed at eliminating residual symptoms of COVID-19-associated pneumonia, with Cytoflavin® according to the following scheme: days 1–10 – IV drip of 20 mg/day diluted in 200 ml of 5 % glucose solution; then p/o form, 2 tablets 2 times a day for 25 days. **The control group** received only standard therapy	Шкала ШАС; шкала MFI-20; шкала MMSE, тест «10 слов» Лурия, тест «Таблицы Шульте», шкала HADS, опросник качества жизни EQ-5 D и питтсбургский опросник SHAS scale; MFI-20 scale; MMSE scale, Luria 10 Word Test, Schulte Table test, HADS scale, EQ-5 D quality of life questionnaire and Pittsburgh questionnaire	В исследовании у основной группы по сравнению с контрольной наблюдалось: ↓ **выраженности астении** в 2,57 раза по шкале ШАС и 2,2 раза по MFI-20 ($p < 0,05$); **улучшение основных когнитивных функций** в 1,12 раза (по шкале MMSE); **повышение объема краткосрочной** (на 15 %, $p < 0,05$) и долгосрочной (на 25 %, $p < 0,05$) памяти по тесту Лурия; ↑ в 1,35 раза **скорости сенсомоторных реакций** по таблицам Шульте ($p < 0,05$); ↓ **выраженности тревожности** в 4,5 раза и депрессии в 4,8 раза, $p < 0,05$ (по шкале HADS); ↑ **качества жизни** по шкале EQ-5D в 1,5 раза и сна – в 3,85 раза по шкале PSQI ($p < 0,05$) In the study, in the main group compared to the control group, the following was observed: ↓ **the severity of asthenia** is 2.57 times according to the ShAS scale and 2.2 times according to MFI-20 ($p < 0.05$); **improvement in basic cognitive functions** by 1.12 times (on the MMSE scale); **increase in the volume of short-term** (by 15 %, $p < 0.05$) and long-term (by 25 %, $p < 0.05$) memory according to the Luria test; ↑ 1.35 times **the speed of sensorimotor reactions according** to Schulte tables ($p < 0.05$); ↓ **severity of anxiety** by 4.5 times and depression by 4.8 times, $p < 0.05$ (according to the HADS scale); ↑ **quality of life** on the EQ-5D scale by 1.5 times and sleep by 3.85 times on the PSQI scale ($p < 0.05$)	[24]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
3 категория 3 category								
12	Анализ эффективности применения антиоксиданта Цитофлавина® в качестве метаболического нейропротектора при проведении аортокоронарного шунтирования (АКШ) и операций протезирования сердечных клапанов в системе мер по пред- и послеоперационной защите головного мозга Analysis of the effectiveness of the use of the antioxidant Cytoflavin® as a metabolic neuroprotector during coronary artery bypass grafting (CABG) and heart valve replacement operations in a system of measures for pre- and postoperative brain protection	Проспективное контролируемое безвыборочное исследование Prospective, controlled, unselected study	103 пациента (94 мужчины и 9 женщин); возраст: 1-я группа – средний возраст 55,7 ± 7,9 года; 2-я группа – 48,2 ± 12,6 года; 3-я – 53,1 ± 8,4 года; 4-я – 48,2 ± 12,6 года 103 patients (94 men and 9 women); age: group 1 – average age 55.7 ± 7.9 years; Group 2 – 48.2 ± 12.6 years; 3rd – 53.1 ± 8.4 years; 4th – 48.2 ± 12.6 years	ИБС и приобретенные пороки сердца IHD and acquired heart defects	**1 группа (ИБС)** – Цитофлавин® за 3 суток до операции и в течение 3 дней после в дозировке 20 мл на 200 мл физраствора. **2 группа (ИБС)** – Цитофлавин® не вводился. **3 группа (протезирование клапанов)** – Цитофлавин® вводили по аналогичной 1 группе схеме. **4 группа (протезирование клапанов)** – Цитофлавин® не вводился **Group 1 (IHD)** – Cytoflavin® 3 days before surgery and for 3 days after at a dosage of 20 ml per 200 ml of saline solution. **Group 2 (IHD)** – Cytoflavin® was not administered. **Group 3 (valve replacement)** – Cytoflavin® was administered according to a scheme similar to Group 1. **Group 4 (valve replacement)** – Cytoflavin® was not administered	Исследование когнитивных вызванных потенциалов P300; нейропсихологическое тестирование (шкала Ж. М. Глозман; анализ по А. Лурия) Study of cognitive evoked potentials P300; neuropsychological testing (Zh. M. Glozman scale; analysis according to A. Luria)	1. Через месяц при исследовании когнитивных вызванных потенциалов P300 после операции по сравнению с исходным уровнем у 1 группы отмечалось ↓ латентности пика P300 с 356 мс до 342 мс с ↑ амплитуды с 5,9 мкВ до 6,7 мкВ. У 2 группы показатели не изменились. Результаты не являлись достоверными, причиной мог послужить маленький размер выборки. В группах 3 и 4 также не было статистически значимых результатов, что может быть связано с низким числом повторений исследований вследствие наличия иногородних пациентов. 2. Через месяц в нейропсихологическом исследовании были получены достоверные результаты в отношении показателей динамической составляющей психической деятельности, оперативной памяти и долговременной памяти (у 1 группы по сравнению со 2) ($p < 0,05$). Позитивная динамика наблюдалась у 3 группы по сравнению с 4 1. A month later, when studying cognitive evoked potentials P300 after surgery, compared with the baseline, group 1 showed ↓ latency of the P300 peak from 356 ms to 342 ms with ↑ amplitude from 5.9 μV to 6.7 μV. In group 2, the indicators did not change. The results were not reliable, which may have been due to the small sample size. There were also no statistically significant results in groups 3 and 4, which may be due to the low number of study repetitions due to the presence of out-of-town patients. 2. A month later, in a neuropsychological study, reliable results were obtained regarding indicators of the dynamic component of mental activity, operative memory and long-term memory (in group 1 compared to group 2) ($p < 0.05$). Positive dynamics were observed in group 3 compared to group 4	[25]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
13	Сравнительный анализ возможностей стандартного анестезиологического пособия и комбинации с популярными цитопротекторами – мексидолом, актовегином и Цитофлавином® Comparative analysis of the capabilities of standard anesthesia and combination with popular cytoprotectors – Mexidol, Actovegin and Cytoflavin®	Открытое простое проспективное исследование Open-label, single-arm prospective study	153 пациента (нет данных о половой принадлежности и возрасте) 153 patients (no data on gender and age)	Стенозы / окклюзии экстрацеребральных артерий с различными проявлениями сосудисто-мозговой недостаточности после каротидной эндартерэктомии без использования внутреннего шунта Stenosis/occlusion of extracerebral arteries with various manifestations of cerebrovascular insufficiency after carotid endarterectomy without the use of an internal shunt	**1 группа (контрольная)** – пациентам назначали стандартную терапию для профилактики интраоперационных ишемических расстройств (барбитураты 1 г). **2 группа** – вводили мексидол. **3 группа** – вводили актовегин. **4 группа** – вводили Цитофлавин®. Данные о дозах препаратов и длительности терапии отсутствуют. **Group 1 (control)** – patients were prescribed standard therapy for the prevention of intraoperative ischemic disorders (barbiturates 1 g). **Group 2** – Mexidol was administered. **Group 3** – Actovegin was administered. **Group 4** – Cytoflavin® was administered. Data on drug doses and duration of therapy are not available	Шкала MMSE; батарея лобной дисфункции; шкала общего ухудшения (Global Deterioration Rating); индекс Бартела MMSE scale; Frontal Dysfunction Battery; Global Deterioration Rating scale; Barthel index	В группе Цитофлавина® достоверные результаты терапии наблюдались через 24 ч после операции по сравнению с группами актовегина и мексидола: 1. В группе Цитофлавина® средний балл по шкале MMSE составил 24 против 22 и 29 в группах мексидола и актовегина соответственно ($\varphi 0.05 > 1,64$). 2. В исследовании «батарея лобной дисфункции» в группе Цитофлавина® средний балл составил 31 ($\varphi 0.05 > 1,64$), у мексидола – 33; у актовегина – 42. По итогам исследования авторы отмечали улучшение неврологических показателей во всех группах нейропротекторов In the Cytoflavin® group, significant results of therapy were observed 24 hours after surgery compared with the Actovegin and Mexidol groups: 1. In the Cytoflavin® group, the average MMSE score was 24 versus 22 and 29 in the Mexidol and Actovegin groups, respectively ($\varphi 0.05 > 1.64$). 2. In the "frontal dysfunction battery" study, the average score in the Cytoflavin® group was 31 ($\varphi 0.05 > 1.64$), in Mexidol – 33; Actovegin has 42. Based on the results of the study, the authors noted an improvement in neurological parameters in all groups of neuroprotectors	[26]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
14	Оценка возможности нейропротективной терапии при ишемии – реперфузии головного мозга во время операций на сонных артериях с использованием актовегина и Цитофлавина® Evaluation of the possibility of neuroprotective therapy for cerebral ischemia-reperfusion during operations on the carotid arteries using Actovegin and Cytoflavin®	Открытое сравнительное исследование Open comparative study	143 пациента (данные о половой принадлежности отсутствуют); средний возраст в 1-й группе – 62,37 ± 3,45 года, во 2-й – 63,17 ± 4,71 года, в 3-й – 61,54 ± 3,74 года ($p > 0,05$) 143 patients (no data on gender); the average age in the 1st group was 62.37 ± 3.45 years, in the 2nd group – 63.17 ± 4.71 years, in the 3rd group – 61.54 ± 3.74 years ($p > 0.05$)	Атеросклеротический стеноз. Проведена каротидная эндартерэктомия без использования внутреннего шунта Atherosclerotic stenosis. Carotid endarterectomy was performed without the use of an internal shunt	**1 группа** – стандартная терапия (краниальная гипотермия, барбитураты, медикаментозная артериальная гипертензия). **2 группа** – дополнительно вводили актовегин 1000 мг (инфузия после пережатия сосуда). **3 группа** – Цитофлавин® в объеме 10 мл вводился по схеме аналогично 2-й группе **Group 1** – standard therapy (cranial hypothermia, barbiturates, drug-induced arterial hypertension). **Group 2** – Actovegin 1000 mg was additionally administered (infusion after clamping the vessel). **Group 3** – Cytoflavin® in volume of 10 ml was administered according to the scheme similar to the 2nd group	Европейская шкала инсульта; шкала MMSE European Stroke Scale; MMSE scale	1. При изучении динамики неврологического дефицита отмечено отсутствие отрицательной тенденции в группах 2 и 3. 2. В исследовании с использованием шкалы MMSE на 1 сутки после операции в группе 3 средний балл составил 18,1 ± 3,21 против 17,4 ± 3,27 и 15,5 ± 3,32 в группе 2 и 1 соответственно. На 7 сутки: 20,1 ± 2,44 (группа 3); 19,2 ± 3,56 (группа 2); 17,4 ± 3,71 (группа 1). 3. В исследовании с использованием европейской шкалы инсульта баллы в группах были следующие: в 3 группе – от 70,1 ± 6,1 до 72,1 ± 6,4; во 2 группе – от 69,4 ± 5,2 до 71,3 ± 5,6; в 1 группе – от 65,3 ± 7,2 до 70,1 ± 7,4 на 1 и 7 сутки после операции соответственно. 4. Авторами отмечена наибольшая нейропротекторная эффективность Цитофлавина®. У актовегина наблюдалось умеренное действие 1. When studying the dynamics of neurological deficit, the absence of a negative trend in groups 2 and 3 was noted. 2. In a study using the MMSE scale on day 1 after surgery in group 3, the average score was 18.1 ± 3.21 versus 17.4 ± 3.27 and 15.5 ± 3.32 in groups 2 and 1, respectively. On day 7: 20.1 ± 2.44 (group 3); 19.2 ± 3.56 (group 2); 17.4 ± 3.71 (group 1). 3. In a study using the European Stroke Scale, the scores in the groups were as follows: in group 3 – from 70.1 ± 6.1 to 72.1 ± 6.4; in group 2 – from 69.4 ± 5.2 to 71.3 ± 5.6; in group 1 – from 65.3 ± 7.2 to 70.1 ± 7.4 on days 1 and 7 after surgery, respectively. 4. The authors noted the greatest neuroprotective effectiveness of Cytoflavin®. Actovegin had a moderate effect	[27]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
15	Оценка влияния включения в схему терапии препарата Цитофлавин® на динамику показателей АИИ различной этиологии у детей Evaluation of the impact of inclusion of the drug Cytoflavin® in the treatment regimen on the dynamics of AIS indicators of various etiologies in children	Открытое сравнительное исследование Open comparative study	47 (29 мальчиков и 18 девочек); возраст 3–17 лет 47 (29 boys and 18 girls); age 3–17 years	Острый артериальный ишемический инсульт (АИИ) Acute arterial ischemic stroke (AIS)	**Основная группа** – базисная терапия с Цитофлавином по схеме: в/в капельно по 5 мл на 10 мл физраствора в течение 10 дней. Через 2,6 месяца и 1 год пациенты дополнительно получали Цитофлавин® п/о по схеме 2 р/день 25 дней. **Контрольная группа** – только базисная терапия **The main group** is basic therapy with Cytoflavin according to the scheme: 5 ml IV drip per 10 ml saline solution for 10 days. After 2.6 months and 1 year, patients additionally received Cytoflavin® p/o according to the regimen 2 times a day for 25 days. **Control group** – basic therapy only	Шкала pedNIHSS; шкала PSOM-SNE; шкала NHS3; шкала комы Глазго pedNIHSS scale; PSOM-SNE NHS3 scale; Glasgow Coma Scale	1. При выписке в основной группе наблюдалось ↓ баллов с 13,9 ± 4,3 до 10,1 ± 4,1, а в контрольной – с 13,5 ± 3,8 до 10,7 ± 3,7 ($p < 0,05$) по шкале pedNIHSS. 2. В исследовании с использованием шкалы PSOM-SNE были получены следующие результаты: в группе Цитофлавина® при выписке средний балл составлял 1,9 по сравнению с 2,5 баллами в контрольной группе. 3. Нежелательных лекарственных реакций не было отмечено. 4. В группе Цитофлавина® отмечено положительное влияние на гемодинамику 1. At discharge in the main group there was a ↓ score from 13.9 ± 4.3 to 10.1 ± 4.1, and in the control group – from 13.5 ± 3.8 to 10.7 ± 3.7 ($p < 0.05$) according to the pedNIHSS scale. 2. In a study using the PSOM-SNE scale, the following results were obtained: in the Cytoflavin® group at discharge the mean score was 1.9 compared to 2.5 points in the control group. 3. No adverse drug reactions were noted. 4. In the Cytoflavin® group, a positive effect on hemodynamics was noted	[28]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
16	Оценить эффективность применения Цитофлавина® в дозе 10 мл/сут в рамках комплексной медикаментозной терапии больных в остром периоде геморрагического инсульта To evaluate the effectiveness of using Cytoflavin® at a dose of 10 ml/day as part of complex drug therapy for patients in the acute period of hemorrhagic stroke	Открытое сравнительное исследование Open comparative study	60 пациентов (29 женщин и 31 мужчина); возраст 45–85 лет 60 patients (29 women and 31 men); age 45–85 years	Острый период геморрагического инсульта Acute period of hemorrhagic stroke	**Основная группа** – стандартная терапия с Цитофлавином® по схеме 10,0 в/в капельно 1 р/сут в течение 10 суток. **Группа сравнения** – только стандартная терапия **The main group** is standard therapy with Cytoflavin® according to the regimen of 10.0 IV drips 1 time per day for 10 days. **Comparison group** – standard therapy only	Шкала NIHSS, индекс Ривермид, шкала Рэнкина; индекс Бартеля NIHSS scale, Rivermead index, Rankin scale; Barthel index	1. При оценке динамики выраженности неврологического дефицита по шкале NIHSS на 11–16 сутки балл в группе Цитофлавина® составил 6,4±0,1 против 7,7 ± 0,2 в группе сравнения ($p < 0,05$). 2. На 11–16 сутки при изучении индекса мобильности средний балл в группе Цитофлавина® составлял 7,7 ± 0,1, а в группе сравнения – 5,7 ± 0,1 ($p < 0,05$). 3. В исследовании по шкале Рэнкина наблюдалось ↓ среднего балла в обеих группах. 4. По шкале Бартеля было отмечено на 11–16 сутки в группе сравнения 50,2 ± 0,2 и в основной группе 56,5± 0,1 ($p < 0,05$) 1. When assessing the dynamics of the severity of neurological deficit on the NIHSS scale on days 11–16, the score in the Cytoflavin® group was 6.4 ± 0.1 versus 7.7 ± 0.2 in the comparison group ($p < 0.05$). 2. On days 11–16, when studying the mobility index, the average score in the Cytoflavin® group was 7.7 ± 0.1, and in the comparison group – 5.7 ± 0.1 ($p < 0.05$). 3. In the study, the Rankin Scale score was ↓ in both groups. 4. According to the Barthel scale, on days 11–16 it was 50.2 ± 0.2 in the comparison group and 56.5±0.1 in the main group ($p < 0.05$)	[29]

Продолжение таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
17	Оценка эффективности комплексной терапии больных с легким когнитивным расстройством в исходе среднетяжелых форм инфекции, вызванной SARS-CoV-2, с использованием Цитофлавина® Evaluation of the effectiveness of complex therapy of patients with mild cognitive impairment in the outcome of moderate forms of infection caused by SARS-CoV-2 using Cytoflavin®	Открытое сравнительное исследование Open comparative study	50 (28 мужчин и 22 женщин); возраст 40–60 лет 50 (28 men and 22 women); age 40–60 years	Когнитивные расстройства Cognitive disorders	**1 группа** – Цитофлавин® в/в 10 дней в дозе 10 мл на 100 мл 0,9 % раствора натрия хлорида 10 дней. **2 группа (сравнения)** – вводили «активное плацебо» по схеме 1 группы **Group 1** – Cytoflavin® IV 10 days at a dose of 10 ml per 100 ml of 0.9 % sodium chloride solution for 10 days. **Group 2 (comparisons)** – "active placebo" was administered according to the scheme of group 1	Шкала МоСА; опросник SF-36 MoCA scale; SF-36 questionnaire	1. По сравнению с активным плацебо применение Цитофлавина ↓ число жалоб на головокружение, головную боль, снижение умственной работоспособности в среднем на 32 % ($p \le 0,05$). 2. В исследовании по шкале МоСА наблюдалось ↑ большинства когнитивных функций в среднем на 20,3 % ($p \le 0,05$). 3. По результатам опросника SF-36: ↑ качество жизни за счет физического функционирования и физического состояния, интенсивности боли, общего состояния, жизненной активности, показателей психического здоровья в среднем на 19,5 % ($p \le 0,05$). 4. Нежелательных лекарственных реакций при применении Цитофлавина® не было отмечено. 1. Compared with active placebo, the use of Cytoflavin ↓ the number of complaints of dizziness, headache, and decreased mental performance by an average of 32 % ($p \le 0.05$). 2. In the study, the MoCA scale showed ↑ of most cognitive functions by an average of 20.3 % ($p \le 0.05$). 3. According to the results of the SF-36 questionnaire: ↑ quality of life due to physical functioning and physical condition, pain intensity, general condition, vital activity, mental health indicators by an average of 19.5 % ($p \le 0.05$). 4. No adverse drug reactions were observed when using Cytoflavin®.	[30]

Окончание таблицы 1

№	Цель исследования Purpose of the study	Дизайн исследования Study design	Пациенты Patients	Патология Pathology	Вмешательство Intervention	Методы оценки эффективности/безопасности Methods for assessing efficacy/safety	Результаты Results	Литература References
18	Эффективность применения Цитофлавина® в первые часы ОЦВИ (ОНМК, транзиторные ишемические атаки либо «инсультоподобные» декомпенсации ЦВБ при различной степени тяжести состояния пациентов) The effectiveness of the use of Cytoflavin® in the first hours of CVVI (stroke, transient ischemic attacks or "stroke-like" decompensation of CVB with varying degrees of severity of the patient's condition)	Открытое сравнительное исследование Open comparative study	99 (74 женщины и 25 мужчин); данные по возрасту приведены не в полном объеме 99 (74 women and 25 men); Age data is not provided in full	Ишемические ческий инсульт / транзиторная атака / ишемическая декомпенсация ЦВБ на фоне энцефалопатии Ischemic stroke / transient ischemic attack / decompensation of CVB due to encephalopathy	**Основная группа** – Цитофлавин® по схеме на фоне базисной терапии: в/в вводили 45–60 мин 10 мл препарата в 250 мл 5%-го раствора глюкозы или 0,9%-го раствора натрия хлорида курсом 10 дней. **Контрольная группа** – получала только базисную терапию **The main group** - Cytoflavin® according to the scheme against the background of basic therapy: 10 ml of the drug was administered intravenously for 45–60 min in 250 ml of a 5% glucose solution or 0.9% sodium chloride solution for a course of 10 days. **The control group** received only basic therapy	Показатель летальности и отклика на терапию соматических «витальных» функций; перемен в уровне депрессии сознания; динамики неврологической очаговой и общемозговой симптоматики Mortality rate and response to therapy of somatic "vital" functions; changes in the level of depression of consciousness; dynamics of neurological focal and cerebral symptoms	Назначение Цитофлавина® снижало смертность на 13,5 % по сравнению с контрольной группой. Введение препарата у пациентов с угнетением сознания от сопора до оглушения оказывало «пробуждающий эффект». У пациентов группы Цитофлавина® отмечалось снижение жалоб на головную боль, тошноту и несистемное головокружение. Нежелательные лекарственные реакции проявились у 6,1 % пациентов в виде кожных реакций, диспепсических расстройств, артериальной гипертензии Administration of Cytoflavin® reduced mortality by 13.5 % compared to the control group. Administration of the drug to patients with depression of consciousness from stupor to stupor had an "awakening effect." Patients in the Cytoflavin® group showed a decrease in complaints of headache, nausea and non-systemic dizziness. Adverse drug reactions occurred in 6.1 % of patients in the form of skin reactions, dyspeptic disorders, arterial hypertension	[31]

С целью оценки влияния Цитофлавина® на динамику и исход инсульта в исследованиях использовались шкалы NIHSS ($n = 4$), pedNIHSS ($n = 1$), ESS ($n = 1$), Рэнкина ($n = 2$). Шкала NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) представляет собой тестирование, направленное на анализ основных функций, которые нарушаются вследствие церебрального поражения [33]. При сумме баллов ≤10 прогноз считается благоприятным, при сумме баллов >20 – неблагоприятным. В 4 исследованиях, вошедших в систематический обзор, была проведена оценка неврологического статуса по шкале NIHSS после инсульта. Во всех группах, где вводился Цитофлавин®, были достигнуты референсные значения. А. И. Федин и соавторы отмечали статистически значимое улучшение показателя у пациентов в группе с введением Цитофлавина® в 1,4 раза и в группе контроля в 1,3 раза к 120 дню ($p < 0,05$) [14]. В публикации Е. В. Екушевой на 35 день терапии результаты в группе, получавшей Цитофлавин®, снизились в 1,7 раза ($p < 0,05$), у контрольной группы – в 1,3 раза [20]. С. А. Румянцева и соавторы отмечали также достоверное снижение неврологической симптоматики на 35 сутки терапии в среднем на 7,5 баллов в группе с введением Цитофлавина® и на 6,3 балла в контроле ($p < 0,05$) [22]. В исследовании И. Э. Сазонова по шкале NIHSS на 11–16 сутки балл в группе нейропротекторной терапии снизился на 3,3 и на 2,5 – в группе сравнения ($p < 0,05$) [29].

Шкала PedNIHSS (Pediatric NIH Stroke Scale) используется для оценки тяжести инсульта у детей. Чем больше баллов набирает пациент в тестировании, тем более тяжелым считается перенесенный инсульт [34]. В исследовании Я. Н. Маджидовой и соавторов у пациентов с ишемическим инсультом, получавших Цитофлавин®, на момент выписки наблюдалось снижение неврологического дефицита с 13,9 ± 4,3 до 10,1 ± 4,1 баллов, в контрольной – с 13,5 ± 3,8 до 10,7 ± 3,7 баллов ($p < 0,05$) [28].

Европейская шкала инсульта (ESS, European Stroke Scale) применяется для пациентов с инсультом, локализованным в бассейне среднемозговой артерии, с целью оценки эффективности проводимой терапии [35]. В исследовании Э. А. Пономарева и соавторов в группе, получавшей Цитофлавин®, баллы в 1 сутки после операции составили 70,1 ± 6,1, на 7 сутки – 72,1 ± 6,4, в контрольной группе – 65,3 ± 7,2 и 70,1 ± 7,4 соответственно. Авторами отмечен высокий терапевтический потенциал препарата [27].

Шкала Рэнкина используется для оценки исходов пациентов, перенесших инсульт. При отсутствии симптомов выставляется 0 баллов, при тяжелом нарушении – 5 [36]. В исследовании И. Э. Сазонова и соавторов у пациентов с геморрагическим инсультом до терапии в обеих группах средний балл составлял 5,0. На 11–16 сутки в группах с введением Цитофлавина® и контроля были получены достоверные данные 2,9 ± 0,1 и 3,1 ± 0,2 ($p < 0,05$) [29].

Шкала TSS (Total Symptoms Score) была использована в публикации Т. Харитоновой и соавторов для оценки выраженности симптомов нейропатии по 4 составляющим – боль, жжение, онемение, парестезии – у пациентов с сахарным диабетом. Минимальный балл – 0 выставляется при полном отсутствии симптомов. Максимальный балл – 14,64 устанавливается, когда все симптомы максимально выражены [37]. Применение Цитофлавина® достоверно снижало выраженность парестезий ($p = 0,004$) и онемения ($p = 0,003$), а также интенсивность жгучей боли при длительном приеме ($p < 0,01$). В процессе исследования было отмечено, что препарат не влияет на стреляющую боль [16].

При оценке мобильности пациентов с геморрагическим инсультом И. Э. Сазонов и соавторы использовали шкалу Ривермид [29]. Этот опросник состоит из 15 пунктов, каждый из которых оценивается в 1 балл. При значении 0 баллов пациент полностью не способен передвигается самостоятельно, а при 15 может пробежать до 10 метров [38]. В исследовании у пациентов с геморрагическим инсультом в 1 сутки после терапии средний балл в группе, получавшей Цитофлавин®, был равен 1,1 ± 0,1, в группе контроля – 1,0 ± 0,1, а на 11–16 сутки – 7,7 ± 0,1 и 5,7 ± 0,1 соответственно ($p < 0,05$).

С целью анализа сенсорного дефицита была применена модифицированная Ноттингемская шкала, учитывающая нарушения тактильной чувствительности, стереогноза и кинестезии [39]. В публикации Е. В. Екушевой у пациентов с ишемическим инсультом в группе с введением Цитофлавина® после терапии снизился уровень пареза на обеих сторонах тела, спастичности и гемипареза по сравнению с пациентами контрольной группы. На 35 день терапии отмечалось достоверное улучшение статолокомоторных и постуральных функций по сравнению с пациентами контрольной группы [20].

Специфическая шкала Куртцке (EDSS, Expanded Disability Status Scale) используется для оценки неврологических нарушений при рассеянном склерозе. Балльная шкала предполагает оценивание результатов от 0 до 7, где 0 баллов выставляется при полной независимости пациента от помощи окружающих, 7 и более баллов устанавливается при глубокой степени инвалидизации [40]. В исследовании Г. Н. Бисаги и соавторов у 88,3 % пациентов с рассеянным склерозом отмечался частичный регресс симптомов рассеянного склероза и снижение степени тяжести по шкале EDSS на фоне приема Цитофлавина®. В группах без нейропротекторной терапии изменений не наблюдалось [15].

Шкала NIS-LL (Neuropathy Impairment Score in the Lower Limbs) – шкала, количественно оценивающая неврологические нарушения при диабетической полинейропатии [41]. В публикации Т. Харитоновой и соавторов в группе, получавшей Цитофлавин®, практически не отмечали снижение сухожильных рефлексов в ногах, уменьшение мышечной силы, нарушение чувствительности различных модальностей [16].

Оценка влияния нейропротекторной терапии Цитофлавином® на когнитивную функцию проводилась по шкалам MMSE ($n = 8$), MoCA ($n = 3$), матрице Равена ($n = 1$) и исследованию вызванных потенциалов P300 ($n = 1$).

MMSE (Mini-mental State Examination) представляет собой бумажное тестирование с максимальным баллом 30, при этом более низкие баллы указывают на более серьезные когнитивные нарушения. Как правило, «нормальная» когнитивная функция определяется на уровне 24 баллов и выше [42]. В исследованиях, вошедших в обзор, средний балл в группе контроля составлял 21,4 до лечения, 22,7 – после. В группе, получавшей Цитофлавин®, – 21,9 и 25,4 балла соответственно. Стоит отметить исходно более низкие баллы в исследованиях у пациентов с ишемическим инсультом, что обусловлено более тяжелым поражением головного мозга по сравнению с другими патологиями, вошедшими в обзор [14, 22]. При анализе публикаций существенным недостатком являлся разброс времени проведения тестирования. Так, в 2 исследованиях тест по шкале MMSE проводился на 35 сутки лечения, в остальных случаях диапазон составлял от 1 суток до 6 месяцев. В публикации Л. С. Золоторевой и соавторов у пациентов с когнитивными нарушениями в послеоперационном периоде не было получено статистических различий между показателями до и после операции в группе с введением Цитофлавина®, однако прослеживалась тенденция к увеличению значений ($p = 0,051$). В контрольной группе наблюдалась схожая ситуация [23]. По мнению авторов, отсутствие достоверных результатов может быть обусловлено низкой чувствительностью шкалы MMSE на выборке исследования. В остальных 7 публикациях Цитофлавин® значимо увеличивал показатель, в среднем на 3,5 балла, по сравнению с исходными значениями до терапии против 1,7 балла в контрольной группе [14, 19, 22–24, 26, 27]. В 4 публикациях авторы отмечали улучшение по показателям внимания и памяти в группах терапии Цитофлавином® [14, 19, 22, 23].

Когнитивный тест (MoCA, Montreal Cognitive Assessment) – 10-минутное тестирование, обладающее высокой чувствительностью и специфичностью, для обнаружения легкой когнитивной дисфункции [43]. В настоящее время MoCA используют для лиц, у которых в тесте по шкале MMSE не было выявлено отклонений и балл составил более 24. Максимальный балл в тестировании MoCA составляет 30, норма устанавливается при 26 баллах и выше. Во всех 3 публикациях, вошедших в обзор, были получены достоверные результаты в исследуемых группах пациентов [17, 21, 30]. А. Л. Коваленко и соавторы проводили терапию послеоперационных когнитивных нарушений [17]. Статистически значимые результаты были получены на 31 день терапии: $25,0 \pm 2,83$ (контроль) и $26,4 \pm 1,96$ (основная группа) ($p < 0,001$). К 91 дню сохранялась динамика к увеличению баллов в группах, однако статистической достоверности не было ($p = 0,299$). Авторы отмечают, что у пациентов с исходно более низкими баллами по шкале MoCA (<23 баллов) наблюдалось более выраженное действие препарата. Этот факт мог повлиять на результаты в исследуемой группе к моменту окончания исследования. В двух других исследованиях терапия Цитофлавином® оценивалась в отношении когнитивных расстройств, ассоциированных с COVID-19 [21, 30]. Важно подчеркнуть исходно более высокие баллы в этих группах, что объясняется додементным уровнем нарушений. Лечение Цитофлавином® улучшило как общее самочувствие пациентов, так и когнитивные функции в 20,3% случаев по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Исследование вызванных потенциалов P300 используется как метод диагностики когнитивных нарушений при неврологических патологиях, а также для оценки эффективности проводимой терапии. В настоящее время данное тестирование является одним из немногочисленных способов объективной оценки когнитивных расстройств [44]. В исследовании З. А. Суслиной у пациентов через месяц после аортокоронарного шунтирования и протезирования клапанов сердца в группе терапии Цитофлавином® наблюдалось снижение латентности пика P300 наряду с увеличением амплитуды. У контрольной группы показатели не изменились. Результаты не являлись достоверными, причиной чего мог стать маленький размер выборки, а также небольшое количество повторений исследований из-за иногородних пациентов [25].

Матрица Равена является скринингом нарушений умственного развития. При прохождении тестирования задействуются сразу несколько компонентов когнитива: внимание, память, образное мышление [45]. В публикации Л. С. Золотаревой и соавторов у пациентов с когнитивными нарушениями в послеоперационном периоде через месяц после терапии в группе с введением Цитофлавина® результат тестирования был лучше, чем до операции, в 1,6 раза, а в контрольной группе – в 1,4 раза [23]. Статистически значимых результатов не было получено, причиной чего могла стать низкая чувствительность тестирования на данной выборке.

С целью оценки эффективности Цитофлавина® были использованы нейропсихологические тесты, такие как «10 слов» А. Р. Лурия ($n = 2$) и «Таблицы Шульте» ($n = 2$), способные выявлять изменения психической деятельности, оперативной и долговременной памяти, а также устойчивости внимания и динамики работоспособности [46]. В исследовании А. С. Агафьиной и соавторов, посвященном лечению пациентов с когнитивными нарушениями после COVID-19, на 35 день терапии в тесте по А. Лурия в группе, получавшей Цитофлавин®, показатель по непосредственному воспроизведению слов был выше на 39,6 % по сравнению с исходными значениями, а в контрольной группе – на 3,9 % ($p < 0,05$) [24].

М. А. Алиакбаров и соавторы в исследовании по профилактике и коррекции когнитивных нарушений после общей анестезии отмечали статистически значимое уменьшение темпов запоминания и воспроизведения слов у пациентов контрольной группы ($p < 0,05$). В отношении группы терапии Цитофлавином® не было получено достоверных значений, однако положительная динамика присутствовала на протяжении всего времени исследования (48 часов). Ко 2-м суткам показатели немедленной и отсроченной памяти почти полностью восстанавливались [19]. Существенным недостатком для обобщения результатов теста «10 слов» являлась неполнота представления данных в исследовании, однако четко прослеживалась тенденция к улучшению показателей оперативной и долговременной памяти в группах, получавших нейропротекторную терапию Цитофлавином®. Нейропсихологическое тестирование было также проведено у пациентов, имеющих осложнения в виде послеоперационной когнитивной дисфункции, при проведении аортокоронарного шунтирования. Больным были предложены пробы по концепции А. Р. Лурия с целью оценки нейродинамических характеристик, в частности показателей памяти, внимания, умственной работоспособности, оцениваемых по трехбалльной шкале. В группах пациентов, получавших нейропротектор, наблюдалось статистически значимое улучшение оперативной и долговременной памяти по сравнению с контрольными группами ($p < 0,05$), где отмечалось значимое ухудшение всех показателей через месяц после операции ($p = 0,028$) [25].

Тест «Таблицы Шульте» проводился в 2 исследованиях. М. А. Алиакбаров и соавторы отмечали стойкое снижение скорости сенсомоторных реакций через 6 ч после операции. Через 48 ч показатель в группе с введением Цитофлавина® был выше в 1,2 раза, в то время как в контрольной группе практически отсутствовали изменения ($p > 0,05$) [19]. А.С. Агафьева и соавторы отмечали полное восстановление скорости сенсомоторных реакций к 35 дню терапии у 41,2 % пациентов группы, получавшей Цитофлавин®, в контрольной группе динамика отсутствовала ($p < 0,05$). Несмотря на недостигнутые референсные значения у 58,8 % в группе, получавшей нейропротекторную терапию, у пациентов наблюдалось улучшение скорости сенсомоторных реакций [24].

Оценка качества жизни и повседневной активности проводилась в исследованиях, вошедших в обзор, с помощью опросников SF-36 ($n = 1$), EQ-5D ($n = 1$), PSQI (Pittsburgh Sleep Quality Index, Питтсбургский опросник качества сна) ($n = 1$), а также индекса Бартела ($n = 5$).

Опросник SF-36 (Short Form-36) является неспецифическим и состоит из 36 вопросов, объединенных в 8 шкал, отражающих как общее и физическое состояние пациента, так и эмоциональное и психическое. Максимальное значение по каждой шкале равно 100, минимальное – 0. Чем больше баллов пациент набирает по всем шкалам, тем выше считается качество жизни [47]. Н. В. Филлипова и соавторы в исследовании у пациентов с когнитивными расстройствами после COVID-19 получили достоверные результаты в отношении шкал физического функционирования и общего состояния на 10 день терапии Цитофлавином®. Баллы по этим показателями были выше, чем в группе контроля, в 1,3 и 1,2 раза соответственно ($p < 0,05$). Данные в группе, получавшей нейропротектор, в среднем были выше, чем в контрольной группе, на 19,5 % по всем шкалам ($p < 0,05$) [21].

Опросник EQ-5D (EuroQol-5D) состоит из 5 компонентов, учитывающих подвижность пациента, его способность к самообслуживанию, боль, беспокойство и депрессию [48]. Питтсбургский опросник используется с целью оценки качества сна пациента в течение месяца и состоит из 19 вопросов. Разброс баллов лежит в интервале от 0 до 21. При 5 баллах и ниже выставляется высокая оценка качества сна, при 6 и выше – низкая [49]. В публикации А. С. Агафьиной и соавторов, также посвященной коррекции когнитивной дисфункции, ассоциированной с COVID-19, при исследовании с использованием опросника EQ-5D оценка проводилась в процентах, от 0 до 100. У 62,5 % пациентов до терапии результаты опроса показывали удовлетворенность качеством жизни менее чем на 50 %, у 37,5 % – от 50 до 70 %. После терапии Цитофлавином® у всех пациентов в группе показатель был выше 70 %, а у половины из них – выше 90 %. В контрольной группе только 1 пациент оценивал степень удовлетворенности качеством жизни более 70 %, остальные – 45–65 %. В тестировании с использованием Питтсбургского опросника отмечено, что в группе, получавшей нейропротектор, результаты были достоверно выше в 3,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной, где динамика практически отсутствовала [24].

В 5 публикациях динамика повседневной активности оценивалась по индексу Бартела. Это тестирование позволяет определить реальный уровень функционирования пациента. Суммарный балл равен 100. Принято считать, что пациенты с уровнем 0–20 баллов полностью зависимы от помощи окружающих; 21–60 баллов – имеют выраженную зависимость; 61–90 – умеренную зависимость; 91–99 баллов – легкую зависимость [50]. В исследовании А. И. Федина и соавторов у 78,3 % пациентов, перенесших ишемический инсульт, к 120 суткам в группе, получавшей Цитофлавин®, наблюдалась легкая зависимость от помощи, в то время как в 56,82 % случаев в группе плацебо была выраженная зависимость ($p < 0,05$) [14]. В публикации Е. В. Екушевой, также посвященной терапии ишемического инсульта, в группе с введением Цитофлавина® наблюдалась выраженная динамика функциональной зависимости пациентов: до лечения – $42,5 \pm 7,5$, после – $68,3 \pm 6,2$ балла против $43,7 \pm 4,5$ и $52,8 \pm 5,7$ соответственно в контрольной группе ($p < 0,05$) [20]. С. А. Румянцева и соавторы в публикации, посвященной оценке эффективности

Цитофлавина® при ишемическом инсульте в острой фазе, сообщали о 37,5 % пациентов в основной группе и 14,3 % в группе сравнения, имевших 100 баллов к моменту выписки [22]. В исследовании Э. А. Пономарева и соавторов по цитопротекции головного мозга при каротидной эндартерэктомии через 6 месяцев терапии средний балл в группе, получавшей Цитофлавин®, составлял 49, а в контрольной – 28 ($p < 0,05$) [27]. При геморрагическом инсульте И. Э. Сазонов и соавторы в публикации отмечали также выраженную динамику в группе, получавшей нейропротекторную терапию Цитофлавином®. К 11–16 дням лечения были достигнуты показатели: $50,2 \pm 0,2$ – в группе контроля и $56,5 \pm 0,1$ – в основной группе ($p < 0,05$) [29].

Влияние Цитофлавина® на коррекцию астенического синдрома оценивали по субъективной шкале оценки астении MFI-20 ($n = 1$) и шкале астенического состояния (ШАС) ($n = 1$).

MFI-20 (Multidimensional Fatigue Inventory-20) представляет собой опросник, включающий 20 вопросов. Максимальный балл в тестировании – 100. При таком значение диагностируется выраженный уровень астении [51]. ШАС является экспресс-тестированием, состоящим из 30 пунктов. При уровне баллов 101–120 у пациента наблюдается также сильный астенический синдром [52]. В исследовании А. С. Агафьиной и соавторов пациенты с астенизацией после перенесенного COVID-19 получали нейропротекторную терапию. В группе с введением Цитофлавина® наблюдалась выраженная динамика по обеим шкалам. Так, к 35 дню лечения средний балл по шкале MFI-20 снизился на 53,7 %, достигнув референсных значений, а в группе контроля – на 17,7 % ($p < 0,05$). В этом же исследовании при тестировании по ШАС показатели в группе нейропротектора были достоверно ниже в 2,6 раза, а в контроле – в 1,3 раза по сравнению с исходными значениями [24].

Влияние Цитофлавина® на уровень депрессии и тревоги было изучено в публикации А. С. Агафьиной и соавторов. Шкала HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale) представляет собой скрининг, состоящий из 14 вопросов. Норма устанавливается при значении 0–7 баллов, при 11 баллах и выше диагностируется клинически значимый уровень тревоги и стресса [53]. Так, применение Цитофлавина® в течение 35 дней способствовало снижению тревоги в 4,47 раза и депрессии в 4,85 раза, а в группе контроля – в 1,12 и 1,1 раза соответственно по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$) [24].

При анализе публикаций была отмечена сложность в оценке практического вклада большинства исследований, причиной чего являлась слабость методологической разработки дизайна исследований.

Многие из вошедших в обзор исследований имеют низкую статистическую мощность по причине маленьких размеров выборок пациентов, их гетерогенности, неполноты представления данных о проводимой терапии и отсутствия рандомизации в исследуемых группах.

Кроме того, в 11,11 % публикаций ($n = 2$) авторы заявляли об отсутствии достоверных результатов в отношении эффективности применения Цитофлавина®, объясняя это маленьким объемом выборки и низким количеством повторений исследований в связи с наличием иногородних пациентов, однако отмечали общую позитивную тенденцию от терапии [23, 25].

Также стоит отметить, что 2 из 4 многоцентровых плацебоконтролируемых исследований имели финансирование со стороны ООО «НТФФ «Полисан».

Ограничения выполненного исследования:

- при поиске источников в реестрах клинических исследований ряд материалов был исключен по причине отсутствия протокола и результатов испытаний, в связи с чем есть упущение в виде ряда новых, релевантных к теме обзора публикаций;
- в обзоре отсутствует критическая оценка материалов, в связи с чем перспективным представляется проведение метааналитического исследования вошедших в обзор публикаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате использования методологии создания систематического обзора по оценке эффективности и безопасности применения сукцинатсодержащего препарата Цитофлавин® в качестве нейропротектора было отобрано 18 полнотекстовых статей, приемлемых для обзора согласно критериям PRISMA 2020. Это позволило:

- провести системный поиск и описание результатов в соответствии с международными рекомендациями;
- протоколу исследования не ограничиваться временными рамками, в связи с чем в обзор вошли наиболее современные испытания;
- осуществить поиск исследований, помимо общепринятых баз данных, дополнительно в отечественных и международных реестрах клинических испытаний.

В исследованиях Цитофлавин® продемонстрировал эффективность как в отношении показателя летальности, так и в отношении снижения объема очага поражения головного мозга при ишемическом инсульте.

Результаты тестирований в группах пациентов, получающих терапию Цитофлавином®, по шкалам NIHSS, PedNIHSS, NISLL, ESS показали достоверное уменьшение неврологического дефицита. В исследованиях со специфическими шкалами для оценки мобильности больных, такими как шкала Рэнкина, Ривермид, EDSS, был также отмечен высокий уровень терапевтической активности. Цитофлавин® статистически значимо снижал инвалидизацию пациентов. По шкале TSS оценивалась динамика выраженности нейропатии. Показано, что препарат достоверно способствует регрессу симптомов.

Обобщая полученные результаты когнитивного скрининга, стоит отметить, что при терапии Цитофлавином® в группах наблюдалось достоверное повышение баллов по шкале MoCA и MMSE по сравнению с базисной терапией, что связано с влиянием препарата на оптимизацию функций когнитивной сферы. Препарат снижал латентность пика Р300 наряду с увеличением амплитуды.

В нейропсихологических тестах «10 слов» и «Таблицы Шульте» Цитофлавин® оказывал воздействие сразу на несколько составляющих: оперативную и долговременную память, внимание и сенсомоторные реакции.

Стоит отметить, что терапия Цитофлавином® положительно сказывалась на состоянии пациентов, достоверно повышая качество жизни и сна. Недостатком служило весьма ограниченное количество исследований с использованием шкал SF-36, EQ-5D, PSQI для оценки этих параметров, что существенно препятствует обобщению и интерпретации результатов. Цитофлавин® значимо увеличивал показатели в индексе Бартела, в среднем от выраженной до умеренной степени функциональной зависимости пациента от помощи, а при более длительной терапии (120 суток) – до легкой зависимости.

Цитофлавин® снижал симптомы астенического синдрома у пациентов в тестах MFI-20 и ШАС, а также способствовал уменьшению тревоги и стресса по результатам опросника HADS.

По результатам большинства клинических исследований показано, что применение Цитофлавина® является безопасным, а его назначение при неврологических заболеваниях различного генеза является целесообразным в связи со снижением частоты неблагоприятных неврологических исходов у пациентов. Для объективного результата исследований требуется проведение метааналитической оценки включенных в обзор публикаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. 2019;18(5):459–480. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X.
2. Feigin V. L. The Evolution of Neuroepidemiology: marking the 40-year anniversary of publishing studies on epidemiology of neurological disorders. *Neuroepidemiology*. 2022;56(1):2–3. DOI: 10.1159/000521586.
3. Feigin V. L., Vos T., Nichols E., Owolabi M. O., Carroll W. M., Dichgans M., Deuschl G., Parmar P., Brainin M., Murray C. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *The Lancet Neurology*. 2020;19(3):255–265. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30411-9.
4. Шишкова В. Н., Приходько В. А., Оковитый С. В. Выбор современного нейропротекторного препарата как базовая стратегия в терапии хронических цереброваскулярных заболеваний. *Медицинский совет*. 2023;17(10):41–49. DOI: 10.21518/ms2023-232.
5. Okovityi S. V., Rad'ko S. V., Shustov E. B. Succinate Receptors (SUCNR1) as a Potential Target for Pharmacotherapy. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(9):573–577. DOI: 10.1007/s11094-015-1331-8.
6. Агафьина А., Коваленко А., Румянцева С., Скоромец А., Клочева Е., Суслина З., Кухцевич И., Шоломов И., Белоногов М. Эффективность нейрометаболического протектора Цитофлавина у больных, перенесших ишемический инсульт, в раннем восстановительном периоде (многоцентровое рандомизированное исследование). *Врач*. 2006;1:60–65.
7. Одинак М. М., Скворцова В. И., Вознюк И. А. и др. Оценка эффективности цитофлавина у больных в остром периоде ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2010;110(12):29–36.
8. Сазонов И. Э., Кудинов А. А., Федотова Е. П. Изучение дозозависимого эффекта цитофлавина в терапии острого периода ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017;2:64–67. DOI: 10.17116/jnevro20171172164-67.
9. Муратов Ф. Х., Шермухамедова Ф. К., Батоцыренов Б. В., Харитонова Т. В. Мультимодальное действие цитофлавина при остром мозговом инсульте, развившемся на фоне метаболического синдрома. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016;116(12):44–47. DOI: 10.17116/jnevro201611612144-47.
10. Starr M., Chalmers I., Clarke M., Oxman A. D. The origins, evolution, and future of The Cochrane Database of Systematic Reviews. *International journal of technology assessment in health care*. 2009;25(1):182–195. DOI: 10.1017/S026646230909062X.
11. Калинин А. Л., Литвин А. А., Тризна Н. М. Использование данных доказательной медицины в клинической практике. *Проблемы здоровья и экологии*. 2008;(2):27–32. DOI: 10.51523/2708-6011.2008-5-2-6.
12. Page M. J., Moher D., Bossuyt P. M., Boutron I., Hoffmann T. C., Mulrow C. D., Shamseer L., Tetzlaff J. M., Akl E. A., Brennan S. E., Chou R., Glanville J., Grimshaw J. M., Hróbjartsson A., Lalu M. M., Li T., Loder E. W., Mayo-Wilson E., McDonald S., McGuinness L. A., Stewart L. A., Thomas J., Tricco A. C., Welch V. A., Whiting P., McKenzie J. E. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n160. DOI: 10.1136/bmj.n160.
13. Page M. J., McKenzie J. E., Bossuyt P. M., Boutron I., Hoffmann T. C., Mulrow C. D., Shamseer L., Tetzlaff J. M., Akl E. A., Brennan S. E., Chou R., Glanville J., Grimshaw J. M., Hróbjartsson A., Lalu M. M., Li T., Loder E. W., Mayo-Wilson E., McDonald S., McGuinness L. A., Stewart L. A., Thomas J., Tricco A. C., Welch V. A., Whiting P., Moher D. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71. DOI: 10.1136/bmj.n71.
14. Федин А. И., Румянцева С. А., Пирадов М. А. и др. Эффективность нейрометаболического протектора цитофлавина при инфарктах мозга (многоцентровое рандомизированное исследование). *Главный врач Юга России*. 2007;1(9):15–17.
15. Бисага Г. Н., Одинак М. М., Бойко А. Н. и др. Возможности лечения обострений рассеянного склероза без применения кортикостероидов: роль метаболической и антиоксидантной терапии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2011;111(2):44–48.

16. Kharitonova T., Shvarts Y. G., Verbovoy A. F. Orlova N. S., Puzyreva V. P., Strokov I. A. Efficacy and safety of the combined metabolic medication, containing inosine, nicotinamide, riboflavin and succinic acid, for the treatment of diabetic neuropathy: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled parallel group clinical trial (CYLINDER). *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2022;10(3):e002785. DOI: 10.1136/bmjdrc-2022-002785.
17. Коваленко А. Л., Нагибович О. А., Вишневский А. Ю. Белехов Г. А., Губайдуллин Р. Р., Попов Д. В., Агафьина А. С. Применение препарата, влияющего на нейрометаболизм, для профилактики послеоперационных когнитивных расстройств. *Общая реаниматология*. 2022;18(2):12–21. DOI: 10.15360/1813-9779-2022-2-12-21.
18. Колоколов О. В., Шульдяков А. А., Бакулев А. Л., Колоколова А. М., Барыльник Ю. Б., Рамазанова К. Х. Нейропротективная и метаболическая поддержка антимикробной терапии у больных с нейросифилисом. *Инфекционные болезни*. 2020;18(3):159–166. DOI: 10.20953/1729-9225-2020-3-159-166.
19. Алиакбаров М. А., Инербаева-Бегимова М. С., Муратбаев А. Ж., Турсунов Ж. С., Шомансуров Ш. Ш., Кайратулы Н. Профилактика и коррекция когнитивных нарушений после общей анестезии. *Интернаука*. 2022;21(244):26–28. DOI: 10.32743/26870142.2022.21.244.341806.
20. Екушева Е. В. Постинсультная реабилитация: процессы нейропластичности и возможности повышения функционального восстановления. *Фарматека*. 2019;26(3):57–64. DOI: 10.18565/pharmateca.2019.3.57-64.
21. Филиппова Н. В., Шульдяков А. А., Еремин В. И., Барыльник Ю. Б., Рамазанова К. Х., Смагина А. Н., Шешина Н. А., Жук А. А. Реабилитация пациентов, перенесших COVID-19 с легкими (додементными) когнитивными расстройствами. *Современные проблемы науки и образования*. 2023;2:93. DOI: 10.17513/spno.32564.
22. Румянцева С. А., Федин А. И., Болевич С. Б., Силина Е. В., Васильев Ю. Д., Меньшова Н. И., Илюхина О. А., Голузова Ю.Н. Влияние ранней коррекции энергетического и свободнорадикального гомеостаза на клиническую и морфологическую картину инфаркта мозга. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2010;110(8):16–21.
23. Золотарева Л. С., Папонов О. Н., Степаненко С. М., Адлер А. В., Федулеева Е. С., Силина Е. В. Профилактика когнитивных нарушений в послеоперационном периоде у детей дошкольного возраста. *Вопросы практической педиатрии*. 2020;15(4):92–99. DOI 10.20953/1817-7646-2020-4-92-99.
24. Агафьина А. С., Макарьина Е. С., Усикова Е. В., Щербак С. Г., Минеев К. К. Нейропротекторная терапия в реабилитации пациентов, перенесших COVID-19 ассоциированную пневмонию. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(1):7–12. DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-1-7-12.
25. Суслина З. А. , Бокерия Л. А. , Пирадов М. А., Малашенков А. И., Ахмаджонува Н. А., Федин П. А., Родионова Ю. В., Реброва О. Ю., Кротенкова М. В., Лагутин А. В., Клочков А. С. Нейропротекция в кардиохирургии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2009;3(1):4–8.
26. Стрепетов Н. Н., Пономарев Э. А., Маскин С. С. Интраоперационная цитопротекция головного мозга при каротидной эндартерэктомии. *Современные проблемы науки и образования*. 2006;2:49.
27. Пономарев Э. А., Маскин С. С., Стрепетов Н. Н., Мочайло Ю. А., ПЧелинцев К. Э. Фармакологическая нейропротекция головного мозга при операциях на сонных артериях. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2011;111(6):70–72.
28. Маджидова Я. Н., Халилова А. Э. Влияние препарата цитофлавин на исход артериального ишемического инсульта у детей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2020;65(1–2):38–43. DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-1-2-38-43.
29. Сазонов И. Э., Клементенко Т. Д., Кудинов А. А., Авраменко М. А., Ярмонов С. Н. Использование цитофлавина в остром периоде геморрагического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018;118(2):23–26. DOI: 10.17116/jnevro20181182123-26.
30. Филиппова Н. В., Шульдяков А. А., Барыльник Ю. Б., Лянина Е. П., Колоколов О. В., Колоколова А. М., Рамазанова К. Х., Решетников А. А., Федоров А. А. Метаболическая поддержка пациентов с легкими (додементными) когнитивными расстройствами, перенесших COVID-19. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(12):3–8. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-12-3-8.
31. Юденкова О., Жуков В. Применение цитофлавина в первые часы развития острой цереброваскулярной ишемии. *Врач*. 2006;5:67–70.
32. Мазин П. В., Шешунов И. В., Мазина Н. К. Метааналитическая оценка клинической эффективности цитофлавина при неврологических заболеваниях. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017;117(3):28–39. DOI: 10.17116/jnevro20171173128-39.
33. Spilker J., Kongable G., Barch C., Braimah J., Brattina P., Daley S., Donnarumma R., Rapp K., Sailor S. Using the NIH Stroke Scale to assess stroke patients. The NINDS rt-PA Stroke Study Group. *Journal of Neuroscience Nursing*. 1997;29(6):384–92.
34. Ichord R. N., Bastian R., Abraham L., Askalan R., Benedict S., Bernard T. J., Beslow L., deVeber G., Dowling M., Friedman N., Fullerton H., Jordan L., Kan L., Kirton A., Amlie-Lefond C., Licht D., Lo W., McClure C., Pavlakis S., Smith S. E., Tan M., Kasner S., Jawad A. F. Interrater Reliability of the Pediatric National Institutes of Health Stroke Scale (PedNIHSS) in a Multicenter Study. *Stroke*. 2011;42(3):613–617. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.607192.
35. Hantson L., De Weerdt W., De Keyser J., Diener H. C., Franke C., Palm R., Van Orshoven M., Schoonderwalt H., De Klippel N., Herroelen L. The European Stroke Scale. *Stroke*. 1994;25(11):2215–2219. DOI: 10.1161/01.str.25.11.2215.
36. Pożarowszczyk N., Kurkowska-Jastrzębska I., Sarzyńska-Długosz I., Nowak M., Karliński M. Reliability of the modified Rankin Scale in clinical practice of stroke units and rehabilitation wards. *Front Neurol*. 2023;14:1064642. DOI: 10.3389/fneur.2023.1064642.
37. Ziegler D., Hanefeld M., Ruhnau K. J., Meissner H. P., Lobisch M., Schütte K., Gries F. A. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia*. 1995;38(12):1425–33. DOI: 10.1007/BF00400603.
38. Collen F. M., Wade D. T., Robb G. F., Bradshaw C. M. The Rivermead Mobility Index: a further development of the Rivermead Motor Assessment. *Int Disabil Stud*. 1991;13(2):50–54. DOI: 10.3109/03790799109166684.
39. Semrau J. A., Herter T. M., Scott S. H., Dukelow S. P. Robotic identification of kinesthetic deficits after stroke. *Stroke*. 2013;(44):3414–3421. DOI: 0.1161/STROKEAHA.113.002058.

40. Kurtzke J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–1452.
41. Bril V. NIS-LL: the primary measurement scale for clinical trial endpoints in diabetic peripheral neuropathy. *Neurology* . 1999;41(Suppl.1):8–13. DOI: 10.1159/000052074.
42. Creavin S. T., Wisniewski S., Noel-Storr A. H., Trevelyan C. M., Hampton T., Rayment D., Thom V. M., Nash K. J. E., Elhamoui H., Milligan R., Patel A. S., Tsivos D. V., Wing T., Phillips E., Kellman S. M., Shackleton H. L., Singleton G. F., Neale B. E., Watton M. E., Cullum S. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of dementia in clinically unevaluated people aged 65 and over in community and primary care populations. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;1:CD011145. DOI: 10.1002/14651858.CD011145.pub2.
43. Nasreddine Z. S., Phillips N. A., Bédirian V., Charbonneau S., Whitehead V., Collin I., Cummings J. L., Chertkow H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005;53(4):695–699. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x.
44. Жарикова А. В., Пономарев В. В. Возможности применения когнитивного вызванного потенциала Р300 в клинической практике. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2012;2:105–116.
45. Raven J. The Raven's Progressive Matrices: Change and Stability over Culture and Time. *Cognitive Psychology*. 2000;41(1):1–48. DOI: 10.1006/cogp.1999.0735.
46. Folstein M. F., Folstein S. E., McHugh P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*. 1975;12(3):189–98. DOI: 10.1016/0022-3956(75)90026-6.
47. Ware J. E. Jr., Gandek B. Overview of the SF-36 Health Survey and the International Quality of Life Assessment (IQOLA) Project. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1998;51(11):903–912. DOI: 10.1016/s0895-4356(98)00081-x.
48. Rabin R., de Charro F. EQ-5D: a measure of health status from the EuroQol *Group. Annals of Medicine*. 2001;33(5):337–343. DOI: 10.3109/07853890109002087.
49. Buysse D. J., Reynolds C. F., Monk T. H., Berman S. R., Kupfer D. J. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research*. 1989;28(2):193–213. DOI: 10.1016/0165-1781(89)90047-4.
50. Collin C., Wade D. T., Davies S., Horne V. The Bartel ADL Index a reliability study. *International disability studies*. 1988;10(2):64–67.
51. Smets E. M., Garssen B., Bonke B., De Haes. J. C. The Multidimensional Fatigue Inventory (MFI) psychometric qualities of an instrument to assess fatigue. *Journal of Psychosomatic Research*. 1995;39(3):15–25. DOI: 10.1016/0022-3999(94)00125-o.
52. Шабров А. В, Соловьева С. Л. Астенические расстройства в терапевтической практике. СПб.: ИнформМед; 2010. 379 с.
53. Zigmond A. S., Snaith R. P. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 1983;67(6):361–370.DOI: 10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x.

REFERENCES

1. GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. 2019;18(5):459–480. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X.
2. Feigin V. L. The Evolution of Neuroepidemiology: marking the 40-year anniversary of publishing studies on epidemiology of neurological disorders. *Neuroepidemiology*. 2022;56(1):2–3. DOI: 10.1159/000521586.
3. Feigin V. L., Vos T., Nichols E., Owolabi M. O., Carroll W. M., Dichgans M., Deuschl G., Parmar P., Brainin M., Murray C. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *The Lancet Neurology*. 2020;19(3):255–265. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30411-9.
4. Shishkova V. N., Prikhodko V. A., Okovityi S. V. The choice of a modern neuroprotective drug as a basic strategy in the treatment of chronic cerebrovascular diseases. *Meditsinskiy Sovet*. 2023;17(10):41–49. (In Russ.) DOI: 10.21518/ms2023-232.
5. Okovityi S. V., Rad'ko S. V., Shustov E. B. Succinate Receptors (SUCNR1) as a Potential Target for Pharmacotherapy. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(9):573–577. DOI: 10.1007/s11094-015-1331-8.
6. Agaf'ina A., Kovalenko A., Rumjanceva S., Skoromets A., Klocheva E., Suslina Z., Kukhtsevich I., Sholomov I., Belonogov M. Efficacy of the neurometabolic protector Cytoflavin in patients with ischemic stroke in the early recovery period (multicenter randomized trial). *Vrach*. 2006;1:60–65 (In Russ.)
7. Odinak M. M., Skvortsova V. I., Vozniuk I. A. et al. Efficacy of cytoflavin in patients in the acute ischemic stroke. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2010;110 (12):29–36 (In Russ.)
8. Sazonov I. E., Kudinov A. A., Fedotova E. P. Study cytoflavin dose-dependent effect in the treatment of acute ischemic stroke. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2017;2:64–67. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro20171172164-67.
9. Muratov F. H., Shermuhamedova F. K., Batocyrenov B. V., Haritonova T. V. Influence of multimodal effect of cytoflavin in the acute brain stroke in patients with metabolic syndrome. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2016;116(12):44–47. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro201611612144-47.
10. Starr M., Chalmers I., Clarke M., Oxman A. D. The origins, evolution, and future of The Cochrane Database of Systematic Reviews. *International journal of technology assessment in health care*. 2009;25(1):182–195. DOI: 10.1017/S026646230909062X.
11. Kalinin A. L., Litvin A. A, Trizna N. M. Use of data of evidence based medicine in clinical practice (literature review). *Health and Ecology Issues*. 2008;(2):27–32. (In Russ.) DOI: 10.51523/2708-6011.2008-5-2-6.
12. Page M. J., Moher D., Bossuyt P. M., Boutron I., Hoffmann T. C., Mulrow C. D., Shamseer L., Tetzlaff J. M., Akl E. A., Brennan S. E., Chou R., Glanville J., Grimshaw J. M., Hróbjartsson A., Lalu M. M., Li T., Loder E. W., Mayo-Wilson E., McDonald S., McGuinness L. A., Stewart L. A., Thomas J., Tricco A. C., Welch V. A., Whiting P., McKenzie J. E. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n160. DOI: 10.1136/bmj.n160.
13. Page M. J., McKenzie J. E., Bossuyt P. M., Boutron I., Hoffmann T. C., Mulrow C. D., Shamseer L., Tetzlaff J. M., Akl E. A., Brennan S. E., Chou R., Glanville J., Grimshaw J. M., Hróbjartsson A., Lalu M. M., Li T., Loder E. W., Mayo-Wilson E., McDonald S., McGuinness L. A., Stewart L. A., Thomas J., Tricco A. C., Welch V. A., Whiting P., Moher D.

The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71. DOI: 10.1136/bmj.n71.
14. Fedin A. I., Rumjanceva S. A., Piradov M. A. et al. Efficacy of the neurometabolic protector cytoflavin in cerebral infarctions (multicenter randomized trial). *Glavnyi vrach Yuga Rossii*. 2007;1(9):15–17 (In Russ.)
15. Bisaga G. N., Odinak M. M., Boyko A. N. et al. Possibilities of treating exacerbations of multiple sclerosis without the use of corticosteroids: the role of metabolic and antioxidant therapy. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2011;111(2):44–48. (In Russ.)
16. Kharitonova T., Shvarts Y. G., Verbovoy A. F. Orlova N. S., Puzyreva V. P., Strokov I. A. Efficacy and safety of the combined metabolic medication, containing inosine, nicotinamide, riboflavin and succinic acid, for the treatment of diabetic neuropathy: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled parallel group clinical trial (CYLINDER). *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2022;10(3):e002785. DOI: 10.1136/bmjdrc-2022-002785.
17. Kovalenko A. L., Nagibovich O. A., Vishnevsky A. Yu., Belekhov G. A., Gubaidullin R. R., Popov D. V., Agafiina A .S. Use of a Neurometabolism-Targeting Drug in Prevention of Postoperative Cognitive Dysfunction. *General Reanimatology*. 2022;18(2):12–21. DOI: 10.15360/1813-9779-2022-2-12-21.
18. Kolokolov O. V., Shuldyakov A. A., Bakulev A. L., Kolokolova A. M., Barylnik Yu. B., Ramazanova K. Kh. Neuroprotective and metabolic support of antimicrobial therapy in patients with neurosyphilis. *Infectious diseases*. 2020;18(3):159–166. (In Russ.) DOI: 10.20953/1729-9225-2020-3-159-166.
19. Aliakbarov M. A., Inerbaeva-Begimova M. S., Muratbaev A. Zh. Tursunov Zh. S., Shomansurov Sh. Sh., Kairatuly N. Prevention and correction of cognitive impairment after general anesthesia. *Internauka*. 2022;21(244):26–28. (In Russ.) DOI: 10.32743/26870142.2022.21.244.341806.
20. Ekusheva E. V. Post-stroke rehabilitation: processes of neuroplasticity and the possibility of increasing functional recovery. *Farmateka*. 2019;26(3):57–64. (In Russ.) DOI: 10.18565/pharmateca.2019.3.57-64.
21. Filippova N. V., Shul'dyakov A. A., Eremin V. I., Barylnik Yu. B., Ramazanova K. H., Smagina A. N., Sheshina N. A., Zhuk A. A. Rehabilitation of patients, COVID-19 survivors with mild (pre-dementia) cognitive impairment. Modern problems of science and education. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2023;2:93. (In Russ.) DOI: 10.17513/spno.32564.
22. Rumyanceva S. A., Fedin A. I., Bolevich S. B., Silina E. V., Vasil'ev Iu. D., Men'shova N. I., Iliukhina O. A., Goluzova Iu. N. Effect of early correction of energy and free-radical homeostasis on the clinical-morphological presentation of cerebral infarction. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2010;110(8):16–21. (In Russ.)
23. Zolotareva L. S., Paponov O. N., Stepanenko S. M., Adler A. V., Feduleeva E. S., Silina E. V. Prevention of cognitive disorders in the postoperative period in preschoolers. *Voprosy prakticheskoj pediatrii*. 2020;15(4):92–99. (In Russ.) DOI: 10.20953/1817-7646-2020-4-92-99.
24. Agaf'ina A. S., Makar'ina E. S., Usikova E. V. , Shcherbak S. G., Mineev K. K. Neuroprotective therapy in rehabilitation of patients with COVID-19 associated pneumonia. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85(1):7–12. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-1-7-12.
25. Suslina Z. A., Bokeriya L. A., Piradov M. A.,Malashenkov A. I., Akhmadzhonuva N. A., Fedin P. A., Rodionova Yu. V., Rebrova O. Yu., Krotenkova M. V., Lagutin A. V., Klochkov A. S. Neuroprotection in cardiosurgery. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2009;3(1):4–8. (In Russ.)
26. Strepetov N. N., Ponomarev E. A., Maskin S. S. Intraoperative cytoprotection of brain carotid during endarterectomy. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2006;2:49. (In Russ.)
27. Ponomarev E. A., Maskin S. S., Strepetov N. N., Mochailo Yu. A., Pchelintsev K. E. Pharmacologic neuroprotection of the brain in carotid artery surgeries. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry* 2011;111(6):70–72. (In Russ.)
28. Madzhidova Ya. N., Halilova A. E. The Effect of Cytoflavin on the Outcome of Ischemic Stroke in Children. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2020;65(1–2):38–43. (In Russ.) DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-1-2-38-43.
29. Sazonov I. E., Klementenko T. D., Kudinov A. A., Avramenko M. A., Yarmonov S. N. The use of cytoflavin in the acute period of hemorrhagic stroke. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2018;118(2):23–26. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro20181182123-26.
30. Filippova N. V., Shuldyakov A. A., Baryl'nik Y. B., Lyapina E. P., Kolokolov O. V., Kolokolova A. M., Ramazanova K. Kh., Reshetnikov A. A., Fedorov A. A. Metabolic support for patients with mild cognitive (dodecamental) impairment in the outcome of COVID-19. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2021;84(12):3–8. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-12-3-8.
31. Yudenkova O., Zhukov V. Use of cytoflavin in the first hours of the development of acute cerebrovascular ischemia. *Vrach*. 2006;5:67–70. (In Russ.)
32. Mazin P. V., Sheshunov I. V., Mazina N. K. Meta-analytic assessment of parenteral cytoflavin effectiveness in different neurologic disorders. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2017;117(3):28–39. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro20171173128-39.
33. Spilker J., Kongable G., Barch C., Braimah J., Brattina P., Daley S., Donnarumma R., Rapp K., Sailor S. Using the NIH Stroke Scale to assess stroke patients. The NINDS rt-PA Stroke Study Group. *Journal of Neuroscience Nursing*. 1997;29(6):384–92.
34. Ichord R. N., Bastian R., Abraham L., Askalan R., Benedict S., Bernard T. J., Beslow L., deVeber G., Dowling M., Friedman N., Fullerton H., Jordan L., Kan L., Kirton A., Amlie-Lefond C., Licht D., Lo W., McClure C., Pavlakis S., Smith S. E., Tan M., Kasner S., Jawad A. F. Interrater Reliability of the Pediatric National Institutes of Health Stroke Scale (PedNIHSS) in a Multicenter Study. *Stroke*. 2011;42(3):613–617. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.607192.
35. Hantson L., De Weerdt W., De Keyser J., Diener H. C., Franke C., Palm R., Van Orshoven M., Schoonderwalt H., De Klippel N., Herroelen L. The European Stroke Scale. *Stroke*. 1994;25(11):2215–2219. DOI: 10.1161/01.str.25.11.2215.
36. Pożarowszczyk N., Kurkowska-Jastrzębska I., Sarzyńska-Długosz I., Nowak M., Karliński M. Reliability of the modified Rankin Scale in clinical practice of stroke units and rehabilitation wards. *Front Neurol*. 2023;14:1064642. DOI: 10.3389/fneur.2023.1064642.
37. Ziegler D., Hanefeld M., Ruhnau K. J., Meissner H. P., Lobisch M., Schütte K., Gries F. A. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia*. 1995;38(12):1425–33. DOI: 10.1007/BF00400603.

38. Collen F. M., Wade D. T., Robb G. F., Bradshaw C. M. The Rivermead Mobility Index: a further development of the Rivermead Motor Assessment. *Int Disabil Stud*. 1991;13(2):50–54. DOI: 10.3109/03790799109166684.
39. Semrau J. A., Herter T. M., Scott S. H., Dukelow S. P. Robotic identification of kinesthetic deficits after stroke. *Stroke*. 2013;(44):3414–3421. DOI: 0.1161/STROKEAHA.113.002058.
40. Kurtzke J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–1452.
41. Bril V. NIS-LL: the primary measurement scale for clinical trial endpoints in diabetic peripheral neuropathy. *Neurology* . 1999;41(Suppl.1):8–13. DOI: 10.1159/000052074.
42. Creavin S. T., Wisniewski S., Noel-Storr A. H., Trevelyan C. M., Hampton T., Rayment D., Thom V. M., Nash K. J. E., Elhamoui H., Milligan R., Patel A. S., Tsivos D. V., Wing T., Phillips E., Kellman S. M., Shackleton H. L., Singleton G. F., Neale B. E., Watton M. E., Cullum S. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of dementia in clinically unevaluated people aged 65 and over in community and primary care populations. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;1:CD011145. DOI: 10.1002/14651858.CD011145.pub2.
43. Nasreddine Z. S., Phillips N. A., Bédirian V., Charbonneau S., Whitehead V., Collin I., Cummings J. L., Chertkow H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005;53(4):695–699. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x.
44. Zharikova A. V., Ponomarev V. V. Possibilities of using the cognitive evoked potential P300 in clinical practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series*. 2012;2:105–116. (In Russ.)
45. Raven J. The Raven's Progressive Matrices: Change and Stability over Culture and Time. *Cognitive Psychology*. 2000;41(1):1–48. DOI: 10.1006/cogp.1999.0735.
46. Folstein M. F., Folstein S. E., McHugh P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*. 1975;12(3):189–98. DOI: 10.1016/0022-3956(75)90026-6.
47. Ware J. E. Jr., Gandek B. Overview of the SF-36 Health Survey and the International Quality of Life Assessment (IQOLA) Project. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1998;51(11):903–912. DOI: 10.1016/s0895-4356(98)00081-x.
48. Rabin R., de Charro F. EQ-5D: a measure of health status from the EuroQol *Group. Annals of Medicine*. 2001;33(5):337–343. DOI: 10.3109/07853890109002087.
49. Buysse D. J., Reynolds C. F., Monk T. H., Berman S. R., Kupfer D. J. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research*. 1989;28(2):193–213. DOI: 10.1016/0165-1781(89)90047-4.
50. Collin C., Wade D. T., Davies S., Horne V. The Bartel ADL Index a reliability study. *International disability studies*. 1988;10(2):64–67.
51. Smets E. M., Garssen B., Bonke B., De Haes. J. C. The Multidimensional Fatigue Inventory (MFI) psychometric qualities of an instrument to assess fatigue. *Journal of Psychosomatic Research*. 1995;39(3):15–25. DOI: 10.1016/0022-3999(94)00125-o.
52. Shabrov A. V., Solov'eva S. L. Asthenic disorders in therapeutic practice. St. Petersburg: InformMed; 2010. 379 p. (In Russ.)
53. Zigmond A. S., Snaith R. P. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 1983;67(6):361–370.DOI: 10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x.

Research article / Оригинальная статья

UDC 616-035.1

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1994

Check for updates

CC BY 4.0

Experimental murine non-alcoholic steatohepatitis is associated with behavioural, cognitive, and peripheral neuronal dysfunction

Veronika A. Prikhodko[1]✉, Darya A. Orlyakhina[1], Veronika D. Petrova[1], Vadim E. Karev[2], Dmitry Yu. Ivkin[1], Svetlana M. Napalkova[1], Sergey V. Okovityi[1]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical Biological Agency. 9, Professora Popova str., Saint Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Veronika A. Prikhodko. **E-mail:** veronika.prihodko@pharminnotech.com

ORCID: Veronika A. Prikhodko – https://orcid.org/0000-0002-4690-1811;
Darya A. Orlyakhina – https://orcid.org/0009-0003-3505-7904;
Veronika D. Petrova – https://orcid.org/0009-0004-6299-7608;
Vadim E. Karev – https://orcid.org/0000-0002-7972-1286;
Dmitry Yu. Ivkin – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864;
Svetlana M. Napalkova – https://orcid.org/0000-0002-9216-8673;
Sergey V. Okovityi – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Received: 05.11.2024 **Accepted:** 23.12.2024 **Published:** 26.12.2024

Abstract

Introduction. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), the leading causes of chronic liver disease worldwide, are associated with a wide range of psychoneurological complications and conditions. However, the causal relationship between liver and nervous system disease remains poorly understood, which warrants the development of clinically relevant and valid animal models thereof.

Aim. The objective of this work was to characterize the short- and long-term psychoneurological and peripheral neuronal deficits that complicate different stages of NAFLD/NASH in mice.

Materials and methods. 68 adult male C57Bl/6 mice were randomized into Control or NASH groups. NASH was induced over 3 (Experiment 1) or 6 (Experiment 2) mo using a combined model including a high-fat diet and low doses of carbon tetrachloride. Control group received standard chow, drinking water, and equivolume normal saline. Animal behaviour was assessed by the Open field (OF), Elevated plus maze (EPM), and Light/dark box (LDB) tests at 1, 2, 3, and 6 mo of NASH induction. Visuospatial memory was assessed by the Spontaneous alternation in the T-maze and Novel object recognition tests at 1, 2, and 3 mo of NASH modelling, and using the Barnes maze at 6 mo of NASH induction. Following 3 mo of NASH induction, needle electroneuromyography (ENMG) was performed on the gastrocnemius and biceps muscles with the electrical stimulation of the sciatic and musculocutaneous nerves, respectively. Liver pathology was confirmed by histomorphology. Statistical analysis was performed using Prism 10.2.3 and R 4.2.3 with RStudio 2024.09.0.

Results and discussion. Experimental modelling was associated with poorer overall survival ($p < 0.05$, $p < 0.01$) and substantial evidence of liver injury, i.e. cholestatic hepatitis, medio- and macrovesicular steatosis, focal necrosis and fibrosis of varying severity ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Mice with NASH exhibited markers of elevated anxiety in the OF, EPM, and LDB tests ($p < 0.05$, $p < 0.01$), which were mostly specific to the very onset of liver disease (1 mo) as well as its later stages (6 mo). NASH was also associated with a significant decrease in spontaneous alternation at 3 mo ($p < 0.01$), negative object disrimination at 2 mo ($p < 0.05$), and poorer memory retention in the Barnes maze ($p < 0.05$, $p < 0.01$) compared with Control. ENMG data analysis revealed significantly lower peak M-wave amplitudes ($p < 0.01$) and threshold currents ($p < 0.05$) in the gastrocnemius, and increased peak latency in the biceps in the NASH group ($p < 0.05$).

Conclusion. Experimental alimentary/toxic NASH in male C57Bl/6 mice is associated with increased anxiety-like behaviour, visuospatial memory acquisition and retention impairment, and evidence of axonal and demyelinating peripheral motor neuropathy.

Keywords: cognitive deficit, memory deficit, behavioural disorders, neuromuscular joint dysfunction, non-alcoholic steatohepatitis, non-alcoholic fatty liver disease

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

© Prikhodko V. A., Orlyakhina D. A., Petrova V. D., Karev V. E., Ivkin D. Yu., Napalkova S. M., Okovityi S. V., 2025
© Приходько В. А., Орляхина Д. А., Петрова В. Д., Карев В. Е., Ивкин Д. Ю., Напалкова С. М., Оковитый С. В., 2025

Contribution of the authors. Sergey V. Okovityi, Veronika A. Prikhodko – experimental design and planning. Veronika A. Prikhodko, Darya A. Orlyakhina, Veronika D. Petrova, Vadim E. Karev – experiment conduction and data analysis. Veronika A. Prikhodko, Vadim E. Karev – visualization. Veronika A. Prikhodko, Vadim E. Karev, Dmitry Yu. Ivkin, Svetlana M. Napalkova, Sergey V. Okovityi – manuscript writing and review.

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

For citation: Prikhodko V. A., Orlyakhina D. A., Petrova V. D., Karev V. E., Ivkin D. Yu., Napalkova S. M., Okovityi S. V. Experimental murine non-alcoholic steatohepatitis is associated with behavioural, cognitive, and peripheral neuronal dysfunction. *Drug development & registration*. 2025;14(1):319–331. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1994

Экспериментальный неалкогольный стеатогепатит у мышей ассоциирован с поведенческими, когнитивными и периферическими нейрональными нарушениями

В. А. Приходько[1]✉, Д. А. Орляхина[1], В. Д. Петрова[1], В. Е. Карев[2], Д. Ю. Ивкин[1], С. М. Напалкова[1], С. В. Оковитый[1]

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

[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9

✉ **Контактное лицо:** Приходько Вероника Александровна. **E-mail:** veronika.prihodko@pharminnotech.com

ORCID: В. А. Приходько – https://orcid.org/0000-0002-4690-1811;
Д. А. Орляхина – https://orcid.org/0009-0003-3505-7904;
В. Д. Петрова – https://orcid.org/0009-0004-6299-7608;
В. Е. Карев – https://orcid.org/0000-0002-7972-1286;
Д. Ю. Ивкин – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864;
С. М. Напалкова – https://orcid.org/0000-0002-9216-8673;
С. В. Оковитый – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Статья поступила: 05.11.2024 **Статья принята в печать:** 23.12.2024 **Статья опубликована:** 26.12.2024

Резюме

Введение. Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) – на сегодняшний день ведущая причина хронической патологии печени во всем мире – ассоциированы с широким спектром психоневрологических осложнений и заболеваний. Тем не менее в настоящий момент аспекты причинно-следственной связи между патологией печени и нервной системы изучены не до конца, что обусловливает необходимость разработки соответствующих клинически релевантных и валидных животных моделей.

Цель. Целью настоящей работы стала оценка кратко- и долгосрочных психоневрологических и периферических нейрональных нарушений, осложняющих течение различных стадий НАЖБП/НАСГ у мышей.

Материалы и методы. 68 взрослых мышей-самцов линии C57Bl/6 рандомизировали на группы «Контроль» и «НАСГ». НАСГ моделировали в течение 3 (эксперимент 1) или 6 (эксперимент 2) мес. при помощи комбинированной модели, включающей высокожировую диету и введение низких доз тетрахлорметана. Контрольные животные получали стандартный комбикорм, питьевую воду и физиологический раствор в эквивалентных объемах. Поведение животных оценивали через 1, 2, 3 и 6 мес индукции НАСГ в тестах «Открытое поле» (ОП), «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Черно-белая камера» (ЧБК). Визуально-пространственную память оценивали с помощью тестов «Спонтанное чередование в Т-лабиринте» и «Распознавание нового объекта» через 1, 2 и 3 мес. индукции НАСГ, а также с помощью теста «Лабиринт Барнс» через 6 мес. индукции НАСГ. Через 3 мес. моделирования НАСГ выполняли игольчатую электронейромиографию (ЭНМГ) икроножной мышцы и двуглавой мышцы плеча при электрической стимуляции седалищного и мышечнокожного нервов соответственно. Патологию печени верифицировали гистоморфологически. Статистическую обработку данных проводили в программе Prism 10.2.3 и среде R 4.2.3 с RStudio 2024.09.0.

Результаты и обсуждение. Экспериментальное моделирование сопровождалось снижением общей выживаемости животных ($p < 0,05$, $p < 0,01$) и признаками выраженного поражения печени, включая холестатический гепатит, средне- и крупнокапельный стеатоз, очаги некроза и фиброз различной степени тяжести ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Мыши с НАСГ демонстрировали признаки повышения тревожности в тестах ОП, ПКЛ и ЧБК ($p < 0,05$, $p < 0,01$), которые были наиболее выражены на самых начальных (1 мес.) и более поздних (6 мес.) стадиях болезни. НАСГ был также ассоциирован со значительным снижением частоты спонтанного чередования в 3 мес. ($p < 0,01$), отрицательной дискриминацией объектов

в 2 мес. ($p < 0,05$) и ухудшением ретенции памятного следа в «Лабиринте Барнс» ($p < 0,05$, $p < 0,01$) по сравнению с контролем. При проведении ЭНМГ в икроножной мышце у мышей с НАСГ наблюдали значительное снижение максимальной амплитуды М-ответа ($p < 0,01$) и пороговой силы тока ($p < 0,05$), в двуглавой мышце плеча – увеличение латентности максимального ответа ($p < 0,05$).

Заключение. Экспериментальный алиментарно-токсический НАСГ у мышей-самцов линии C57Bl/6 ассоциирован с повышением тревожности, нарушением формирования и ретенции визуально-пространственного памятного следа, а также признаками аксонально-демиелинизирующей периферической моторной нейропатии.

Ключевые слова: когнитивный дефицит, мнестический дефицит, поведенческие нарушения, нейромышечные нарушения, неалкогольный стеатогепатит, неалкогольная жировая болезнь печени

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

Вклад авторов. С. В. Оковитый, В. А. Приходько – идея и планирование эксперимента. В. А. Приходько, Д. А. Орляхина, В. Д. Петрова, В. Е. Карев – проведение экспериментов и обработка данных. В. А. Приходько, В. Е. Карев – подготовка иллюстраций. В. А. Приходько, В. Е. Карев, Д. Ю. Ивкин, С. М. Напалкова, С. В. Оковитый – подготовка и редактура рукописи.

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

Для цитирования: Приходько В. А., Орляхина Д. А., Петрова В. Д., Карев В. Е., Ивкин Д. Ю., Напалкова С. М., Оковитый С. В. Экспериментальный неалкогольный стеатогепатит у мышей ассоциирован с поведенческими, когнитивными и периферическими нейрональными нарушениями. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):319–331. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1994

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (recently suggested to be replaced by metabolic-associated steatotic liver disease, MASLD) is an umbrella term including a range of chronic conditions characterized by excessive hepatic lipid accumulation, defined by the presence of steatosis in >5 % of hepatocytes, in the absence of excessive alcohol consumption or other plausible causes of toxic liver injury [1]. The global prevalence of NAFLD today exceeds 30 %, which makes it the leading cause of chronic liver disease worldwide [2]. About 20 % of NAFLD cases are classified as non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which has a substantially higher risk of progression to liver fibrosis, cirrhosis, and end-stage liver disease as well as complication by hepatocellular carcinoma [3]. Due to the above, NAFLD and NASH are predicted to emerge as the main indication for liver transplantation in developed and developing countries in the next decade [2].

While NAFLD and NASH have long been known to correlate closely with cardiometabolic disease, their association with psychoneurological symptoms and conditions remains relatively underexplored. Mounting evidence suggests that NAFLD patients are at a greater risk of brain volume reduction and premature brain aging, exhibit signs of cognitive, memory, and psychomotor impairment, and are more likely to suffer from affective disorders, schizophrenia, vascular dementia and neurodegenerative conditions [4, 5]. Nevertheless, the underlying causal relationship between liver disorders and their neuronal complications remains ambiguous, which warrants the development of clinically relevant and valid animal models. We have previously reported distinct cognitive and behavioural deficits observed in murine NAFLD [6, 7]; however, to the best of our knowledge, their complex temporal patterns and dynamics have not yet been characterized in detail.

In view of the above, this work was carried out **in order to** characterize the short- and long-term psychoneurological and peripheral neuronal deficits that complicate different stages of NAFLD/NASH in mice, using behavioural testing and needle electroneuromyography.

MATERIALS AND METHODS

Animal experiments were conducted in full compliance with the principles of the Basel Declaration, 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", and was approved by the Bioethics Committee of the St. Petersburg

State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (protocol M-OE-02; 21 January 2020).

68 young adult (2 months old) male C57Bl/6 mice weighing 18-20 g were purchased from the Rappolovo laboratory animal supplier (Leningrad Oblast, Russia) in a single shipment, quarantined for 2 weeks, then housed in a standard animal facility with *ad libitum* access to standard chow (Laboratorkorm, Russia) and drinking water. In order to assess both the short- and long-term neurological complications of NASH, two experiments were conducted, with the animals randomized by random sequence generation into the following groups:

1. Control (Experiment 1: $n = 10$; Experiment 2: $n = 14$): standard chow + drinking water + 0.9 % NaCl intraperitoneally (i/p) weekly (q.wk.).
2. NASH (Experiment 1: $n = 30$; Experiment 2: $n = 14$): high-fat chow + 42 $g \cdot L^{-1}$ D-fructose (high-fat diet, HFD) + 0.32 $mg \cdot kg^{-1}$ b.w. carbon tetrachloride (CCl_4) i/p q.wk.

The experimental design is shown in Figure 1.

NASH was induced using the combined diet/chemical model described by Tsuchida et al. [8]. The high-fat chow was prepared *ex tempore* and consisted of 36.65 % standard chow, 21.10 % beef tallow, 41.00 % D-fructose, and 1.25 % cholesterol. In addition, the mice in the NASH group were offered a 42 $g \cdot L^{-1}$ aqueous D-fructose solution to drink, and injected i/p weekly with 0.32 $mg \cdot kg^{-1}$ CCl_4 as an accelerant. Mortality was recorded daily, and body weights were measured weekly throughout the experiment.

Animal locomotor activity and behaviour were assessed at 1, 2, 3, and 6 months of NASH induction using the Open field (OF), Elevated plus maze (EPM), and Light/dark box (LDB) tests (Open Science, Russia). Animal movement was video recorded for 3 min, then analyzed using VideoMot2 3.0.1 (TSE Systems GmbH, Germany) (OF and LDB) or RealTimer 1.30 (Open Science, Russia) (EPM).

In the OF test, distance covered (cm), mean velocity ($cm \cdot s^{-1}$), time in centre (s), total freezing duration (s), and the frequencies of freezing, line crossing, rearing, grooming, and hole peeking were registered [9]. In the EPM test, time spent in the open arms, closed arms, and centre (s), the number of entries into the open and closed arms, and the frequencies (min^{-1}) of rearing, grooming, head dipping, and peeking out were registered [10]. In the LDB test, time spent (s) and distance covered (cm) in the light chamber (LC), mean velocity ($cm \cdot s^{-1}$), total freezing duration (s), frequencies (min in the LC^{-1}) of freezing, grooming, rearing and peeking out (min in the dark chamber $(DC)^{-1}$), total number of transitions, latency to enter the DC for the 1st time (s), and the duration of the 1st DC visit (s) were registered [11].

Short-term visuospatial memory was assessed at 1, 2, and 3 months of NASH induction using the Spontaneous alternation in the T-maze (SATM) and Novel object

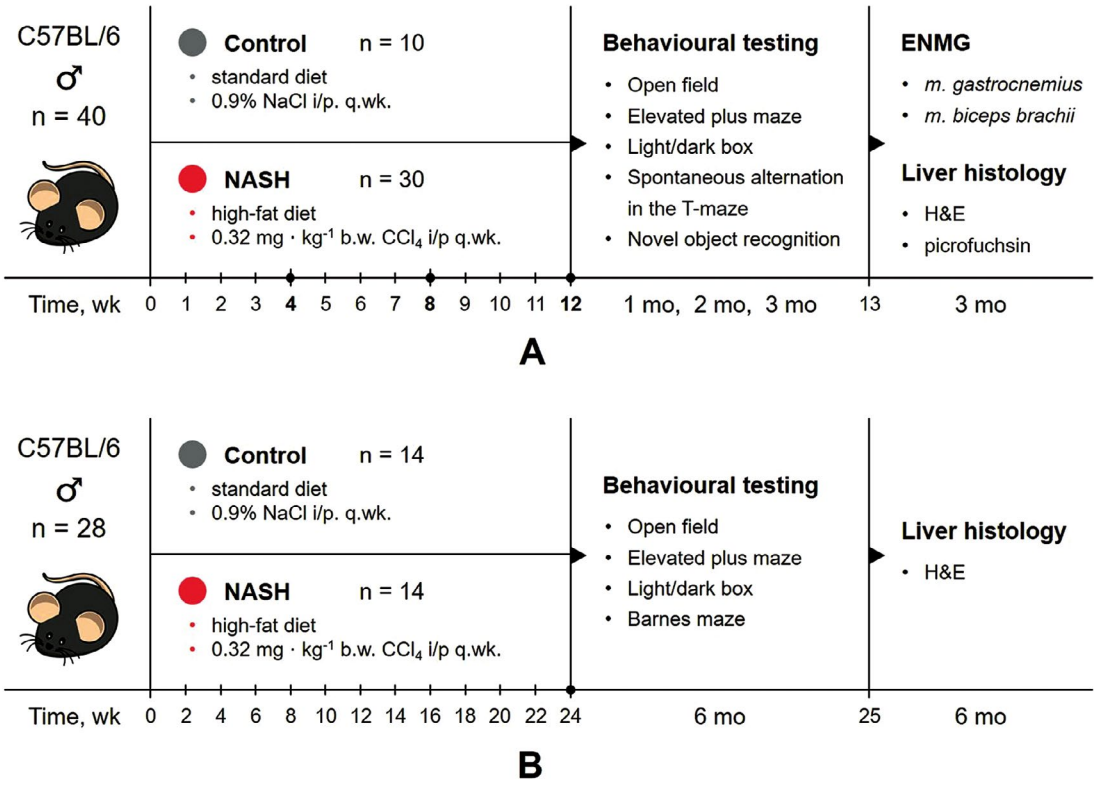


Figure 1. Design of Experiments 1 (A) and 2 (B). i/p, intraperitoneally; b.w., body weight; q.wk., weekly; ENMG, electroneuromyography; H&E, haematoxylin and eosin

recognition (NOR) tests (Open Science, Russia). In the SATM test, spontaneous alternation percentage was assessed live by an experienced researcher, in 3 trials per animal [12]. In the NOR test, total object exploration time (s) and novel object exploration time (s) were registered, and the discrimination index was calculated as described previously [13]. In addition, at 6 months of NASH induction, the Barnes maze test (Open Science, Russia) was conducted to assess short- and long-term visuospatial memory. During the 4-day training session, the mice were given 4 attempts (each 3 min long) per day to explore the maze and find the target hole, connected to the escape box. On days 5 and 12, a single trial (1.5 min long) was conducted, and total search time (s) and the number of errors (nose poking into the wrong holes) were registered [14].

Electroneuromyographic (ENMG) study was performed at 3 months of NASH induction under chloral hydrate (400 mg · kg^{-1} b.w.) anaesthesia using a Neuro-MEP-8 8-channel system with the Neuro-MEP.NETω 3.7.3.7 software (Neurosoft, Russia). M-waves were registered in the left *m. gastrocnemius* (MG) and right *m. biceps brachii* (MBB) following electrical stimulation (0.1 ms, square, from 1 to 10 mA in increments of 1 mA) of the left *n. ischiadicus* and right *n. musculocutaneus*, respectively [15]. Peak amplitude (mV), threshold and peak currents (mV), peak latency (ms), mean duration (mV), and mean area (mV · ms) were registered for each M-wave series.

Following the completion of all experiments, the animals were euthanized via carbon dioxide inhalation, and liver tissue samples were obtained for morphological analysis. The samples were fixed in 10 % neutral formalin, dehydrated, cleared in isopropyl alcohol, and embedded in paraffin according to conventional protocols. 4 µm-thick sections were prepared from paraffin blocks using a HM340 rotary microtome (Thermo Scientific, UK), mounted on slides, stained with haematoxylin and eosin or van Gieson's picrofuchsin, and cover-slipped. Whole slide imaging was performed using a Pannoramic MIDI automatic digital slide scanner with the Pannoramic Scanner Software for Research (3DHISTECH Kft, Hungary).

For each tissue sample, hepatitis activity (according to the METAVIR-A system), steatosis, hepatocellular ballooning (HCB), cholestasis, necrosis, periportal fibrosis (PPF), central vein fibrosis (CVF), perisinusoidal fibrosis (PSF), and bridging fibrosis (BF) were scored as 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate), or 3 (severe). Liver fibrosis was also staged according to the METAVIR-F system as F0 (no fibrosis), F1 (portal fibrosis without septa), F2 (portal fibrosis with few septa), or F3 (numerous septa without cirrhosis) [16].

Statistical analysis was performed using Prism 10.2.3 (GraphPad Software, USA) and R 4.2.3 (R Foundation for Statistical Computing, Austria) with RStudio 2024.09.0 (Posit Software PBC, USA). Schoenfeld residuals were calculated to check the proportional hazard assumption. Since the assumption was met ($p = 1$ for both experiments), the survival functions were compared using the log-rank (Mantel-Cox) test, and hazard ratios (HR) were calculated by the Mantel-Haenszel method using the 'survival' 3.6-4 package for R. Histological score analysis was carried out as described previously [17] by extended Fisher's exact test with the Bonferroni correction for pairwise comparisons, using the 'RVAideMemoire' 0.9-81-2 package for R. Median score totals were compared using Mood's test. Zone preference in the LDB test was analyzed using the chi-squared test.

Other numerical data were tested for normality using the Shapiro-Wilk W-test. For normally distributed data, the significance of differences between group means was tested using Student's t-criterion; otherwise, the Mann – Whitney test was used. The significance threshold was set at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

By 3 months of Experiment 1, 100.0 % and 43.3 % of the Control and NASH mice were alive, respectively. By 6 months of Experiment 2, 100.0 % and 64.3 % of the Control and NASH mice were alive, respectively. HR values for the NASH group were calculated as 5.02 [95 % confidence interval (CI) 1.68; 14.96] and 6.47 [95 % CI 1.09; 38.38] for Experiments 1 and 2, respectively. Overall survival probability functions differed significantly ($p < 0.01$, $p < 0.02$ for Experiments 1 and 2, respectively). Survival analysis results are summarized in Table 1, and the survival curves are shown in Figure 2.

NASH, non-alcoholic steatohepatitis; RMST, restricted mean survival time; SEM, standard error of mean; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

On histology, all Control liver samples exhibited mild-to-moderate cholestatic granulomatous hepatitis. In several samples, micro- and macrovesicular steatosis involving less than 1 % of the hepatocytes, mild HCB, and mild intracellular cholestasis were observed. No signs of necrotic cell death were detected, and all samples were classified as METAVIR F0 (Figure 3).

Table 1. Survival analysis results

Group	Experiment 1 (3 mo)			Experiment 2 (6 mo)		
	RMST [SEM], wk	HR [95% CI]	p	RMST [SEM], wk	HR [95 % CI]	p
Control	12.0 [0.0]	–	–	24.0 [0.0]	–	–
NASH	8.1 [0.8]	5.02 [1.68; 14.96]	< 0.01	18.7 [2.0]	6.47 [1.09; 38.38]	< 0.05

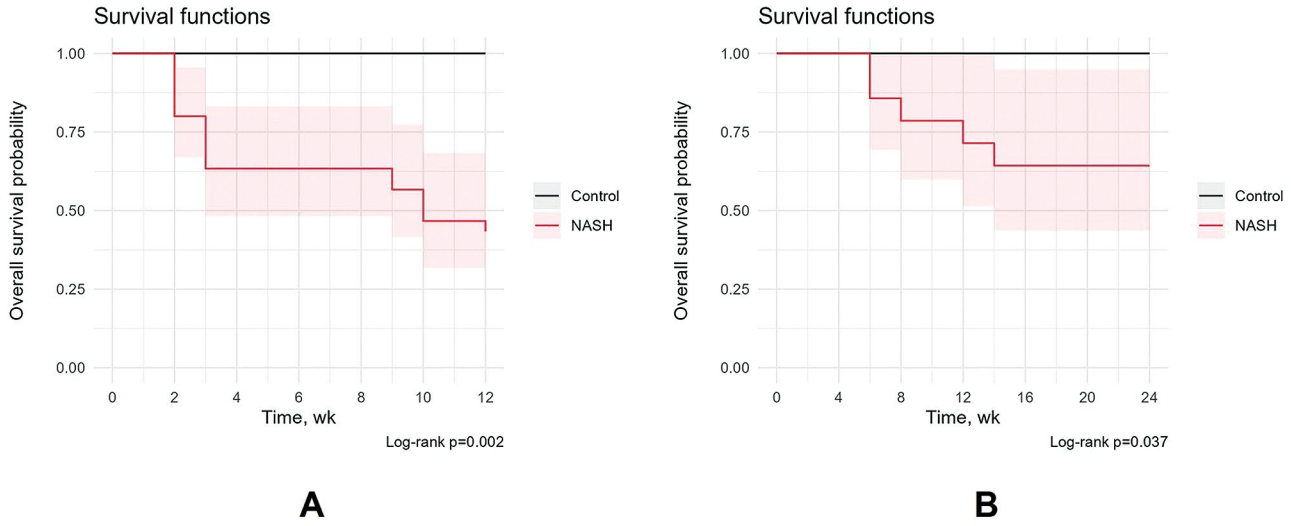


Figure 2. **Kaplan-Meier survival curves for Experiments 1 (A) and 2 (B). NASH, non-alcoholic steatohepatitis**

In the NASH group, substantial evidence of liver injury was found. All samples showed signs of moderate-to-severe cholestatic hepatitis, complicated by centrilobular and/or bridging necrosis in 90 % cases. 40 % samples exhibited mild medio- and macrovesicular steatosis involving up to 5 % of the hepatocytes. HCB varied from mild to severe, and intracellular cholestasis was either moderate or severe in degree. 90 % of the samples were staged as either F2 or F3 according to the METAVIR system; no signs of liver cirrhosis were detected (Figure 3). Based on the histological features described above, the presence of non-alcoholic stea-

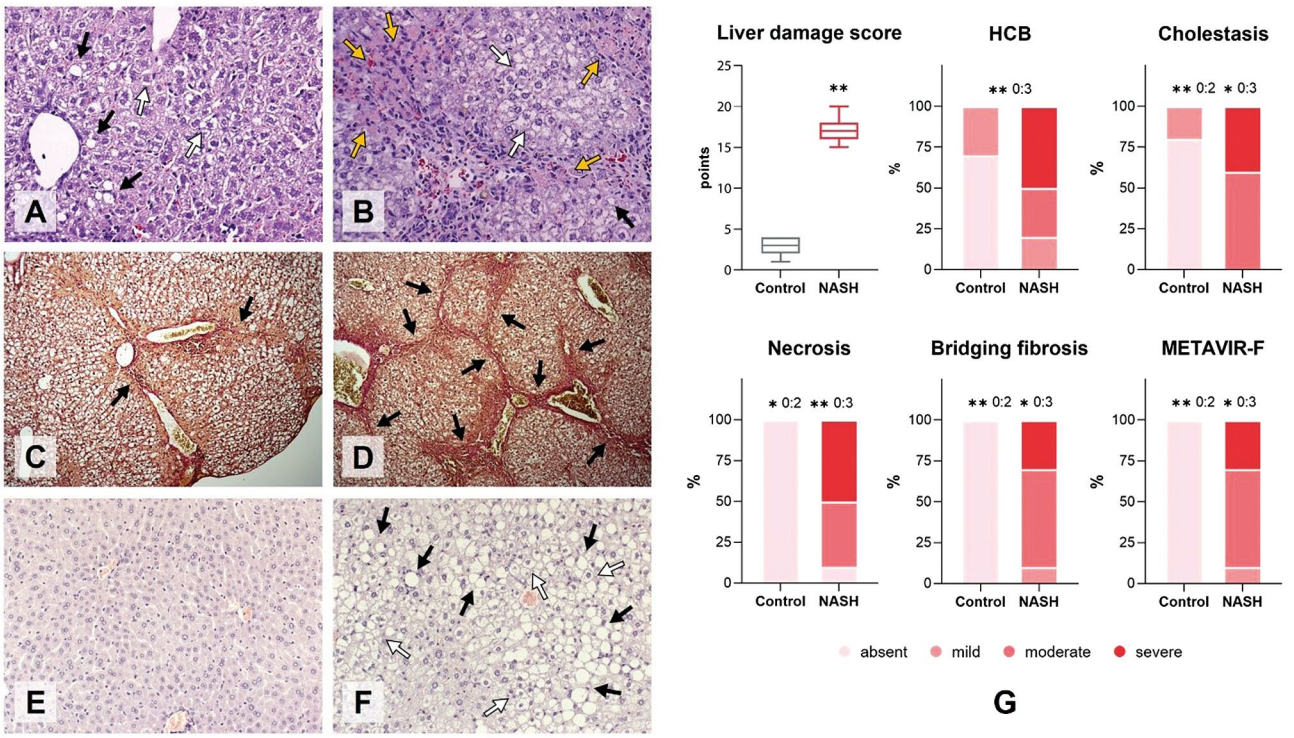


Figure 3. **(A–F) Microphotographs of representative liver samples from the experimental groups (A, C, E, Control; B, D, F, NASH) at 3 (A–D) and 6 (E, F) months of steatohepatitis induction. A, B, E, F, haematoxylin and eosin, ×200. C, D, van Gieson's picrofuchsin, ×100. Black arrows indicate steatosis (A–D) or fibrotic foci (C, D), white arrows, hepatocyte ballooning, yellow arrows, necrotic foci. (G) Liver damage score totals and individual parameter scores. NASH, non-alcoholic steatohepatitis; HCB, hepatocyte ballooning; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$**

tohepatitis, with liver fibrosis of varying severity in some of the cases, was confirmed.

Histological score totals were significantly ($p < 0.01$) higher in the NASH group compared to Control. According to score distribution analysis, NASH was associated with a significant increase in the prevalence of grade 3 HCB ($p < 0.01$), grade 2 and 3 cholestasis ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), grade 2 and 3 necrosis ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), F2 and F3 stage fibrosis ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), and grade 2 and 3 bridging fibrosis ($p < 0.01$ and $p < 0.02$, respectively) (Figure 3).

In the NASH group, a decrease in total freezing duration and an increase in hole poking frequency were observed in the OF test at 1 month of liver disease induction, and an increase in mean velocity, at 2 months ($p < 0.05$ for all) (Figure 4). A decrease in total freezing duration, coupled with an unchanged freezing frequency, implies an irregular, intermittent nature of movement in the OF arena. Taken together with a slight decrease in the number of grooming bouts and an increase in rearing frequency, these findings could be interpreted as signs of agitation, indicative of high baseline anxiety levels and/or sensitization to the aversive stimulus [18, 19]. Although we did not observe increased thigmotaxis, commonly recognized as a universal marker for fear and anxiety [20], this does not necessarily exclude anxiety-like behaviour as the OF test results regarding anxiety states are mostly considered preliminary [21].

In the EPM test, Control mice exhibited an increase in both the time spent in the central zone ($p < 0.01$) and the number of entries into closed arms ($p < 0.05$) at 1 month with a subsequent steady decrease to Intact levels. Rearing frequency was increased at months 1 and 3 ($p < 0.05$ for both) but not 2 (Figure 5). Zone preference remained the same between the groups throughout the experimental period.

At 2 months, Control mice spent less time in the light chamber of the LDB, and at 3 months, had lower grooming frequency and longer duration of the 1st visit to the DC ($p < 0.05$ for all) (Figure 6). Zone preference shifted significantly in mice with experimental NASH towards the DC at months 2, 3, and 6 (Figure 7).

While high rearing frequency is usually interpreted as a sign of anxiety response [22, 23], the relationship between anxiety levels and grooming frequency can be seen in different perspectives. On the one hand, rodents prefer to groom while feeling safe and not experiencing fear and/or anxiety [24]; on the other hand, however, acute stress response can include frequent but short grooming bouts replacing other activities [25].

Head dipping on the open arms of the EPM may be considered not only directed exploration [26] but also a risk assessment behaviour [27]. Together with the increased number of both open and closed arm visits as well as the changes mentioned above, increased grooming and head dipping frequencies might also indicate elevated anxiety and agitation [25, 28]. Hyperlocomotion and hyperactivity have been described previously as characteristic aspects of depression- and anxiety-like behavioural changes accompanying diet-induced NAFLD in C57Bl/6J mice [29]. High-fat, high-sucrose diet has also been demonstrated to be associated with marked sensitization of rats to aversive stimuli in the OF and EPM tests [23]. Notably, the changes in mouse behaviour in the OF, EPM, and LDB tests mostly had a distinct biphasic nature, tending to invert towards the end of the study period compared to earlier time points, which may be indicative of underlying metabolic adaptation processes in the surviving animals.

In the SATM test, at all experimental time points, Control specimens alternated 70–73 % of the time, which is consistent with literature data for healthy mice [12]. NASH was associated with a steady decrease in the spontaneous alternation rate, which became statistically significant at 3 months ($p < 0.01$) (Figure 8). In the NOR test, Control mice spent over 50 % of the time exploring the novel object, indicating positive object discrimination and reflecting novelty preference, at all time points [13]. At 2 months, mice with NASH spent significantly ($p < 0.01$) less time exploring the novel object, resulting in a negative mean discrimination index (Figure 8).

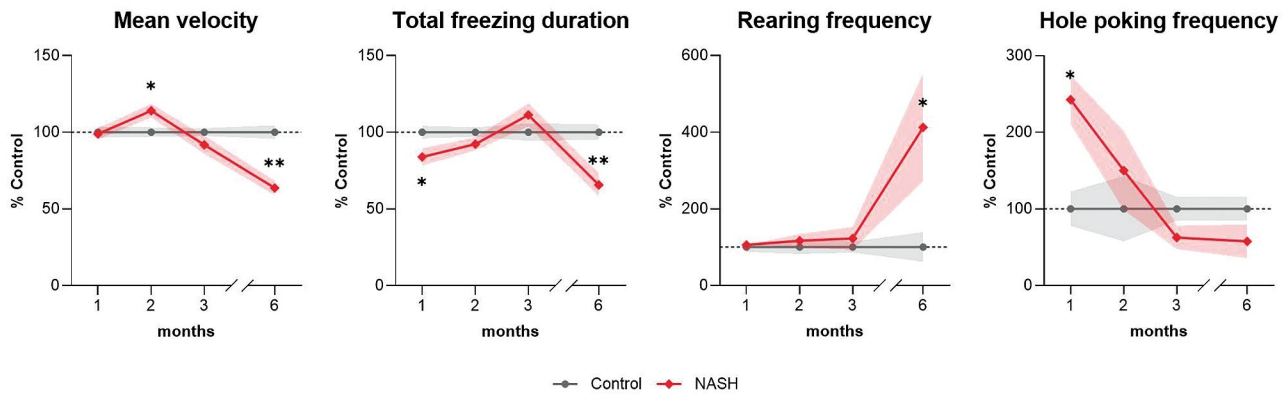


Figure 4. Open field test results at 1, 2, 3, and 6 months of steatohepatitis induction, normalized to respective Control values (mean; SEM). NASH, non-alcoholic steatohepatitis; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

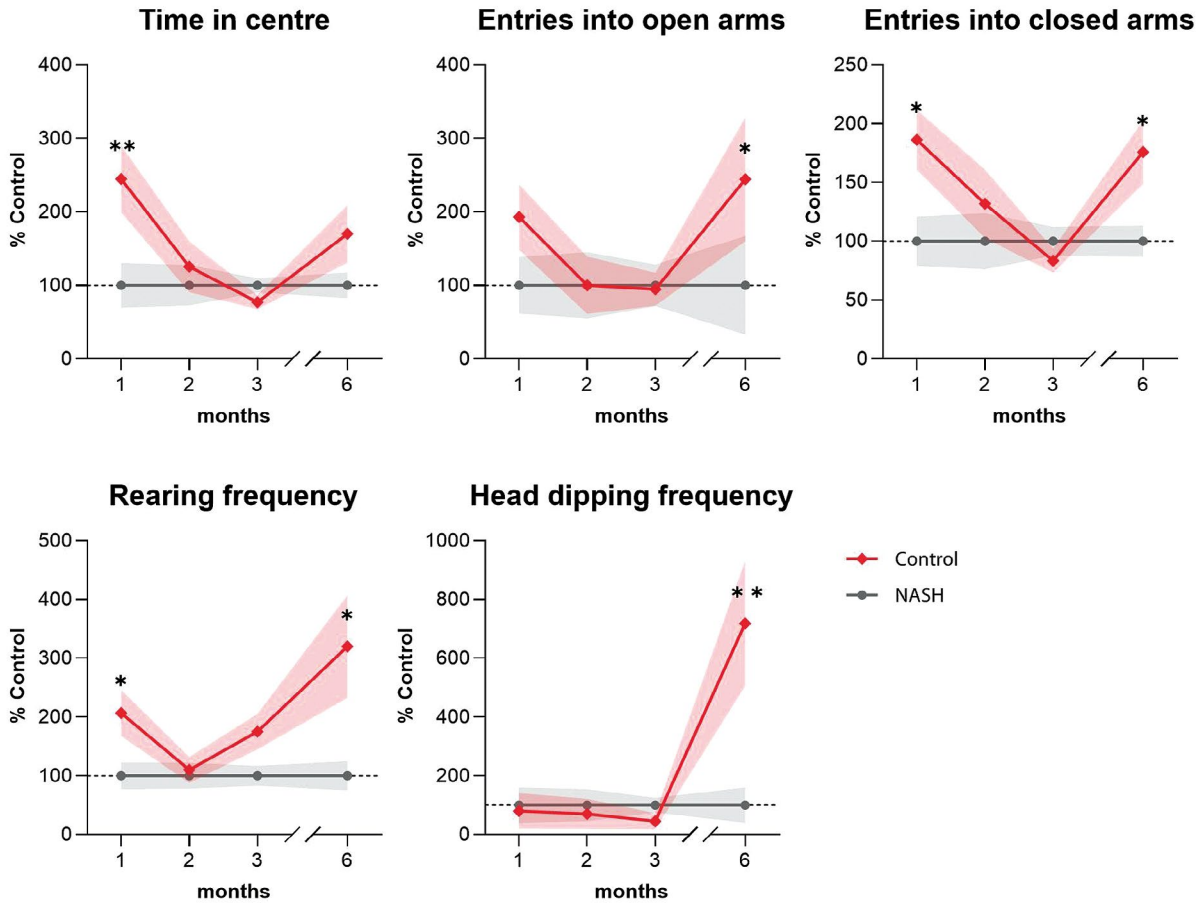


Figure 5. Elevated plus maze test results at 1, 2, 3, and 6 months of steatohepatitis induction, normalized to respective Control values (mean; SEM). NASH, non-alcoholic steatohepatitis; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

In the Barnes maze, both groups of mice exhibited similar results during training, taking significantly less time to find the target hole and making less errors over time ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Figure 9, A). On trial day 5, mice with NASH managed to find the target hole with significantly ($p < 0.01$) less errors than Control mice, which generally reflects a better overall performance, but can also be a consequence of decreased exploration. On trial day 12, the NASH group demonstrated significantly ($p < 0.05$ for search time, $p < 0.01$ for errors) poorer performance compared with day 5, while Control specimens maintained their results (Figure 9, B). This evidences impaired retention of visuospatial information in mice with liver disease [14].

As observed in the SATM test, the short-term spatial memory steadily declined over the experimental period, with the difference from healthy animals reaching significance at 3 months of NASH induction. Selective impairment of allocentric spatial learning, processing, and memory retention without loss of visual reference memory is commonly observed in animals with hippocampal lesions [30, 31]. A study in rats with HFD-induced NASH, hyperammonaemia, and gut dysbiosis reported impaired learning and performance in the Barnes maze, possibly arising from metabolic and toxic damage to the prefrontal cortex [32].

In a close analogue of the Barnes maze, the Morris water maze, rats with a similar model of alimentary NASH exhibited poor memory retention while maintaining normal learning ability, possibly explained by the presence of additional non-visual cues [33]. Short-term spatial memory dysfunction in chronic liver disease has been shown to correlate with decreased metabolic activity in the entorhinal cortex, thalamus, hippocampus, amygdalae, and mammillary bodies as well as a general reduction of white and gray matter volume [32, 34, 35].

Progressive NAFLD induces endothelial dysfunction, microglial activation and cell death in the hippocampus and prefrontal cortex [36]. Elevated serum ammonia levels, besides causing direct neuronal and glial cell damage, potentiate dopamine catabolism, induce neurosteroid synthesis, repress γ-aminobutyric acid (GABA) production, and promote N-methyl-D-aspartate receptor expression, leading to general depression of the central nervous system (CNS) due to $GABA_A$ receptor sensitization [37].

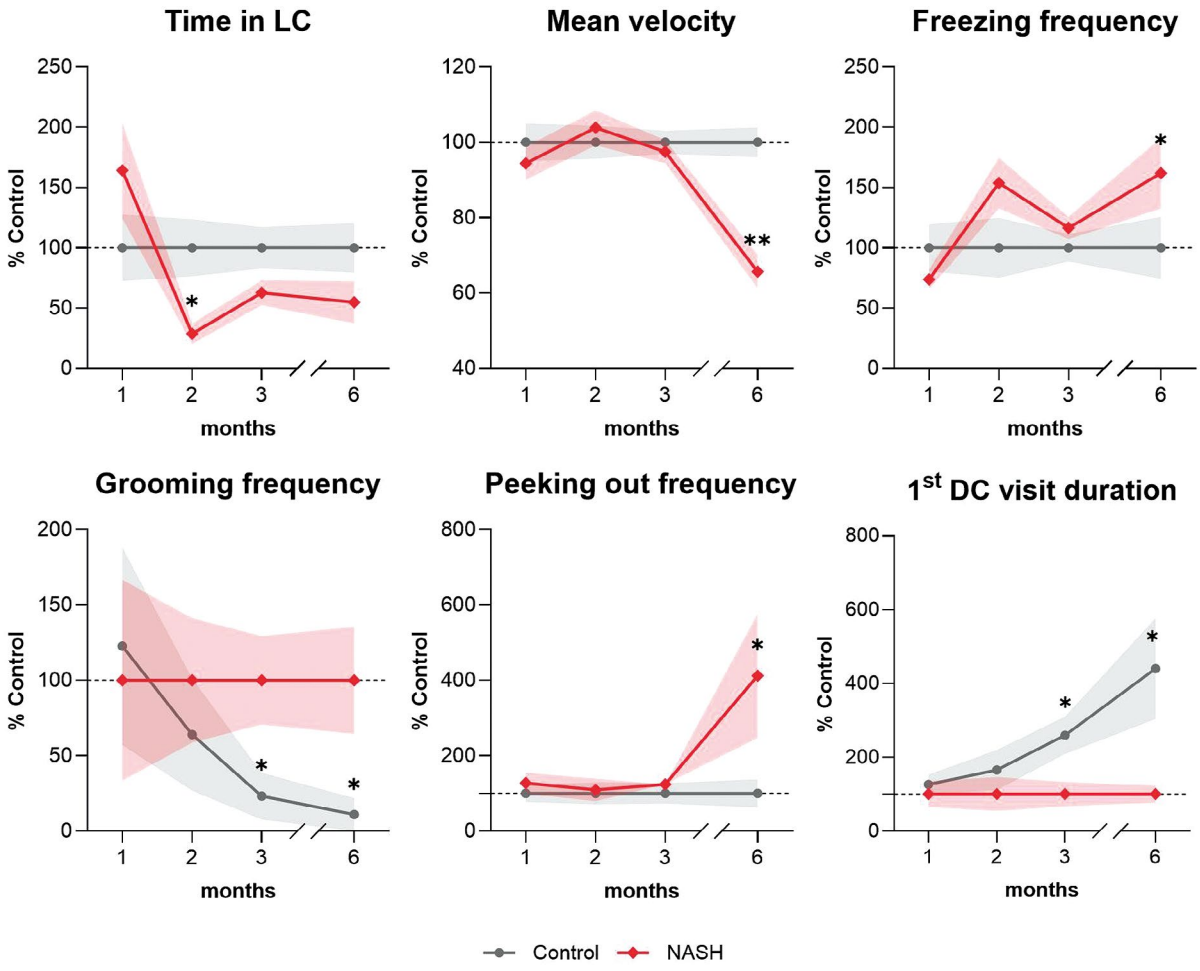


Figure 6. **Light/dark box test results at 1, 2, 3, and 6 months of steatohepatitis induction, normalized to respective Control values (mean; SEM). NASH, non-alcoholic steatohepatitis; LC, light chamber; DC, dark chamber; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$**

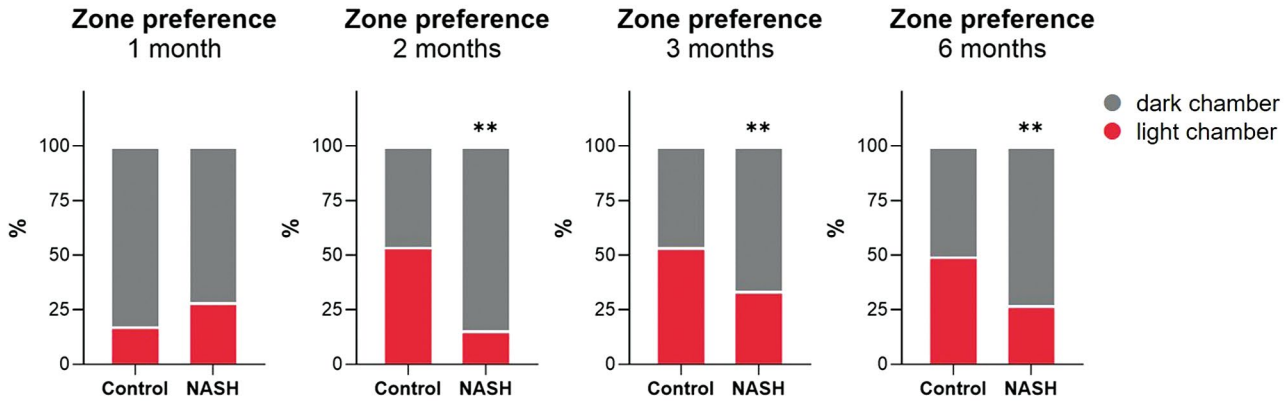


Figure 7. **Light/dark box zone preference at 2, 3, and 6 months of steatohepatitis induction. NASH, non-alcoholic steatohepatitis; ** $p < 0.01$**

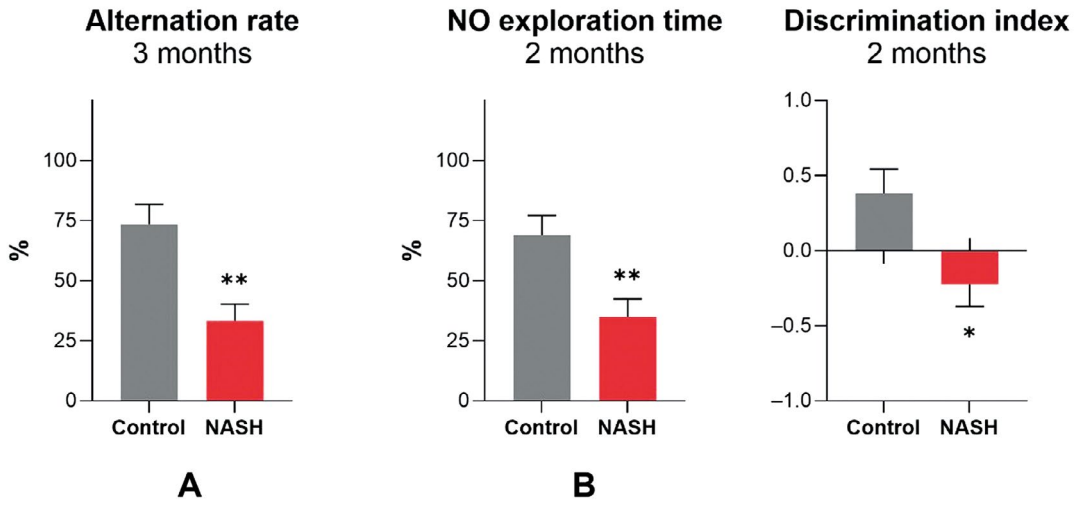


Figure 8. **(A) Rate of spontaneous alternation in the T-maze at 3 months of steatohepatitis induction. (B) Novel object recognition test results at 2 months of steatohepatitis induction (mean; SEM). NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NO, novel object; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$**

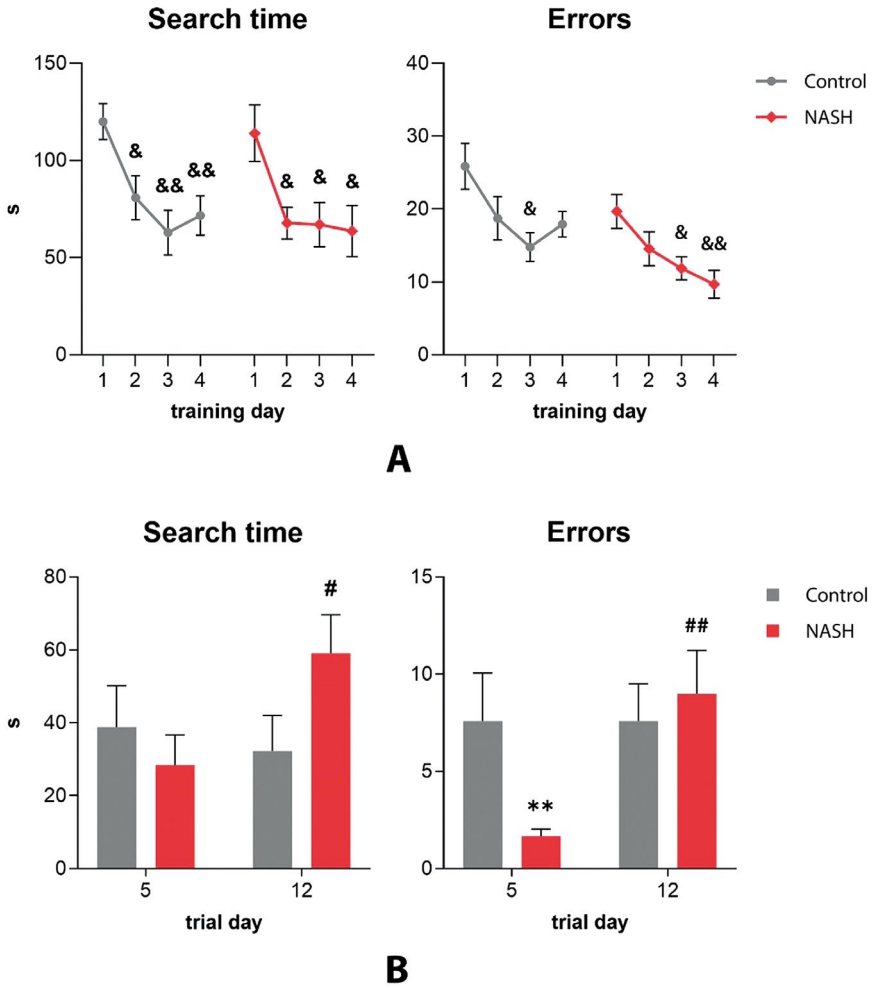


Figure 9. **(A) Results dynamics in the Barnes maze during the training period (mean; SEM). & $p < 0.05$ vs. own group on day 1; && $p < 0.01$ vs. own group on day 1. (B) Trial results in the Barnes maze (mean; SEM). NASH, non-alcoholic steatohepatitis; ** $p < 0.01$ vs. Control; # $p < 0.05$ vs. own group on day 5; ## $p < 0.01$ vs. own group on day 5**

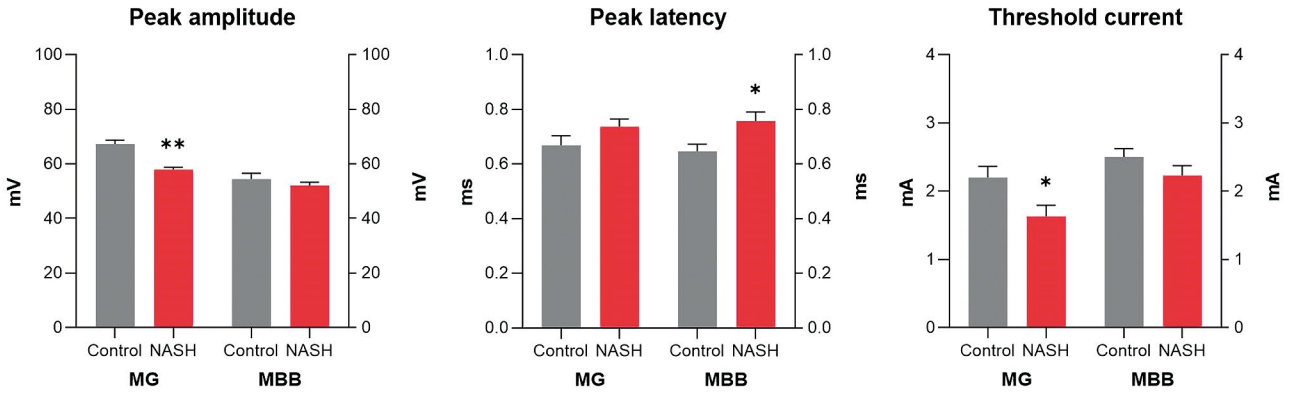


Figure 10. Parameters of M-waves induced by single-stimulus electrical nerve stimulation (mean; SEM). MG, *m. gastrocnemius*; MBB, *m. biceps brachii*; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; * p < 0.05; *** p < 0.01.

Neurotransmitter metabolism alterations in the CNS that are observed in NASH and may be relevant to visuospatial memory decline include a decrease in dopamine levels in the prefrontal cortex and cerebellum and a decrease in noradrenaline in the striatum [32] as well as increased activity of acetylcholine esterase and monoamine oxidases [38]. Gut dysbiosis and the subsequent endotoxinaemia represent another link connecting NASH and memory deficits, possibly through hippocampal Toll-like receptor 4/brain-derived neurotrophic factor [39], insulin, insulin-like growth factor 1, and other signaling pathways [37].

Two small-scale observational clinical studies (n = 44, n = 213) reported visuospatial memory deficits in NAFLD subjects, according to MoCA (Montreal cognitive assessment) and RBANS (Repeatable battery for the assessment of neuropsychological status) scales [40, 41]. In a case-control study (n = 208), the results of the Line tracing test, which is commonly used to assess visuospatial function in minimal hepatic encephalopathy, were normal in patients with liver steatosis, but significantly poorer in those with NASH, liver fibrosis, or cirrhosis [42]. Visuospatial memory deficits can also be present in non-alcoholic liver cirrhosis in the absence of overt hepatic encephalopathy [43].

The transient nature of short-term recognition memory could possibly be explained by the adaptation of metabolic processes and CNS function developing over time. Both spatial and recognition memory are hippocampus-dependent, but spatial memory performance requires more hippocampal tissue and resource than does recognition memory. In an experimental study in rats, spatial memory declined after bilateral dorsal lesions that encompassed 30–50 % total volume of the hippocampus, while object recognition only became impaired when 75–100 % of the hippocampus was damaged [44].

ENMG data analysis revealed significantly lower peak M-wave amplitudes ($p < 0.01$) and threshold currents ($p < 0.05$) in *m. gastrocnemius*, and increased peak latency in *m. biceps brachii* in the NASH group ($p < 0.05$) (Figure 10).

The observed decrease in peak M-wave amplitudes in *m. gastrocnemius* might indicate partial loss and/or dystrophic alteration of motor units, reduced excitability and/or conductivity of motor nerve axons, possibly due to their demyelination and/or secondary axon loss. Increased M-wave latency, detected in *m. biceps brachii*, could also be a sign of pathologically reduced action potential propagation velocity, characteristic of demyelinating nerve disease [45].

As histology revealed no signs of myosteatosis, muscle hypotrophy, or sarcopenia (data not shown), the observed neuromuscular joint dysfunction can be concluded to most probably result from direct motor nerve damage accompanying chronic liver injury. Clinical studies have previously found different stages of NAFLD to induce predominantly axonal motor, sensory, and autonomic neuropathy [46–48] as well as promote peripheral polyneuropathy in type II diabetes mellitus [49, 50]. However, the aforementioned observations are likely indicative of combined axonal and demyelinating peripheral motor neuropathy associated with NASH and liver fibrosis.

CONCLUSION

Using behavioural testing and needle electroneuromyography, we analyzed a spectrum of central and peripheral neuronal deficits in mice with different stages of experimental NASH. Behavioural alterations were mostly represented by a biphasic increase in anxiety-like behaviour, observed both at the very onset and in later stages of liver disease. Working visuospatial memory deficit appeared to be positively correlated with liver disease severity, while object recognition memory only underwent a transient impairment with subsequent compensation. Abnormal ENMG results suggested the presence of combined axonal and demyelinating

peripheral motor neuropathy. These observations support the relevance and validity of combined alimentary and toxic murine NASH models for the research of psychoneurological complications of chronic liver disease.

REFERENCES

1. Rinella M. E., Sookoian S. From NAFLD to MASLD: updated naming and diagnosis criteria for fatty liver disease. *Journal of Lipid Research*. 2024;65(1):100485. DOI: 10.1016/j.jlr.2023.100485.
2. Amini-Salehi E., Letafatkar N., Norouzi N., Joukar F., Habibi A., Javid M., Sattari N., Khorasani M., Farahmand A., Tavakoli S., Masoumzadeh B., Abbaspour E., Karimzad S., Ghadiri A., Maddineni G., Khosousi M. J., Faraji N., Keivanlou M.-H., Mahapatro A., Gaskarei M. A. K., Okhovat P., Bahrampourian A., Aleali M. S., Mirdamadi A., Eslami N., Javid M., Javaheri N., Pra S. V., Bakhsi A., Shafipour M., Vakilpour A., Ansar M. M., Kanagala S. G., Hashemi M., Ghazalgoo A., Kheirandish M., Porteghali P., Heidarzad F., Zeinali T., Ghanaei F. M., Hassanipour S., Ulrich M. T., Melson J. E., Patel D., Nayak S. S. Global Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Updated Review Meta-Analysis comprising a Population of 78 million from 38 Countries. *Archives of Medical Research*. 2024;55(6):103043. DOI: 10.1016/j.arcmed.2024.103043.
3. Younossi Z. M., Golabi P., Paik J. M., Henry A., Van Dongen C., Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*. 2023;77(4):1335–1347. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000004.
4. Prikhodko V. A., Okovity S. V. Neuropsychiatric disorders of non-alcoholic fatty liver disease. *Therapy*. 2022;8(7):64–77. DOI: 10.18565/therapy.2022.7.64-77.
5. Lin Y.-K., Cai X.-R., Chen J.-Z., Hong H.-J., Tu K., Chen Y.-L., Du Q. Non-alcoholic fatty liver disease causally affects the brain cortical structure: a Mendelian randomization study. *Frontiers in Neuroscience*. 2024;17:1305624. DOI: 10.3389/fnins.2023.1305624.
6. Prikhodko V. A., Sysoev Yu. I., Poveryaeva M. A., Bunyat A. V., Karev V. E., Ivkin D. Yu., Sukhanov D. S., Shustov E. B, Okovityi S. V. Effects of empagliflozin and L-ornithine L-aspartate on behavior, cognitive functions, and physical performance in mice with experimentally induced steatohepatitis. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2020;3:53–62. DOI: 10.24075/brsmu.2020.034.
7. Prikhodko V. A. Effects of Ornithine Aspartate and Empagliflozin on Memory Deficit Symptoms in Experimental Steatohepatitis. *Journal Biomed*. 2022;18(2):128–132. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-128-132.
8. Tsuchida T., Lee Y. A., Fujiwara N., Ybanez M., Allen B., Martins S., Fiel M. I., Goossens N., Chou H. I., Hoshida Y., Friedman S. L. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *Journal of Hepatology*. 2018;69(2):385–395. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.011.
9. Walsh R. N., Cummins R. A. The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychological Bulletin*. 1976;83:482–504.
10. Walf A. A., Frye C. A. The Use of the Elevated plus Maze as an Assay of Anxiety-Related Behavior in Rodents. *Nature Protocols*. 2007;2:322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
11. Bourin M., Hascoët M. The Mouse Light/Dark Box Test. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463:55–65. DOI: 10.1016/s0014-2999(03)01274-3.
12. Deacon R. M., Rawlins J. N. T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*. 2006;1(1):7–12. DOI: 10.1038/nprot.2006.2.
13. Leger M., Quiedeville A., Bouet V., Haelewyn B., Boulouard M., Schumann-Bard P., Freret T. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*. 2013;8(12):2531–2537. DOI: 10.1038/nprot.2013.155.
14. Barnes C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 1979;93(1):74–104. DOI: 10.1037/h0077579.
15. Pollari E., Prior R., Robberecht W., Van Damme P., Van Den Bosch L. In Vivo Electrophysiological Measurement of Compound Muscle Action Potential from the Forelimbs in Mouse Models of Motor Neuron Degeneration. *Journal of Visualized Experiments*. 2018;(136):57741. DOI: 10.3791/57741.
16. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289–293. DOI: 10.1002/hep.510240201.
17. Prikhodko V. A., Karev V. E., Sysoev Yu. I., Ivkin D. Yu., Okovityi S. V. A Simple Algorithm for Semiquantitative Analysis of Scored Histology Data in the R Environment, on the Example of Murine Non-Alcoholic Steatohepatitis Pharmacotherapy. *Livers*. 2022;2:412–424. DOI: 10.3390/livers2040031.
18. Costall B., Jones B. J., Kelly M. E., Naylor R. J., Tomkins D. M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1989;32(3):777–785. DOI: 10.1016/0091-3057(89)90033-6.
19. Seibenhener M. L., Wooten M. C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;(96):e52434. DOI: 10.3791/52434.
20. Simon P., Dupuis R., Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*. 1994;61(1):59–64. DOI: 10.1016/0166-4328(94)90008-6.
21. Tucker L. B., McCabe J. T. Measuring Anxiety-Like Behaviors in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2021;15:682935. DOI: 10.3389/fnbeh.2021.682935.
22. Díaz-Morán S., Estanislau C., Cañete T., Blázquez G., Ráez A., Tobeña A., Fernández-Teruel A. Relationships of open-field behaviour with anxiety in the elevated zero-maze test: Focus on freezing and grooming. *World Journal of Neuroscience*. 2014;4(1):1–11. DOI: 10.4236/wjns.2014.41001.
23. Eudave D. M., BeLow M. N., Flandreau E. I. Effects of high fat or high sucrose diet on behavioral-response to social defeat stress in mice. *Neurobiology of Stress*. 2018;9:1–8. DOI: 10.1016/j.ynstr.2018.05.005.
24. Kalueff A. V., Tuohimaa P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*. 2004;13(3):151–158. DOI: 10.1016/j.brainresprot.2004.04.002.
25. Kalueff A. V., Keisala T., Minasyan A., Kuuslahti M., Tuohimaa P. Temporal stability of novelty exploration in mice exposed to different open field tests. *Behavioural Processes*. 2006;72(1):104–112. DOI: 10.1016/j.beproc.2005.12.011.

26. Augustsson H., Meyerson B. J. Exploration and risk assessment: a comparative study of male house mice (Mus musculus musculus) and two laboratory strains. *Physiology & Behavior*. 2004;81(4):685–698. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.03.014.
27. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M., Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013;6(3):126–135. DOI: 10.2478/intox-2013-0020.
28. Aduema W., Osim E. E., Nwankwo A. A. Using the elevated plusmaze task in assessing anxiety and fear in swiss white mice. *Journal of Complementary Medicine & Alternative Healthcare*. 2018;6(1):555678.
29. Strekalova T., Evans M., Costa-Nunes J., Bachurin S., Yeritsyan N., Couch Y., Steinbusch H. M. W., Eleonore Köhler S., Lesch K.-P., Anthony D. C. Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015;48:42–47. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.02.015.
30. Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S., Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986;319(6056):774–776. DOI: 10.1038/319774a0.
31. Morris R. G. M., Schenk F., Tweedie F., Jarrard L. E. Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *European Journal of Neuroscience*. 1990;2(12):1016–1028. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1990.tb00014.x.
32. Higarza S. G., Arboleya S., Gueimonde M., Gómez-Lázaro E., Arias J. L., Arias N. Neurobehavioral dysfunction in non-alcoholic steatohepatitis is associated with hyperammonemia, gut dysbiosis, and metabolic and functional brain regional deficits. *PLoS One*. 2019;14(9):e0223019. DOI: 10.1371/journal.pone.0223019.
33. Ross A. P., Bruggeman E. C., Kasumu A. W., Mielke J. G., Parent M. B. Non-alcoholic fatty liver disease impairs hippocampal-dependent memory in male rats. *Physiology & Behavior*. 2012;106(2):133–141. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.01.008.
34. Filipović B., Marković O., Đurić V., Filipović B. Cognitive Changes and Brain Volume Reduction in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018;2018:9638797. DOI: 10.1155/2018/9638797.
35. Nucera S., Ruga S., Cardamone A., Coppoletta A. R., Guarnieri L., Zito M. C., Bosco F., Macrì R., Scarano F., Scicchitano M., Maiuolo J., Carresi C., Mollace R., Cariati L., Mazzarella G., Palma E., Gliozzi M., Musolino V., Cascini G. L., Mollace V. MAFLD progression contributes to altered thalamus metabolism and brain structure. *Scientific Reports*. 2022;12(1):1207. DOI: 10.1038/s41598-022-05228-5.
36. Kim D.-G., Krenz A., Toussaint L. E., Maurer K. J., Robinson S.-A., Yan A., Torres L., Bynoe M. S. Non-alcoholic fatty liver disease induces signs of Alzheimer's disease (AD) in wild-type mice and accelerates pathological signs of AD in an AD model. *Journal of Neuroinflammation*. 2016;13:1. DOI: 10.1186/s12974-015-0467-5.
37. Colognesi M., Gabbia D., De Martin S. Depression and Cognitive Impairment-Extrahepatic Manifestations of NAFLD and NASH. *Biomedicines*. 2020;8(7):229. DOI: 10.3390/biomedicines8070229.
38. Ghareeb D. A., Hafez H. S., Hussien H. M., Kabapy N. F. Non-alcoholic fatty liver induces insulin resistance and metabolic disorders with development of brain damage and dysfunction. *Metabolic Brain Disease*. 2011;26(4):253–267. DOI: 10.1007/s11011-011-9261-y.
39. Mohammed S. K., Magdy Y. M., El-Waseef D. A., Nabih E. S., Hamouda M. A., El-Kharashi O. A. Modulation of hippocampal TLR4/BDNF signal pathway using probiotics is a step closer towards treating cognitive impairment in NASH model. *Physiology & Behavior*. 2020;214:112762. DOI: 10.1016/j.physbeh.2019.112762.
40. An K., Starkweather A., Sturgill J., Salyer J., Sterling R. K. Association of CTRP13 With Liver Enzymes and Cognitive Symptoms in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nursing Research*. 2019;68(1):29–38. DOI: 10.1097/NNR.0000000000000319.
41. Celikbilek A., Celikbilek M., Bozkurt G. Cognitive assessment of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2018;30(8):944–950. DOI: 10.1097/MEG.0000000000001131.
42. Felipo V., Urios A., Montesinos E., Molina I., Garcia-Torres M. L., Civera M., Olmo J. A., Ortega J., Martinez-Valls J., Serra M. A., Cassinello N., Wassel A., Jordá E., Montoliu C. Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2012;27(1):51–58. DOI: 10.1007/s11011-011-9269-3.
43. Tarter R. E., Hegedus A. M., Van Thiel D. H., Schade R. R., Gavaler J. S., Starzl T. E. Nonalcoholic cirrhosis associated with neuropsychological dysfunction in the absence of overt evidence of hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. 1984;86(6):1421–1427.
44. Broadbent N. J., Squire L. R., Clark R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(40):14515–14520. DOI: 10.1073/pnas.0406344101.
45. Chung T., Prasad K., Lloyd T. E. Peripheral neuropathy: clinical and electrophysiological considerations. *Neuroimaging Clinics of North America*. 2014;24(1):49–65. DOI: 10.1016/j.nic.2013.03.023.
46. Chaudhry V., Corse A. M., O'Brian R., Cornblath D. R., Klein A. S., Thuluvath P. J. Autonomic and peripheral (sensorimotor) neuropathy in chronic liver disease: a clinical and electrophysiologic study. *Hepatology*. 1999;29(6):1698–1703. DOI: 10.1002/hep.510290630.
47. Kharbanda P. S., Prabhakar S., Chawla Y. K., Das C. P., Syal P. Peripheral neuropathy in liver cirrhosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2003;18(8):922–926. DOI: 10.1046/j.1440-1746.2003.03023.x.
48. Jain J., Singh R., Banait S., Verma N., Waghmare S. Magnitude of peripheral neuropathy in cirrhosis of liver patients from central rural India. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2014;17(4):409–415. DOI: 10.4103/0972-2327.144012.
49. Sun W., Zhang D., Sun J., Xu B., Sun K., Wang T., Ren C., Li J., Chen Y., Xu M., Bi Y., Xu Q., Wang W., Gu Y., Ning G. Association between non-alcoholic fatty liver disease and autonomic dysfunction in a Chinese population. *QJM*. 2015;108(8):617–624. DOI: 10.1093/qjmed/hcv006.
50. Greco C., Nascimbeni F., Carubbi F., Andreone P., Simoni M., Santi D. Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) with Peripheral Diabetic Polyneuropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(19):4466. DOI: 10.3390/jcm10194466.

Оригинальная статья / Research article

УДК 612.816; 615.272

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1997

Check for updates

CC BY 4.0

Применение метода электростимуляционного утомления для выявления миотропных эффектов препаратов метаболического действия у мышей *db/db*

В. А. Приходько[1, 2]✉, Т. М. Матузок[1, 2], А. Ю. Гришина[1], В. Е. Кованcков[1], Ю. И. Сысоев[3, 4, 5], М. В. Титова[6], Е. В. Попова[6], А. М. Носов[6, 7], Д. Ю. Ивкин[1], С. В. Оковитый[1, 2]

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

[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой Российской академии наук» (ИМЧ РАН). 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, литера А

[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет». Институт трансляционной биомедицины (ФГБОУ ВО СПбГУ, ИТБ). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

[4] Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус» (АНОО ВО «Университет «Сириус»). 354349, Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский проспект, д. 1

[5] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук» (ИФ РАН). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

[6] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии растений им К. А. Тимирязева Российской академии наук» (ИФР РАН). 127276, Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35

[7] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Приходько Вероника Александровна. **E-mail:** veronika.prihodko@pharminnotech.com

ORCID: В. А. Приходько – https://orcid.org/orcid.org/0000-0002-4690-1811;
Т. М. Матузок – https://orcid.org/0000-0002-0269-6078;
А. Ю. Гришина – https://orcid.org/0000-0003-2448-513X;
В. Е. Кованcков – https://orcid.org/0000-0001-5783-8339;
Ю. И. Сысоев – https://orcid.org/0000-0003-4199-5318;
М. В. Титова – https://orcid.org/0000-0002-4571-3712;
Е. В. Попова – https://orcid.org/0000-0002-4655-6974;
А. М. Носов – https://orcid.org/0000-0003-0297-9075;
Д. Ю. Ивкин – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864;
С. В. Оковитый – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Статья поступила: 11.11.2024 **Статья принята в печать:** 24.12.2024 **Статья опубликована:** 26.12.2024

Резюме

Введение. Сахарный диабет II типа (СД-II) представляет собой хроническое заболевание, характеризующееся инсулинорезистентностью, нарушенной толерантностью к глюкозе и гипергликемией. СД-II является доказанным фактором риска развития как периферических нейропатий, так и нарушений мышечной сократимости и функции. Производное бигуанида метформин, экспериментальное соединение малобен и препараты различных видов женьшеня (*Panax* spp.) обладают значительным потенциалом для лечения СД-II и его скелетно-мышечных осложнений. В качестве теста для оценки мышечной сократимости и эффективности ее восстановления Gregory et al. был предложен протокол электростимуляционного утомления (ЭСУ), включающий измерение силы хвата перекладины после утомления двуглавой мышцы плеча высокочастотной электростимуляцией с помощью имплантированных электродов.

© Приходько В. А., Матузок Т. М., Гришина А. Ю., Кованcков В. Е., Сысоев Ю. И., Титова М. В., Попова Е. В., Носов А. М., Ивкин Д. Ю., Оковитый С. В., 2025

© Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Grishina A. Yu., Kovanskov V. E., Sysoev Yu. I., Titova M. V., Popova E. V., Nosov A. M., Ivkin D. Yu., Okovityi S. V., 2025

Цель. В настоящей работе нами была проведена оценка применимости модификации данного протокола для оценки миотропных эффектов метформина, малобена и экстрактов суспензионных культур клеток женьшеня обыкновенного *Panax ginseng* C.A. Mey. (ЖОЭ), ж. вьетнамского *P. vietnamensis* Ha & Grushv. (ЖВЭ) и ж. японского *P. japonicus* (T. Nees) C.A. Mey. (ЖЯЭ) у лептинрезистентных мышей *db/db*, являющихся одной из наиболее популярных современных моделей СД-II.

Материалы и методы. Эксперименты были выполнены на 60 молодых взрослых (2 мес.) мышах-самцах линии C57Bl/Ks-*db*$^{+}$/$^{+}$*m* (*db/db*) массой 45–50 г, рандомизированных на 6 групп: 1) контроль (n = 10; 0,9 % физиологический раствор); 2) ЖОЭ (n = 10; 50 мг/кг); 3) ЖВЭ (n = 10; 50 мг/кг); 4) ЖЯЭ (n = 10; 50 мг/кг); 5) малобен (n = 10; 60 мг/кг); 6) метформин (n = 10; 300 мг/кг). Все препараты вводили внутрижелудочно с помощью зонда 1 р/д в течение 2 мес. По окончании периода лечения измеряли силу хвата (г) передними и всеми четырьмя конечностями с помощью аппарата Grip Strength Meter (TSE Systems, Германия). Методом стимуляционной электронейромиографии анализировали амплитуду М-ответов икроножной мышцы на стимуляцию седалищного нерва одиночными стимулами, а также регистрировали изменение амплитуды М-ответов в течение 5 мин после проведения ЭСУ.

Результаты и обсуждение. По окончании периода лечения не наблюдали значимых межгрупповых различий в силе хвата и амплитуде М-ответов икроножной мышцы при ее стимуляции одиночными стимулами. Контролируемое ЭСУ мышцы приводило к снижению амплитуды ее М-ответа на 18,83–35,23 % от исходного уровня (p < 0,01 для всех групп), причем выраженность этого снижения была значимо меньше в группах ЖВЭ, ЖЯЭ и малобена по сравнению с контролем (p < 0,05). Восстановительный период (5 мин) после ЭСУ характеризовался увеличением амплитуды М-ответа на 10,18–14,79 %, имевшим статистическую значимость во всех группах, кроме ЖОЭ (p < 0,01 в группах контроля, ЖВЭ и ЖЯЭ; p < 0,05 в группах малобена и метформина). Значимые отличия от контроля по результатам восстановительного периода в опытных группах не наблюдались.

Заключение. Предлагаемый протокол ЭСУ представляет собой функциональную пробу, позволяющую оценить эффективность восстановления электрической активности скелетной мышцы после ее контролируемого утомления. Применение описываемого протокола позволило выявить положительное влияние ЖВЭ, ЖЯЭ и малобена, но не ЖОЭ и метформина на краткосрочное восстановление сократимости икроножной мышцы после тетанизации у диабетических мышей *db/db*. Проба с ЭСУ чувствительна к миотропным эффектам препаратов метаболического действия, сравнительно малоинвазивна и подходит для использования в хроническом эксперименте.

Ключевые слова: электростимуляционное утомление, электронейромиография, сократимость мышц, миотропные препараты, сахарный диабет II типа, ожирение, мыши *db/db*, культуры клеток растений

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

Вклад авторов. В. А. Приходько, С. В. Оковитый – идея и планирование эксперимента. М. В. Титова, Е. В. Попова, А. М. Носов – выращивание культур клеток и подготовка биомассы. В. А. Приходько, Т. М. Матузок, А. Ю. Гришина, В. Е. Кованских – проведение экспериментов и обработка данных. В. А. Приходько – подготовка иллюстраций. В. А. Приходько, Ю. И. Сысоев, Д. Ю. Ивкин, С. В. Оковитый – подготовка и редактура рукописи.

Финансирование. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения №075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России, в рамках госпрограммы ГП-47 «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030) (тема № 0113-2019-0006) и проекта № 95445054 Санкт-Петербургского государственного университета. Культуры клеток были получены и поддерживались с использованием оборудования УНУ «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 122042700045-3. Выращивание культур клеток в биореакторах и получение биомассы проводили с использованием оборудований УНУ «Опытный биотехнологический комплекс ИФР РАН» при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 122042600086-7.

Для цитирования: Приходько В. А., Матузок Т. М., Гришина А. Ю., Кованских В. Е., Сысоев Ю. И., Титова М. В., Попова Е. В., Носов А. М., Ивкин Д. Ю., Оковитый С. В. Применение метода электростимуляционного утомления для выявления миотропных эффектов препаратов метаболического действия у мышей *db/db*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):332–348. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1997

Use of an electrical stimulation-induced fatigue protocol to evaluate the myotropic effects of metabolic-active agents in *db/db* mice

Veronika A. Prikhodko[1, 2] ✉, Tatyana M. Matuzok[1, 2], Anna Yu. Grishina[1], Vladislav E. Kovanskov[1], Yuriy I. Sysoev[3, 4, 5], Maria V. Titova[6], Elena V. Popova[6], Aleksandr M. Nosov[6, 7], Dmitry Yu. Ivkin[1], Sergey V. Okovityi[1, 2]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain, RAS. 12A, Akademika Pavlova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia
[3] St Petersburg University. Institute of Translational Biomedicine. 7–9, Universitetskaya emb., Saint-Petersburg, 199034, Russia

[4] Sirius University of Science and Technology. 1, Olimpiyskiy Prospekt, federal territory "Sirius", Krasnodar region, 354349, Russia
[5] I. P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. 6, Makarova emb., Saint-Petersburg, 199034, Russia
[6] K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS. 35, Botanicheskaya str., Moscow, 127276, Russia
[7] Lomonosov Moscow State University. 1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Veronika A. Prikhodko. **E-mail:** veronika.prihodko@pharminnotech.com

ORCID: Veronika A. Prikhodko – https://orcid.org/orcid.org/0000-0002-4690-1811;
Tatyana M. Matuzok – https://orcid.org/0000-0002-0269-6078;
Anna Yu. Grishina – https://orcid.org/0000-0003-2448-513X;
Vladislav E. Kovanskov – https://orcid.org/0000-0001-5783-8339;
Yuriy I. Sysoev – https://orcid.org/0000-0003-4199-5318;
Maria V. Titova – https://orcid.org/0000-0002-4571-3712;
Elena V. Popova – https://orcid.org/0000-0002-4655-6974;
Aleksandr M. Nosov – https://orcid.org/0000-0003-0297-9075;
Dmitry Yu. Ivkin – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864;
Sergey V. Okovityi – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Received: 11.11.2024 **Accepted:** 24.12.2024 **Published:** 26.12.2024

Abstract

Introduction. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic condition characterized by insulin resistance, impaired glucose tolerance, and hyperglycaemia. T2DM is a proven risk factor for peripheral neuropathies as well as muscle contractility and function impairments. The biguanide metformine, experimental compound maloben, and preparations of various *Panax* species have a considerable potential for the treatment of T2DM and its skeletal muscle complications. As a test to evaluate muscle contractility and the effectiveness of its recovery, Gregory et al. have developed a protocol of electrical stimulation-induced fatigue (ESIF) which includes measuring grip strength after fatiguing the *biceps brachii* muscle with high-frequency electrical stimulation using implantable electrodes.

Aim. In this work, we attempted to assess the applicability of a modification of said protocol in order to evaluate the myotropic effects of metformin, maloben, and extracts from suspension cell cultures of *Panax ginseng* C.A. Mey. (PGE), *P. vietnamensis* Ha & Grushv. (PVE), and *P. japonicus* (T. Nees) C.A. Mey. (PJE) in the leptin-resistant *db/db* mice, one of the most popular modern T2DM models.

Materials and methods. The experiments were carried out in 60 young adult (2 months old) male C57Bl/Ks-*db*$^{+}$/$^{+}$*m* (*db*/*db*) mice weighing 45–50 g, randomized into 6 groups: 1) Control ($n = 10$; 0.9 % saline); 2) PGE ($n = 10$; 50 mg/kg); 3) PVE ($n = 10$; 50 mg/kg); 4) PJE ($n = 10$; 50 mg/kg); 5) maloben ($n = 10$; 60 mg/kg); 6) metformin ($n = 10$; 300 mg/kg). All drugs were administered via oral gavage using a feeding tube once daily for 2 months. Following the treatment period, forelimb and all-four limb grip strength (g) was assessed using the Grip Strength Meter (TSE Systems, Germany). Using stimulation electroneuromyography, we measured the compound muscle action potential (CMAP) amplitudes in the gastrocnemius induced by single-stimulus sciatic nerve stimulation, and assessed the dynamics of CMAP amplitudes during the first 5 min following the ESIF protocol completion.

Results and discussion. Following treatment period completion, no significant changes were observed between the groups in grip strength or gastrocnemius CMAP amplitude under single-stimulus stimulation. Controlled ESIF of the muscle caused a 18.83–35.23 % (relative to baseline) decrease in CMAP amplitudes ($p < 0.01$ for all groups) that was significantly smaller in the PVE, PJE, and maloben groups vs. control ($p < 0.05$). The post-ESIF recovery period was associated with a 10.18–14.79 % increase in CMAP amplitudes that was significant in all groups except PGE ($p < 0.01$ for control, PVE, and PJE; $p < 0.05$ for maloben and metformin). No significant differences from control were observed in any of the treatment groups regarding net recovery.

Conclusion. The proposed protocol represents a functional test suitable to assess the recovery effectiveness of electrical activity of a skeletal muscle following its controlled fatigue. Using the described protocol, we were able to detect beneficial effects of PVE, PJE, and maloben (but not PGE or metformin) on the recovery of gastrocnemius contractility following tetanization in diabetic *db*/*db* mice. The ESIF test is sensitive to the myotropic effects of metabolic agents, minimally invasive, and acceptable under chronic experiment conditions.

Keywords: electrical stimulation-induced fatigue, electroneuromyography, muscle contractility, myotropic agents, type II diabetes mellitus, obesity, *db*/*db* mice, plant cell cultures

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. Veronika A. Prikhodko, Sergey V. Okovityi – experiment design and planning. Maria V. Titova, Elena V. Popova, Aleksandr M. Nosov – cell culturing and biomass preparation. Veronika A. Prikhodko, Tatyana M. Matuzok, Anna Yu. Grishina, Vladislav E. Kovanskov – experiment conduction and data analysis. Veronika A. Prikhodko – visualization. Veronika A. Prikhodko, Yuriy I. Sysoev, Dmitry Yu. Ivkin, Sergey V. Okovityi – manuscript writing and review.

Funding. The results of this work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of the Saint-Petersburg Chemical Pharmaceutical University" (agreement No. 075-15-2021-685) with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (MSHE RF), as part of State Program SP-47 "Scientific and

Technological Development of the Russian Federation" (2019–2030) (project 0113-2019-0006), and Project 95445054 of the Saint Petersburg State University. Cell cultures were obtained and maintained using the equipment of the the large-scale research facility "All-Russian Collection of Cell Cultures of Higher Plants" of the IPPRAS (ARCCC HP IPPRAS) and supported by the State Project 122042700045-3 of the MSHE RF. Bioreactor cultivation of plant cell suspensions and biomass production were carried out using the equipment of the large-scale research facility "Experimental Biotechnological Facility" of the IPPRAS (EBF IPPRAS) and supported by the State Project 122042600086-7 of the MSHE RF.

For citation: Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Grishina A. Yu., Kovanskov V. E., Sysoev Yu. I., Titova M. V., Popova E. V., Nosov A. M., Ivkin D. Yu., Okovityi S. V. Use of an electrical stimulation-induced fatigue protocol to evaluate the myotropic effects of metabolic-active agents in *db/db* mice. *Drug development & registration*. 2025;14(1):332–348. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1997

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет II типа (СД-II) представляет собой хроническое эндокринологическое заболевание с чрезвычайно высокой медико-социальной значимостью. Согласно критериям, установленным рекомендациями Российской ассоциации эндокринологов (2022), диагноз СД-II подразумевает наличие повышенного уровня гликированного гемоглобина и/или нарушенной гликемии натощак, отражающее неадекватную регуляцию углеводного обмена организма инсулином. По последним данным, общемировая и российская распространенность СД-II находится на уровне 3,3–6,3 % населения и характеризуется неуклонным ростом [1–3].

В число состояний и заболеваний, имеющих подтвержденную патогенетическую взаимосвязь с СД-II, входит саркопения, характеризующаяся потерей мышечной массы и снижением мышечной функции, ведущими к снижению качества жизни, инвалидизации и повышенной смертности. Считается, что основными факторами развития саркопении у больных СД-II являются инсулинорезистентность и гиперинсулинемия, миостеатоз, хроническое системное воспаление и оксидативный стресс, а также накопление токсичных конечных продуктов гликирования [4].

Мыши C57Bl/Ks-*db*$^{+}$/$^{+}$*m* (*db*/*db*) являются одной из наиболее распространенных генетически детерминированных *in-vivo*-моделей СД-II. Вследствие гомозиготности по миссенс-мутантному гену рецептора лептина эти мыши нечувствительны к эффектам лептина во всех тканях и органах. Начиная со второй недели жизни мыши *db*/*db* демонстрируют гиперфагию, гиперинсулинемию и гипергликемию с последующим формированием морбидного ожирения, тяжелого СД-II и сопутствующих органных поражений [5].

Известно, что мыши *db*/*db* предрасположены к развитию диабетической полинейропатии и патологии скелетных мышц. Согласно данным исследований, для мышей этой линии характерны аксонально-демиелинизирующее поражение периферических нервов, ультраструктурные изменения нейромышечного синапса [6, 7], а также дисрегуляция нейрональных и сарколеммальных ионных токов [8–10], приводящие к нарушению процессов сокращения и релаксации скелетных мышц [11]. С молодого возраста мыши *db*/*db* подвержены замедленной регенерации мышечных волокон [12] и патологически повышенному протеолизу [13], что приводит к развитию мышечной атрофии со снижением моторных функций [14, 15]. Считается, что скелетно-мышечные осложнения, выявляемые у мышей *db*/*db*, с высокой точностью воспроизводят нарушения, наблюдаемые в клинической практике у пациентов с СД-II [16].

Для оценки функции нейромоторного аппарата может быть использован метод стимуляционной электронейромиографии (ЭНМГ), основанный на регистрации биоэлектрической активности скелетных мышц в ответ на электрическую стимуляцию нервов [17]. Различные разновидности метода ЭНМГ (поверхностная, игольчатая) обладают высокой чувствительностью в отношении диагностики и количественной оценки саркопении у мелких лабораторных животных, включая *Danio rerio* [18], мышей [19] и крыс [20]. Ранее с помощью стимуляционной игольчатой ЭНМГ были описаны фоновые нарушения нейромышечной передачи у мышей *db*/*db*, включавшие снижение максимальных амплитуд, увеличение латентности и длительности М-ответов скелетных мышц на электростимуляцию нервов [21].

В качестве дополнительного теста для оценки мышечной силы и эффективности ее восстановления Gregory et al. был предложен протокол электростимуляционного утомления (ЭСУ), включающий измерение силы хвата перекладины после утомления двуглавой мышцы плеча высокочастотной электростимуляцией с помощью имплантированных электродов [22]. Данный тест был впоследствии успешно применен для изучения молекулярных механизмов

ноцицепции [23], антиноцицептивных свойств тестостерона [24] и оценки миотропной активности новых производных хромон-3-альдегида [25]. Ввиду того, что тест ЭСУ представляется весьма перспективным для анализа миотропных эффектов фармакологических агентов различных групп, в настоящей работе нами была предпринята попытка модификации способа его использования с целью упрощения и уменьшения инвазивности процедуры. Кроме этого, предлагаемая модификация теста направлена на минимизацию влияния дополнительных факторов, с наличием которых ассоциирована оценка силы хвата конечностями у животных [26].

Несмотря на распространенность скелетно-мышечных и нейрональных нарушений среди больных СД-II, возможности их фармакологической коррекции изучены недостаточно. Потенциалом для терапии указанных нарушений могут обладать как препараты с прямой гипогликемизирующей активностью, так и средства с более широким спектром метаболического действия. До настоящего времени оценка наличия у подобных препаратов миотропных эффектов электрофизиологическими методами не проводилась или проводилась очень ограниченно.

Метформин – производное бигуанида, на сегодняшний день являющееся препаратом выбора для терапии СД-II благодаря своей выраженной гипогликемизирующей и инсулинсенситизирующей активности, наличию плейотропных эффектов и хорошему профилю безопасности [27]. В пилотном эксперименте [28], а также в клиническом исследовании ($n = 20$) [29] метформин продемонстрировал потенциальную эффективность при саркопении. Малобен (4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия) – экспериментальное соединение, показавшее в доклинических исследованиях наличие гипогликемической [30], антистеатозной, антиапоптотической и регенераторной активности у мышей с СД-II [31].

Женьшень (*Panax*) – род многолетних травянистых растений семейства аралиевых, включающий 12 видов, произрастающих в Азии и Северной Америке. Практически все виды рода *Panax* проявляют широкий спектр биологической активности, включая адаптогенную, антиоксидантную, вазодилатирующую и антиишемическую активность, благодаря чему их использование при метаболических и кардиоваскулярных заболеваниях считается перспективным [33]. Культуры клеток различных видов женьшеня, выращиваемые биотехнологическим способом в стерильных контролируемых условиях, являются перспективным лекарственным сырьем, обладающим рядом преимуществ перед выращенными на плантациях или собранными в природе растениями: отсутствием контаминантов (бактерий, грибов), стабильностью роста и биохимического состава вне зависимости от региона и сезонности, наличием стратегий по управлению биосинтезом целевых метаболитов и др. [33–35].

Таким образом, **целью настоящего исследования** стала оценка применимости модифицированного метода ЭСУ для выявления миотропных эффектов препаратов метаболического действия – экстрактов женьшеня обыкновенного *Panax ginseng* C.A. Mey., ж. вьетнамского *P. vietnamensis* Ha & Grushv. и ж. японского *P. japonicus* (T. Nees) C.A. Mey., метформина и малобена – у лептинрезистентных мышей *db*/*db*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в соответствии с Базельской декларацией и Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств после одобрения биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ. Эксперименты были выполнены на 60 молодых взрослых (2 мес.) мышах-самцах линии C57Bl/Ks-*db*$^{+}$/$^{+}$*m* (*db*/*db*) массой 45–50 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область, Россия) одной партией и прошедших карантин в течение 14 дней. Мыши получали «Полнорационный комбикорм для лабораторных животных» (ООО «Лабораторкорм», Россия) и воду, соответствующую требованиям ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая». Доступ к корму и воде был обеспечен *ad libitum*.

Непосредственно перед началом эксперимента мыши были рандомизированы на 6 групп:

1) контроль ($n = 10$; 0,9 % физиологический раствор);
2) женьшеня обыкновенного экстракт (ЖОЭ; «Экстракт MR.LT Ginseng», ООО «Торгово-Производственная Компания «Саморазвитие», Россия) ($n = 10$; 50 мг/кг);
3) ж. вьетнамского экстракт (ЖВЭ) ($n = 10$; 50 мг/кг);
4) ж. японского экстракт (ЖЯЭ) ($n = 10$; 50 мг/кг);
5) малобен ($n = 10$; 60 мг/кг; синтезирован отделом органического синтеза ФГБОУ ВО СПХФУ);
6) метформин ($n = 10$; 300 мг/кг; «Метформин-Акрихин», АО «АКРИХИН», Россия).

Все препараты вводили внутрижелудочно с помощью зонда 1 р/д в течение 2 мес.

Суспензионные культуры клеток женьшеня обыкновенного *Panax ginseng* C.A. Mey., женьшеня вьетнамского *P. vietnamensis* Ha & Grushv. и женьшеня японского *P. japonicus* (T. Nees) C.A. Mey. были получены в Институте физиологии растений им К. А. Тимирязева РАН. Культуры выращивали в 20 л барботажных биореакторах (рабочий объем 15 л) при 26,0 ± 0,5 °C в темноте, при отъемно-доливном режиме культивирования, воздушная смесь подавалась со скоростью от 0,1 до 1,0 v/vpm в зависимости от фазы роста культуры. Биомассу клеток собирали в точке достижения максимального накопления биомассы, отделяли от культуральной среды под вакуумом и высушивали до постоянного веса при 40 °C. Высушенную биомассу использовали для приготовления экстрактов. Для получения пробы биомассы каждого вида объединяли биомассу, полученную как минимум в трех циклах выращивания.

Экстракты из культур клеток ЖВЭ и ЖЯЭ были получены из лекарственного растительного сырья на кафедре фармакогнозии ФГБОУ ВО СПХФУ путем настаивания с 70%-м спиртом этиловым при соотношении сырья и экстрагента 1:20. В дальнейшем извлечения сгущали под вакуумом, высушивали при температуре не выше 37 °С и стандартизировали по сумме гинзенозидов. Эффективные дозы метформина [36], малобена [37] и препаратов женьшеня [38] были определены на основании литературных данных.

По окончании периода лечения у мышей измеряли силу хвата (г) передними и всеми четырьмя конечностями с помощью аппарата Grip Strength Meter (TSE Systems, Германия). Исследование биоэлектрической активности скелетных мышц проводили методом стимуляционной ЭНМГ с помощью 4-канального электронейромиографа «Нейро-МВП-8» и программы «Нейро-МВП.NETω» 3.7.3.7 (ООО «Нейрософт», Россия). Перед проведением исследования животных наркотизировали хлоралгидратом (380 мг/кг, внутрибрюшинно; MilliporeSigma, США).

В режиме стимуляции одиночными стимулами регистрировали моторные ответы (М-ответы) икроножной мышцы *m. gastrocnemius* на стимуляцию седалищного нерва *n. ischiadicus* слева. Мышь фиксировали в положении лежа на брюшке; стимулирующие электроды устанавливали подкожно по обе стороны от седалищного бугра (анод – ростральнее, катод – каудальнее), пишущий электрод – подкожно перпендикулярно ходу *m. gastrocnemius* в ее наиболее широкой части, референтный электрод – подкожно в области ахиллова сухожилия (рисунок 1, А) [17].

Стимуляцию нервных волокон осуществляли при прямоугольной форме стимула и длительности 0,1 мс в диапазоне сил тока от 1 до 10 мА с последовательным увеличением с шагом 1 мА до достижения супрамаксимальной величины. Для минимизации случайной погрешности для каждого животного проводили 3 повторные регистрации М-ответов с повторной установкой всех электродов. Измеряли средние значения максимальных амплитуд М-ответа (мВ), латентности (мс), длительности (мс) и площади (мВ · мс) М-ответа с максимальной амплитудой, а также силы тока (мА), вызывавшие М-ответы с минимальной (пороговая сила тока) и максимальной амплитудами.

В рамках протокола электростимуляционного утомления мышь фиксировали в положении лежа на брюшке; стимулирующие, пишущий, референтный и заземляющий электроды устанавливали как описано выше. Дополнительную пару стимулирующих электродов устанавливали поперек брюшка *m. gastrocnemius* в промежутке между пишущим и референтным электродами (рисунок 1, А).

Определяли фоновую амплитуду М-ответов мышцы на супрамаксимальную стимуляцию (10 мА) нерва, как описано выше, затем осуществляли стимуляцию мышцы по незначительно модифицированному протоколу Gregory et al. [22]: 3 трейна (серии) по 50 стимулов (10 мА, 100 Гц), 57 трейнов по 90 стимулов (10 мА, 40 Гц), 3 трейна по 50 стимулов (10 мА, 100 Гц). Повторно определяли амплитуду М-ответов на супрамаксимальную стимуляцию (10 мА) нерва через 1, 2, 3, 4 и 5 мин после окончания периода стимуляции (рисунок 1, Б).

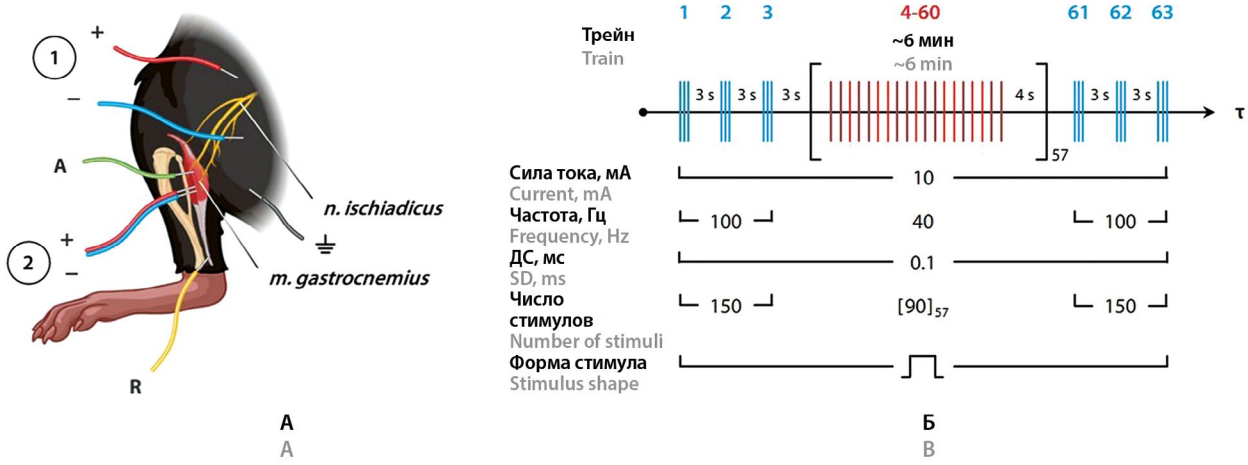


Рисунок 1. Расположение электродов и протокол электростимуляции.

А – рсположение электродов при проведении исследования методом электростимуляционного утомления: 1 – участок стимуляции нерва; 2 – участок стимуляции мышцы; + – анод, – – катод; А – пишущий электрод; R – референтный электрод.

В – протокол электростимуляции. ДС – длительность стимула

Figure 1. Electrode placement and electrical stimulation protocol.

A – Electrode placement during the electrical stimulation-induced fatigue (ESIF) protocol: 1 – nerve stimulation pair; 2 – muscle stimulation pair; + – anode; – – cathode; A – active electrode; R – reference electrode.

B – ESIF protocol. SD – stimulus duration

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программного обеспечения Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc., США). Нормальность распределения количественных признаков проверяли с помощью W-критерия Шапиро – Уилка. При нормальном распределении значимость различий в пределах одной группы в различных временных точках оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, между группами – с помощью однофакторного дисперсионного ANOVA с *post-hoc*-тестом по Даннетту. При распределении, отличном от нормального, значимость различий в пределах одной группы оценивали с помощью теста Манна – Уитни, между группами – с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса с *post-hoc*-тестом по Данну. Порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$. Числовые данные на графиках представлены в виде средних арифметических; планки погрешностей отражают стандартные ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сила хвата перекладины как передними, так и всеми четырьмя конечностями была одинакова во всех экспериментальных группах (рисунок 2).

Параметры М-ответов икроножной мышцы на стимуляцию седалищного нерва одиночными стимулами также не отличались у животных различных экспериментальных групп (рисунок 3).

Проведение ЭСУ приводило к снижению амплитуды М-ответа икроножной мышцы животных на 18,83–35,23 % от исходного уровня ($p < 0,01$ для всех групп). Величина падения амплитуды была значимо меньше (по модулю) в группах ЖВЭ, ЖЯЭ и малобена по сравнению с контролем ($p < 0,05$ для всех). Через 5 мин после окончания ЭСУ во всех группах было зафиксировано увеличение амплитуды М-ответа на 10,18–14,79 % (от исходных значений), имевшее статистическую значимость во всех группах, кроме ЖОЭ ($p < 0,01$ в группах контроля, ЖВЭ и ЖЯЭ; $p < 0,05$ в группах малобена и метформина). Значимые отличия от контроля по результатам восстановительного периода в опытных группах не наблюдались.

Амплитуда М-ответа в группе ЖВЭ во всех временных точках была значительно выше по сравнению с контрольными животными ($p < 0,05$ для всех точек); в группе ЖЯЭ – в точках 1, 2 и 3 мин ($p < 0,05$ для 1 и 3 мин, $p < 0,05$ для 2 мин); в группе малобена – в точках 1–4 мин ($p < 0,05$ для всех точек). Амплитуда М-ответа мышцы в группе метформина в течение восстановительного периода изменялась в диапазоне от 74,54 до 87,36 % от исходного значения, ни в одной из точек не отличаясь значимо от контрольной группы (рисунок 4, таблица 1).

В настоящей работе был изучен *in vivo* процесс восстановления сократимости икроножной мышцы в ответ на непрямую супрамаксимальную электростимуляцию в остром периоде после ее утомления тетанизацией. Во всех экспериментальных группах была показана устойчивая динамика, характеризующаяся падением амплитуды М-ответа мышцы на ~20–35 % по истечении ~6-минутного периода ЭСУ с последующим восстановлением на ~10–15 % от исходной величины в течение 5 мин. Качественно и количественно идентичный характер изменения амплитуды моторных ответов был определен нами ранее для взрослых беспородных мышей [39] и мышей линии C57Bl/6 (данные не опубликованы), не подвергавшихся какому-либо воздействию. Снижение силы сокращения

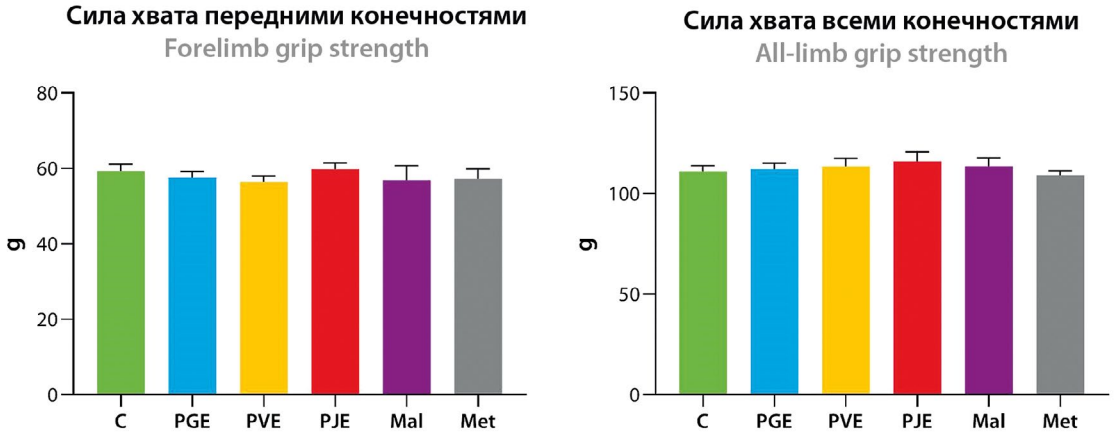


Рисунок 2. Сила хвата передними и всеми четырьмя конечностями.

C – контроль; PGE – женьшеня обыкновенного экстракт; PVE – женьшеня вьетнамского экстракт; PJE – женьшеня японского экстракт; Mal – малобен; Met – метформин

Figure 2. Fore- and all-limb grip strength.

C – control; PGE – *Panax ginseng* extract; PVE – *P. vietnamensis* extract; PJE – *P. japonicus* extract; Mal – maloben; Met – metformin

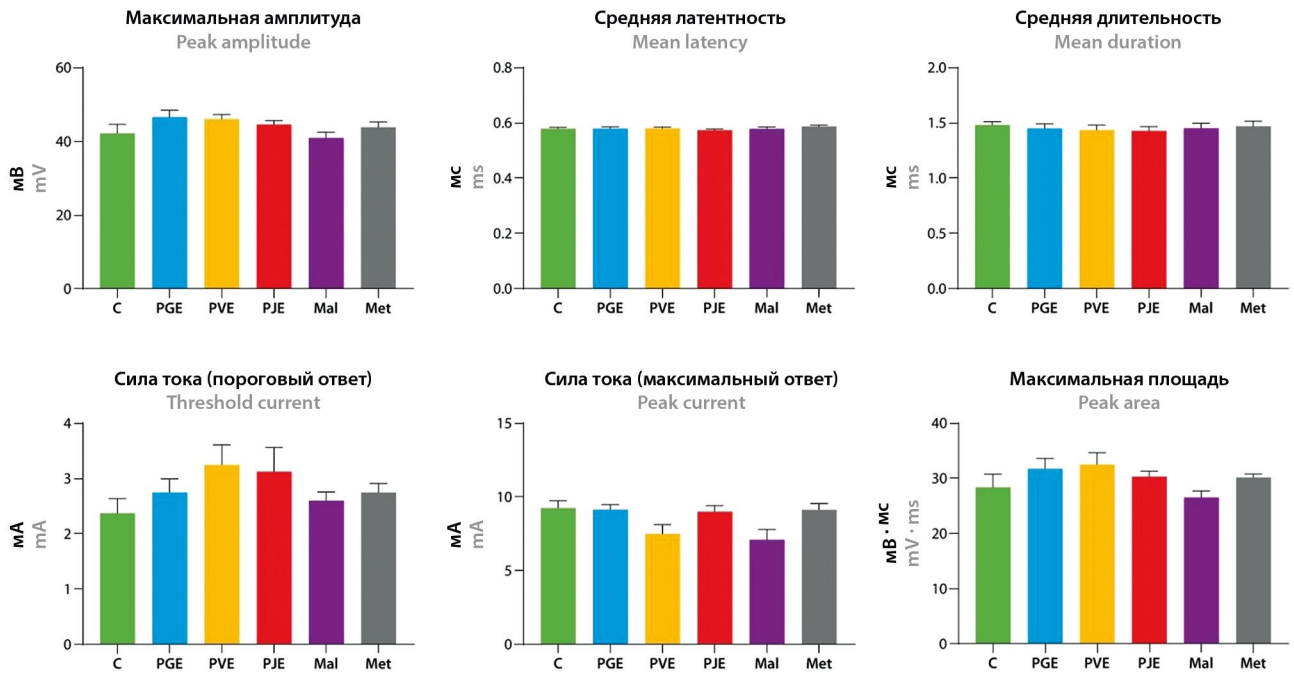


Рисунок 3. Параметры М-ответов икроножной мышцы на электростимуляцию седалищного нерва одиночными стимулами.

С – контроль; PGE – женьшеня обыкновенного экстракт; PVE – женьшеня вьетнамского экстракт; PJE – женьшеня японского экстракт; Mal – малобен; Met – метформин

Figure 3. Parameters of compound muscle action potentials in the gastrocnemius muscle to single-stimulus sciatic nerve electrical stimulation.

C – control; PGE – *Panax ginseng* extract; PVE – *P. vietnamensis* extract; PJE – *P. japonicus* extract; Mal – maloben; Met – metformin

Таблица 1. Изменение относительной амплитуды М-ответа икроножной мышцы в результате ее электростимуляционного утомления (ЭСУ) и в восстановительном периоде после ЭСУ

Table 1. Net change of relative compound muscle action potential amplitude in the gastrocnemius muscle resulting from its electrical stimulation-induced fatigue (ESIF) and during the post-ESIF recovery period

Группа Group	Изменение в результате ЭСУ Change induced by ESIF			Изменение от 1 до 5 мин после ЭСУ Change over 1 to 5 min following ESIF		
	Δ, %	*p* против себя *p* vs. self	*p* против *K* *p* vs. Control	Δ, %	*p* против себя *p* vs. self	*p* против *K* *p* vs. Control
C	−35.23 ± 2.21	**	–	+14.62 ± 3.00	**	–
PGE	−33.49 ± 4.97	**	>0.05	+12.74 ± 1.88	>0.05	>0.05
PVE	−21.50 ± 1.18	**	*	+14.79 ± 1.75	**	>0.05
PJE	−20.01 ± 2.24	**	*	+10.18 ± 0.85	**	>0.05
Mal	−18.83 ± 4.16	**	*	+10.69 ± 2.98	*	>0.05
Met	−26.17 ± 3.77	**	>0.05	+12.54 ± 1.83	*	>0.05

Примечание. С – контроль; PGE – женьшеня обыкновенного экстракт; PVE – женьшеня вьетнамского экстракт; PJE – женьшеня японского экстракт; Mal – малобен; Met – метформин.

Note. C – control; PGE – *Panax ginseng* extract; PVE – *P. vietnamensis* extract; PJE – *P. japonicus* extract; Mal – maloben; Met – metformin.

при длительной (от 30 с) тетанизации (от 40 [40] до 80 Гц [41]) было ранее показано для изолированных мышечных волокон японской бурой лягушки [40] и мыши [42], а также мышц-разгибателей нижней конечности у здоровых добровольцев [41]. Таким образом, наблюдаемая динамика, предположительно, является типичной для животных, подвергающихся ЭСУ, и отражает развитие и компенсацию краткосрочного мышечного утомления. Считается, что краткосрочное утомление, вызываемое продолжительной

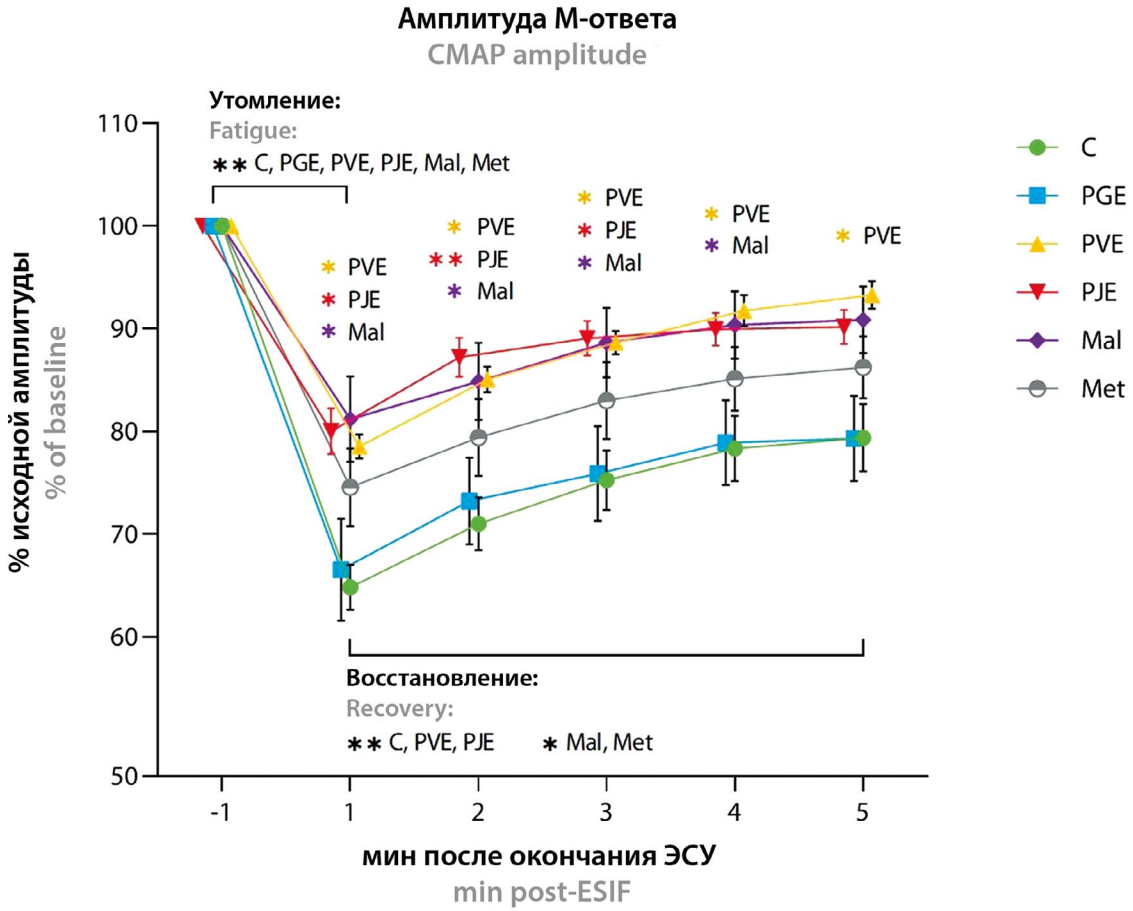


Рисунок 4. Динамика амплитуды М-ответа икроножной мышцы на супрамаксимальную стимуляцию седалищного нерва до (–1 мин) и после (1–5 мин) электростимуляционного утомления (ESIF).

C – контроль; PGE – женьшеня обыкновенного экстракт; PVE – женьшеня вьетнамского экстракт; PJE – женьшеня японского экстракт; Mal – малобен; Met – метформин.

*** $p < 0.05$, ** $p < 0,01$ (против себя на участках «Утомление» и «Восстановление»; против контроля в остальных случаях)**

Figure 4. Amplitude dynamics of the compound muscle action potentials (CMAP) invoked in the gastrocnemius muscle by supramaximal sciatic nerve stimulation before (–1 min) and after (1–5 min) electrical stimulation-induced fatigue (ESIF).

C – control; PGE – *Panax ginseng* extract; PVE – *P. vietnamensis* extract; PJE – *P. japonicus* extract; Mal – maloben; Met – metformin.

*** $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (vs. self in the "Fatigue" and "Recovery" blocks; vs. control elsewhere)**

тетанической стимуляцией, происходит вследствие изменения величины ионных градиентов, приводящего к уменьшению амплитуды или даже исчезновению потенциала действия, в результате развивающейся гипоксии и ишемии ткани, а также, в меньшей степени, вследствие накопления продуктов обмена и истощения резерва макроэргов [43, 44].

Большинство известных методов оценки мышечной утомляемости выполняются в условиях *in vitro* [40, 45–47] или *ex vivo* [48–49], что делает невозможным их повторное применение у одного и того же экспериментального животного. Описанный нами протокол является минимально инвазивным и может быть использован многократно (при замене хлоралгидрата, используемого только в терминальных экспериментах) в условиях хронического эксперимента. Кроме этого, оценка миотропных эффектов фармакологических агентов непосредственно в живом организме позволяет избежать возможного невоспроизведения результатов, полученных *in vitro*, что нередко наблюдается в области экспериментального изучения нейромышечных заболеваний [50–52].

Как и некоторые другие существующие методики моделирования краткосрочного мышечного утомления *in vivo* [53, 54], описанный протокол предполагает проведение интермиттирующей тетанизации в течение ~6 мин. Использование продолжительного пе-

риода тетанизации позволяет продлить и период восстановления сократимости мышцы, который может укладываться в несколько секунд при краткосрочной (до 30 с) тетанической стимуляции [43]. Наблюдение изменения амплитуды ответа мышцы в течение нескольких минут после окончания ЭСУ, в свою очередь, создает возможность для детального анализа и статистической обработки данных, получаемых в нескольких временных точках. Одновременно с этим весь описываемый протокол укладывается в 15 мин, что позволяет проводить исследование без необходимости длительной и/или повторной анестезии животного.

ЖВЭ и ЖЯЭ, но не ЖОЭ, оказывали значимое положительное влияние на динамику восстановления сократимости икроножной мышцы после ЭСУ. В экспериментальных и клинических исследованиях были ранее показаны стимуляция миогенеза и улучшение энергетического метаболизма скелетно-мышечных волокон [55], активация митохондриального биогенеза [56], уменьшение выраженности постнагрузочного повреждения мышц [57] и облегчение восстановления их сократимости [58] при применении некоторых видов женьшеня (ж. обыкновенный [55, 59], ж. американский *Panax quinquefolius* L. [55, 57]) и его отдельных активных соединений (гинзенозидов Rc [56] и Rg1 [60]). Основными механизмами действия препаратов женьшеня считаются активация сигналинга Akt/mTOR, индукция миогенина и фактора детерминации миобластов MyoD, угнетение активности проатрофических факторов (атрогина-1, миостатина, активных форм кислорода) и экспрессии провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли-α (ФНО-α), интерлейкина-6) [60].

В природе для растений ж. вьетнамского по сравнению с ж. обыкновенным характерно более высокое содержание вина-гинзенозида R2 (VR2) и протопанаксатриола, а также наличие дополнительных сапонинов – производных окотиллола [в том числе маджонозида R2 (MR2)] и даммарана [61]. Показано, что VR2 и MR2 обладают выраженной противовоспалительной активностью *in vitro* [62], а MR2 также ингибирует TNF-α-индуцированный апоптоз гепатоцитов [63] и стимулирует биогенез митохондрий в кардиомиоцитах [64], что гипотетически может опосредовать влияние этих соединений на скелетно-мышечную функцию. Состав ж. японского изучен в меньшей степени, однако также сообщается о присутствии в его частях некоторых уникальных соединений, таких как панаяпонол и псевдогинзенозид RT1-бутиловый эфир [65].

Для культуры клеток женьшеня японского, использованной в данной работе, было показано наличие широкого спектра гинзенозидов с суммарной концентрацией 7,54 % сухого веса. Среди них значительную часть составляют гинзенозиды группы олеаноловой кислоты R0 и ChIVa (43,84 и 16,25 мг/г сухого веса соответственно). Также были найдены гинзенозиды группы протопанаксадиолов (Rb1, Rc, Rb2, Rb3, Rg3 и Rd), протопанаксатриолов (Re, Rf, Rg1, Rh1, R1) и их малонильные производные [34]. В культурах клеток женьшеня вьетнамского были идентифицированы 13 основных гинзенозидов групп протопанаксадиолов, олеаноловой кислоты, а также окотиллоловый гинзенозид винагинзенозид R1, в то время как для культуры клеток женьшеня обыкновенного было характерно преобладание гинзенозида R0 [34]. Таким образом, наблюдаемые различия в эффективности ЖОЭ, ЖВЭ и ЖЯЭ могут быть связаны с фитохимическими особенностями культур клеток данных видов.

Наряду с ЖВЭ и ЖЯЭ малобен повышал степень сохранения сократимости икроножной мышцы при использовании протокола ЭСУ. В проведенных ранее экспериментальных исследованиях это соединение уменьшало проявления миостеатоза при стеатозе печени [37], способствовало уменьшению накопления висцерального жира при алиментарном ожирении [31], а также ингибировало реакции апоптоза гепатоцитов при неалкогольном стеатогепатите [30]. Предположительно, антистеатотический и антиапоптотический эффекты малобена могут лежать в основе его положительного влияния на мышечную сократимость.

Несмотря на присутствие некоторой тенденции к улучшению, не было зафиксировано значимых отличий динамики восстановления мышечной сократимости между контрольными животными и особями, получавшими терапию метформином. Литературные данные о влиянии метформина на функцию скелетных мышц неоднозначны. В работах, выполненных на грызунах с применением методик *in vivo* и *ex vivo*, сообщается как о положительном влиянии препарата на миогенез и анаболические процессы в мышцах [66], так и об уменьшении диаметра мышечных волокон, а также снижении силы хвата у животных, получавших метформин [67]. При этом отмечается, что мыши *db*/*db* могут быть менее чувствительны к миотропным эффектам метформина по сравнению с животными дикого типа [67].

Установлено, что прием метформина во время соблюдения постельного режима способствует уменьшению тяжести мышечной атрофии и миофиброза на момент восстановления подвижности [29]. В то же время результаты исследования, проведенного с участием здоровых добровольцев старше 65 лет, свидетельствуют о замедлении набора мышечной массы при прогрессивных тренировках с отягощением на фоне приема метформина [68]. Проведенный в 2021 г. метаанализ 15 клинических исследований не выявил положительного или отрицательного влияния препарата на мышечную массу и силу ввиду высокой гетерогенности имеющихся данных [69].

Характерным явлением, наблюдаемым нами в эксперименте, было отсутствие корреляции результатов оценки максимальной мышечной силы (силы хвата), а также параметров М-ответов икроножной мышцы на стимуляцию одиночными стимулами с результатами, полученными при применении ЭСУ. Использование тестов хвата перекладины и удержания на перевернутой сетчатой платформе для оценки мышечной функции у животных сопряжено с неизбежным искажением результата под влиянием поведенческого (мотивационного) фактора [26, 70]. Отмечается, что снижение мотивации к хвату перекладины или удержанию на платформе более характерно для возрастных животных [70]; вероятно, наличие депрессивноподобного фенотипа у взрослых мышей *db*/*db* [71, 72] может также способствовать снижению их мотивации к выполнению подобных тестов и затруднять оценку моторных функций в чистом виде. Дополнительной неконтролируемой переменной может быть наличие сенсорных нарушений, оказывающее значительное влияние на силу хвата [26] и характерное для мышей *db*/*db* [73].

Таким образом, отсутствие значимых эффектов ЖЯЭ, ЖВЭ и малобена на силу хвата перекладины при одновременном положительном влиянии на мышечную сократимость по данным ЭНМГ может быть связано с низкой специфичностью теста силы хвата и большим количеством переменных, оказывающих влияние на его конечный результат. Предлагаемый протокол исследования, в отличие от теста силы хвата [26], также минимизирует влияние оператора, поскольку выполняется в условиях однократной установки всех электродов и последующей регистрации сигнала в полуавтоматическом режиме.

Следует остановиться на основных недостатках описываемого протокола. Отсутствие корреляции данных ЭНМГ и результатов, полученных при измерении силы хвата, хотя и может быть объяснено значительным влиянием дополнительных факторов, может также указывать на то, что анализируемый нами параметр – амплитуда М-ответа – является скорее суррогатным и может не отражать полной картины моторной функции животных. Невозможность установления однозначного равенства между амплитудой сигнала и реальной эффективностью работы скелетных мышц является известным недостатком ЭНМГ-исследований [74].

Вследствие необходимости выполнения протокола в условиях общей анестезии важным представляется потенциальное влияние используемого анестетика, а также глубины наркоза на результат анализа. В различных исследованиях биоэлектрической активности скелетных мышц *in vivo* в качестве анестетиков используются изофлуран [17, 49], метоксифлуран [75], пентобарбитал-натрий [76], фентанил + дроперидол + диазепам, кетамин + ксилазин [75]. Имеется сообщение, что у человека гипнотические дозы хлоралгидрата (200–1000 мг/кг) могут избирательно угнетать сократимость отдельных скелетных мышц (подбородочно-язычной, но не диафрагмы) [77], однако входит ли в число этих мышц икроножная – неизвестно.

В отличие от предлагаемой нами методики использование имплантируемых электродов для дальнейшей стимуляции мышцы у бодрствующего животного, как описано в работе А. В. Воронкова и соавторов [25], позволяет избежать необходимости повторной анестезии для каждого измерения. Решением проблемы также могут стать имплантируемые электромиографические системы, обеспечивающие возможность регистрации спонтанных и вызванных потенциалов в режиме реального времени у бодрствующих животных [78].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный в работе протокол ЭСУ представляет собой малоинвазивную методику, позволяющую проводить динамический анализ сократимости скелетных мышц без значимого влияния поведенческого фактора со стороны экспериментального животного. Данный протокол может быть использован для выявления миотропных эффектов средств с различным характером фармакологической активности и подходит для использования в хроническом эксперименте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сахарный диабет 2 типа у взрослых. Клинические рекомендации. М.: Общественная организация «Российская ассоциация эндокринологов»; 2022. 251 с.
2. Ye J., Wu Y., Yang S., Zhu D., Chen F., Chen J., Ji X., Hou K. The global, regional and national burden of type 2 diabetes mellitus in the past, present and future: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Frontiers in Endocrinology.* 2023;14:1192629. DOI: 10.3389/fendo.2023.1192629.
3. Khan M. A. B., Hashim M. J., King J. K., Govender R. D., Mustafa H., Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Journal of Epidemiology and Global Health.* 2020;10(1):107–111. DOI: 10.2991/jegh.k.191028.001.
4. Chen H., Huang X., Dong M., Wen S., Zhou L., Yuan X. The Association Between Sarcopenia and Diabetes: From Pathophysiology Mechanism to Therapeutic Strategy. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity.* 2023;16:1541–1554. DOI: 10.2147/DMSO.S410834.
5. Suriano F., Vieira-Silva S., Falony G., Roumain M., Paquot A., Pelicaen R., Regnier M., Delzenne N. M., Raes J., Muccioli G. G., Hul M. V., Cain P. D. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. *Microbiome.* 2021;9(1):147. DOI: 10.1186/s40168-021-01097-8.
6. Sima A. A., Robertson D. M. Peripheral neuropathy in mutant diabetic mouse [C57BL/Ks (db/db)]. *Acta Neuropathologica.* 1978;41(2):85–89. DOI: 10.1007/BF00689757.
7. Sima A. A., Robertson D. M. Peripheral neuropathy in the diabetic mutant mouse. An ultrastructural study. *Laboratory Investigation.* 1979;40(6):627–632.

8. Lin-Shiau S.-Y., Liu S.-H., Lin M.-J. Use of ion channel blockers in the exploration of possible mechanisms involved in the myopathy of diabetic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1993;348(3):311–318. DOI: 10.1007/BF00169161.
9. Zenker J., Poirot O., de Preux Charles A. S., Arnaud E., Médard J.-J., Lacroix C., Kuntzer T., Chrast R. Altered distribution of juxtaparanodal $K_v1.2$ subunits mediates peripheral nerve hyperexcitability in type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(22):7493–7498. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0719-12.2012.
10. Eshima H., Tamura Y., Kakehi S., Nakamura K., Kurebayashi N., Murayama T., Kakigi R., Sakurai T., Kawamori R., Watada H. Dysfunction of muscle contraction with impaired intracellular Ca^{2+} handling in skeletal muscle and the effect of exercise training in male db/db mice. *Journal of Applied Physiology*. 2019;126(1):170-182. DOI: 10.1152/japplphysiol.00048.2018.
11. Bayley J. S., Pedersen T. H., Nielsen O. B. Skeletal muscle dysfunction in the db/db mouse model of type 2 diabetes. *Muscle & Nerve*. 2016;54(3):460–468. DOI: 10.1002/mus.25064.
12. Nguyen M.-H., Cheng M., Koh T. J. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice. *The Scientific World JOURNAL*. 2011;11:1525–1535. DOI: 10.1100/tsw.2011.137.
13. Wang X., Hu Z., Hu J., Du J., Mitch W. E. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*. 2006;147(9):4160–4168. DOI: 10.1210/en.2006-0251.
14. Kim K. W., Baek M.-O., Choi J.-Y., Son K. H., Yoon M.-S. Analysis of the Molecular Signaling Signatures of Muscle Protein Wasting Between the Intercostal Muscles and the Gastrocnemius Muscles in db/db Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(23):6062. DOI: 10.3390/ijms20236062.
15. Wang M., Pu D., Zhao Y., Chen J., Zhu S., Lu A., Liao Z., Sun Y., Xiao Q. Sulforaphane protects against skeletal muscle dysfunction in spontaneous type 2 diabetic db/db mice. *Life Sciences*. 2020;255:117823. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117823.
16. Yu J., Loh K., Yang H.-Q., Du M.-R., Wu Y.-X., Liao Z.-Y., Guo A., Yang Y.-F., Chen B., Zhao Y.-X., Chen J.-L., Zhou J., Sun Y., Xiao Q. The Whole-transcriptome Landscape of Diabetes-related Sarcopenia Reveals the Specific Function of Novel lncRNA Gm20743. *Communications Biology*. 2022;5(1):774. DOI: 10.1038/s42003-022-03728-8.
17. Pollari E., Prior R., Robberecht W., Van Damme P., Van Den Bosch L. In Vivo Electrophysiological Measurement of Compound Muscle Action Potential from the Forelimbs in Mouse Models of Motor Neuron Degeneration. *Journal of Visualized Experiments*. 2018;(136):57741. DOI: 10.3791/57741.
18. Rutkove S. B., Chen Z.-Z., Pandeya S., Callegari S., Mourey T., Nagy J. A., Nath A. K. Surface Electrical Impedance Myography Detects Skeletal Muscle Atrophy in Aged Wildtype Zebrafish and Aged gpr27 Knockout Zebrafish. *Biomedicines*. 2023;11(7):1938. DOI: 10.3390/biomedicines11071938.
19. Chugh D., Iyer C. C., Wang X., Bobbili P., Rich M. M., Arnold W. D. Neuromuscular junction transmission failure is a late phenotype in aging mice. *Neurobiology of Aging*. 2020;86:182–190. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.022.
20. Padilla C. J., Harrigan M. E., Harris H., Schwab J. M., Rutkove S. B., Rich M. M., Clark B. C., Arnold W. D. Profiling age-related muscle weakness and wasting: neuromuscular junction transmission as a driver of age-related physical decline. *GeroScience*. 2021;43(3):1265–1281. DOI: 10.1007/s11357-021-00369-3.
21. Приходько В. А., Матузок Т. М., Оковитый С. В. Нарушения нейромышечной передачи у лептинрезистентных мышей. *Биомедицина*. 2023;19(3):77–81. DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-77-81.
22. Gregory N. S., Gibson-Corley K., Frey-Law L., Sluka K. A. Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. *Pain*. 2013;154(12):2668–2676. DOI: 10.1016/j.pain.2013.07.047.
23. Gregory N. S., Brito R. G., Oliveira Fusaro M. C. G., Sluka K. A. ASIC3 Is Required for Development of Fatigue-Induced Hyperalgesia. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(2):1020–1030. DOI: 10.1007/s12035-014-9055-4.
24. Lesnak J. B., Inoue S., Lima L., Rasmussen L., Sluka K. A. Testosterone protects against the development of widespread muscle pain in mice. *Pain*. 2020;161(12):2898–2908. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001985.
25. Воронков А. В., Поздняков Д. И., Руковицина В. М., Оганесян Э. Т. Влияние новых производных хромон-3-альдегида на развитие мышечной дисфункции в условиях эксперимента. *Крымский терапевтический журнал*. 2018;4:67–71.
26. Maurissen J. P. J., Marable B. R., Andrus A. K., Stebbins K. E. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicology and Teratology*. 2003;25(5):543–553. DOI: 10.1016/s0892-0362(03)00073-4.
27. Baker C., Retzik-Stahr C., Singh V., Plomondon R., Anderson V., Rasouli N. Should metformin remain the first-line therapy for treatment of type 2 diabetes? *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2021;12:2042018820980225. DOI: 10.1177/2042018820980225.
28. Lyu Q., Wen Y., He B., Zhang X., Chen J., Sun Y., Zhao Y., Xu L., Xiao Q., Deng H. The ameliorating effects of metformin on disarrangement ongoing in gastrocnemius muscle of sarcopenic and obese sarcopenic mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2022;1868(11):166508. DOI: 10.1016/j.bbadis.2022.166508.
29. Petrocelli J. J., McKenzie A. I., de Hart N. M. M. P., Reidy P. T., Mahmassani Z. S., Keeble A. R., Kaput K. L., Wahl M. P., Rondina M. T., Marcus R. L., Welt C. K., Holland W. L., Funai K., Fry C. S., Drummond M. J. Disuse-induced muscle fibrosis, cellular senescence, and senescence-associated secretory phenotype in older adults are alleviated during re-ambulation with metformin pre-treatment. *Aging Cell*. 2023;22(11):e13936. DOI: 10.1111/acel.13936.
30. Бажанова Е. Д., Оковитый С. В., Белых М. А. Влияние 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия и метформина на динамику апоптоза и пролиферации гепатоцитов у мышей с сахарным диабетом и ожирением. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018;81(5):17–20. DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-5-17-20.
31. Белых М. А. Влияние 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия на проявления экспериментального неалкогольного стеатогепатита. *Биомедицина*. 2021;17(3):95–99. DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-95-99.
32. Li Z., Ji G. E. Ginseng and obesity. *Journal of Ginseng Research*. 2018;42(1):1–8. DOI: 10.1016/j.jgr.2016.12.005.
33. Povydysh M. N., Titova M. V., Ivanov I. M., Klushin A. G., Kochkin D. V., Galishev B. A., Popova E. V., Ivkin D. Y., Luzhanin V. G., Krasnova M. V., Demakova N. V., Nosov A. M. Effect of phytopreparations based on bioreactor-grown cell biomass of *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* and

Panax japonicus on carbohydrate and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus. *Nutrients*. 2021;13(11):3811. DOI: 10.3390/nu13113811.
34. Povydysh M. N., Titova M. V., Ivkin D. Y., Krasnova M. V., Vasilevskaya E. R., Fedulova L. V., Ivanov I. M., Klushin A. G., Popova E. V., Nosov A. M. The hypoglycemic and hypocholesterolemic activity of *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* and *Panax japonicus* cell culture biomass in rats with high-fat diet-induced obesity. *Nutrients*. 2023;15(3):656. DOI: 10.3390/nu15030656.
35. Titova M. V., Popova E. V., Ivanov I. M., Fomenkov A A., Nebera E. A., Vasilevskaya E. R., Tolmacheva G. S., Kotenkova E. A., Klychnikov O. I., Metalnikov P. S., Tyurina T. M., Paek K.-Y. Toxicological evaluation of ginsenoside-rich cell culture biomass of *Panax japonicus* produced in a large-scale bioreactor system. *Industrial Crops and Products*. 2024;208:117761. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117761.
36. Spruss A., Kanuri G., Stahl C., Bischoff S. C., Bergheim I. Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. *Lab Invest*. 2012;92(7):1020–1032. DOI: 10.1038/labinvest.2012.75.
37. Белых М. А., Оковитый С. В. Оценка эффективности нового производного малоновой кислоты в качестве антистеатозного средства при высокожировой диете у мышей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018;81(S):28–29.
38. Attele A. S., Zhou Y.-P., Xie J.-T., Wu J. A., Zhang L., Dey L., Pugh W., Rue P. A., Polonsky K. S., Yuan C.-S. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes*. 2002;51(6):1851–1858. DOI: 10.2337/diabetes.51.6.1851.
39. Приходько В. А., Алексеева Ю. С., Захлевная Д. А., Болотова В. Ц. Влияние экстракта живучки туркестанской на восстановление сократимости мышц после электростимуляционного утомления у мышей. В сб.: Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов IX Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2023». 28–29 сентября 2023. Воронеж. Воронеж: Воронежский государственный университет; 2023. С. 619–623. DOI: 10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-619-623.
40. Inamura N., Fujisige A., Miyake S., Ono A., Tsuchiya T. The effects of temperature on the mechanical performance in fatigued single muscle fibers of the frog induced by twitch and tetanus. *The Japanese Journal of Physiology*. 2000;50(1):49–57. DOI: 10.2170/jjphysiol.50.49.
41. Fitch S., McComas A. Influence of human muscle length on fatigue. *The Journal of Physiology*. 1985;362(1):205–213. DOI: 10.1113/jphysiol.1985.sp015671.
42. Bruton J., Pinniger G. J., Lännergren J., Westerblad H. The effects of the myosin-II inhibitor N-benzyl-p-toluene sulphonamide on fatigue in mouse single intact toe muscle fibres. *Acta Physiologica*. 2006;186(1):59–66. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2005.01499.x.
43. Allen D. G., Lamb G. D., Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiological Reviews*. 2008;88(1):287–332. DOI: 10.1152/physrev.00015.2007.
44. Wan J.-J., Qin Z., Wang P.-Y., Sun Y., Liu X. Muscle fatigue: general understanding and treatment. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017;49(10):e384. DOI: 10.1038/emm.2017.194.
45. Germinario E., Esposito A., Midrio M., Peron S., Palade P. T., Betto R., Danieli-Betto D. High-frequency fatigue of skeletal muscle: role of extracellular Ca^{2+}. *European Journal of Applied Physiology*. 2008;104(3):445–453. DOI: 10.1007/s00421-008-0796-5.
46. Khairullin A. E., Teplov A. Y., Grishin S. N., Farkhutdinov A. M., Ziganshin A. U. The thermal sensitivity of purinergic modulation of contractile activity of locomotor and respiratory muscles in mice. *Biophysics*. 2019;64(5):812–817. DOI: 10.1134/S0006350919050075.
47. Vesga-Castro C., Aldazabal J., Vallejo-Illarramendi A., Paredes J. Contractile force assessment methods for in vitro skeletal muscle tissues. *eLife*. 2022;11:e77204. DOI: 10.7554/eLife.77204.
48. Wineinger M. A., Walsh S. A., Abresch T. Muscle fatigue in animal models of neuromuscular disease. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2002;81(11):S81–S98. DOI: 10.1097/00002060-200211001-00010.
49. Yamada T., Ashida Y., Tamai K., Kimura I., Yamauchi N., Naito A., Tokuda N., Westerblad H., Andersson D. C., Himori K. Improved skeletal muscle fatigue resistance in experimental autoimmune myositis mice following high-intensity interval training. *Arthritis Research & Therapy*. 2022;24(1):156. DOI: 10.1186/s13075-022-02846-2.
50. Lindqvist J., Pénisson-Besnier I., Iwamoto H., Li M., Yagi N., Ochala J. A myopathy-related actin mutation increases contractile function. *Acta Neuropathologica*. 2012;123(5):739–746. DOI: 10.1007/s00401-012-0962-z.
51. Gineste C., De Winter J. M., Kohl C., Witt C. C., Giannesini B., Brohm K., Le Fur Y., Gretz N., Vilmen C., Pecchi E., Jubeau M., Cozzone P. J., Stienen G. J. M., Granzier H., Labeit S., Ottenheijm C. A. C., Bendahan D., Gondin J. *In vivo* and *in vitro* investigations of heterozygous nebulin knock-out mice disclose a mild skeletal muscle phenotype. *Neuromuscular Disorders*. 2013;23(4):357–369. DOI: 10.1016/j.nmd.2012.12.011.
52. Gineste C., Ottenheijm C., Le Fur Y., Banzet S., Pecchi E., Vilmen C., Cozzone P. J. , Koulmann N., Hardeman E. C., Bendahan D., Gondin J. Alterations at the cross-bridge level are associated with a paradoxical gain of muscle function *in vivo* in a mouse model of nemaline myopathy. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e109066. DOI: 10.1371/journal.pone.0109066.
53. Williams J. H., Ward C. W., Klug G. A. Fatigue-induced alterations in Ca2+ and caffeine sensitivities of skinned muscle fibers. *Journal of Applied Physiology*. 1993;75(2):586–593. DOI: 10.1152/jappl.1993.75.2.586.
54. Moldovan M., Krarup C. Evaluation of Na^+/K^+ pump function following repetitive activity in mouse peripheral nerve. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006;155(2):161–171. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2005.12.015.
55. Hwang J. H., Kang S. Y., Jung H. W. Effects of American wild ginseng and Korean cultivated wild ginseng pharmacopuncture extracts on the regulation of C2C12 myoblasts differentiation through AMPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2022;25(6):192. DOI: 10.3892/mmr.2022.12708.
56. Kim A., Park S.-M., Kim N. S., Lee H. Ginsenoside Rc, an Active Component of *Panax ginseng*, Alleviates Oxidative Stress-Induced Muscle Atrophy via Improvement of Mitochondrial Biogenesis. *Antioxidants*. 2023;12(8):1576. DOI: 10.3390/antiox12081576.
57. Estaki M., Noble E. G. North American ginseng protects against muscle damage and reduces neutrophil infiltration after an acute bout of downhill running in rats. *Applied*

Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2014;40(2):116–121. DOI: 10.1139/apnm-2014-0331.
58. Cristina-Souza G., Santos-Mariano A. C., Lima-Silva A. E., Costa P. L., Domingos P. R., Silva S. F., Abreu W. C., De-Oliveira F. R., Osiecki R. *Panax ginseng* Supplementation Increases Muscle Recruitment, Attenuates Perceived Effort, and Accelerates Muscle Force Recovery After an Eccentric-Based Exercise in Athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2022;36(4):991–997. DOI: 10.1519/JSC.0000000000003555.
59. Zhang H., Zhao C., Hou J., Su P., Yang Y., Xia B., Zhao X., He R., Wang L., Cao C., Liu T., Tian J. Red ginseng extract improves skeletal muscle energy metabolism and mitochondrial function in chronic fatigue mice. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1077249. DOI: 10.3389/fphar.2022.1077249.
60. Ahmad S. S., Chun H. J., Ahmad K., Choi I. Therapeutic applications of ginseng for skeletal muscle-related disorder management. *Journal of Ginseng Research*. 2024;48(1):12–19. DOI: 10.1016/j.jgr.2023.06.003.
61. Van Le T. H., Lee G. J., Long Vu H. K., Know S. W., Nguyen N. K., Park J. H., Nguyen M. D. Ginseng Saponins in Different Parts of *Panax vietnamensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2015;63(11):950–954. DOI: 10.1248/cpb.c15-00369.
62. Jeong J.-J., Van Le T. H., Lee S.-Y., Eun S.-H., Nguyen M. D., Park J. H., Kim D.-H. Anti-inflammatory effects of vina-ginsenoside R2 and majonoside R2 isolated from *Panax vietnamensis* and their metabolites in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *International Immunopharmacology*. 2015;28(1):700–706. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.07.025.
63. Tran Q. L., Adnyana I. K., Tezuka Y., Harimaya Y., Saiki I., Kurashige Y., Tran Q. K., Kadota S. Hepatoprotective effect of majonoside R2, the major saponin from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*). *Planta Medica*. 2002;68(5):402–406. DOI: 10.1055/s-2002-32069.
64. Thu V. T., Yen N. T. H., Tung N. H., Bich P. T., Han J., Kim H. K. Majonoside-R2 extracted from Vietnamese ginseng protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation injury via modulating mitochondrial function and biogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2021;36:127814. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.127814.
65. Chan H.-H., Hwang T.-L., Bhaskar Reddy M. V., Li D.-T., Qian K., Bastow K. F., Lee K.-H., Wu T.-S. Bioactive constituents from the roots of *Panax japonicus* var. *major* and development of a LC-MS/MS method for distinguishing between natural and artifactual compounds. *Journal of Natural Products*. 2011;74(4):796–802. DOI: 10.1021/np100851s.
66. Yousuf Y., Datu A., Barnes B., Amini-Nik S., Jeschke M. G. Metformin alleviates muscle wasting post-thermal injury by increasing Pax7-positive muscle progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):18. DOI: 10.1186/s13287-019-1480-x.
67. Kang M. J., Moon J. W., Lee J. O., Kim J. H., Jung E. J., Kim S. J., Oh J. Y., Wu S. W., Lee P. R., Park S. H., Kim H. S. Metformin induces muscle atrophy by transcriptional regulation of myostatin via HDAC6 and FoxO3a. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2021;13(1):605–620. DOI: 10.1002/jcsm.12833.
68. Walton R. G., Dungan C. M., Long D. E., Tuggle S. C., Kosmac K., Peck B. D., Bush H. M., Villasante Tezanos A. G., McGwin G., Windham S. T., Ovalle F., Bamman M. M., Kern P. A., Peterson C. A. Metformin blunts muscle hypertrophy in response to progressive resistance exercise training in older adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial: The MASTERS trial. *Aging Cell*. 2019;18(6):e13039. DOI: 10.1111/acel.13039.
69. Соколова А. В., Климова А. В., Драгунов Д. О., Артюнов Г. П. Оценка влияния терапии метформином на величину мышечной массы и мышечной силы у больных с и без сахарного диабета. Метаанализ 15 исследований. *Российский кардиологический журнал*. 2021;26(3):4331. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4331.
70. Deacon R. M. J. Measuring the strength of mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(76):2610. DOI: 10.3791/2610.
71. Sharma A. N., Elased K. M., Garrett T. L., Lucot J. B. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiology & Behavior*. 2010;101(3):381–388. DOI: 10.1016/j.physbeh.2010.07.002.
72. Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Okovityi S. V. Cognitive and behavioural dysfunction in leptin-resistant mice. In: Proceedings of the 29th International Annual ISBS "Stress and Behavior" Neuroscience and Biological Psychiatry Conference. 18-19 May 2023. Saint Petersburg. 2023. P. 18.
73. De Gregorio C., Contador D., Campero M., Ezquer M., Ezquer F. Characterization of diabetic neuropathy progression in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Biology Open*. 2018;7(9):bio036830. DOI: 10.1242/bio.036830.
74. Roberts T. J., Gabaldón A. M. Interpreting muscle function from EMG: lessons learned from direct measurements of muscle force. *Integrative and Comparative Biology*. 2008;48(2):312–320. DOI: 10.1093/icb/icn056.
75. Ingalls C. P., Warren G. L., Lowe D. A., Boorstein D. B., Armstrong R. B. Differential effects of anesthetics on in vivo skeletal muscle contractile function in the mouse. *Journal of Applied Physiology*. 1996;80(1):332–340. DOI: 10.1152/jappl.1996.80.1.332.
76. Coelho Nepomuceno A., Landucci Politani E., Landucci Politani da Silva E., Salomone R., Losso Longo M. V., Grassi Salles A., Marques de Faria J. C., Gemperli R. Tibial and fibular nerves evaluation using intraoperative electromyography in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2016;31(8):542–548. DOI: 10.1590/S0102-865020160080000007.
77. Hershenson M., Brouillette R. T., Olsen E., Hunt C. E. The effect of chloral hydrate on genioglossus and diaphragmatic activity. *Pediatric Research*. 1984;18(6):516–519. DOI: 10.1203/00006450-198406000-00006.
78. Zealear D., Li Y., Huang S. An Implantable System For Chronic In Vivo Electromyography. *Journal of Visualized Experiments*. 2020;21;(158):10.3791/60345. DOI: 10.3791/60345.

REFERENCES

1. Type II diabetes mellitus in adults. Clinical guidelines. Moscow: Public organization "Russian Association of Endocrinologists"; 2022. 251 p.
2. Ye J., Wu Y., Yang S., Zhu D., Chen F., Chen J., Ji X., Hou K. The global, regional and national burden of type 2 diabetes mellitus in the past, present and future: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14:1192629. DOI: 10.3389/fendo.2023.1192629.
3. Khan M. A. B., Hashim M. J., King J. K., Govender R. D., Mustafa H., Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Journal of Epidemiology and Global Health*. 2020;10(1):107–111. DOI: 10.2991/jegh.k.191028.001.
4. Chen H., Huang X., Dong M., Wen S., Zhou L., Yuan X. The Association Between Sarcopenia and Diabetes: From Pathophysiology Mechanism to Therapeutic Strategy. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2023;16:1541–1554. DOI: 10.2147/DMSO.S410834.

5. Suriano F., Vieira-Silva S., Falony G., Roumain M., Paquot A., Pelicaen R., Regnier M., Delzenne N. M., Raes J., Muccioli G. G., Hul M. V., Cain P. D. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. *Microbiome*. 2021;9(1):147. DOI: 10.1186/s40168-021-01097-8.
6. Sima A. A., Robertson D. M. Peripheral neuropathy in mutant diabetic mouse [C57BL/Ks (db/db)]. *Acta Neuropathologica*. 1978;41(2):85–89. DOI: 10.1007/BF00689757.
7. Sima A. A., Robertson D. M. Peripheral neuropathy in the diabetic mutant mouse. An ultrastructural study. *Laboratory Investigation*. 1979;40(6):627–632.
8. Lin-Shiau S.-Y., Liu S.-H., Lin M.-J. Use of ion channel blockers in the exploration of possible mechanisms involved in the myopathy of diabetic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1993;348(3):311–318. DOI: 10.1007/BF00169161.
9. Zenker J., Poirot O., de Preux Charles A. S., Arnaud E., Médard J.-J., Lacroix C., Kuntzer T., Chrast R. Altered distribution of juxtaparanodal $K_v1.2$ subunits mediates peripheral nerve hyperexcitability in type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(22):7493–7498. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0719-12.2012.
10. Eshima H., Tamura Y., Kakehi S., Nakamura K., Kurebayashi N., Murayama T., Kakigi R., Sakurai T., Kawamori R., Watada H. Dysfunction of muscle contraction with impaired intracellular Ca^{2+} handling in skeletal muscle and the effect of exercise training in male db/db mice. *Journal of Applied Physiology*. 2019;126(1):170-182. DOI: 10.1152/japplphysiol.00048.2018.
11. Bayley J. S., Pedersen T. H., Nielsen O. B. Skeletal muscle dysfunction in the db/db mouse model of type 2 diabetes. *Muscle & Nerve*. 2016;54(3):460–468. DOI: 10.1002/mus.25064.
12. Nguyen M.-H., Cheng M., Koh T. J. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice. *The Scientific World JOURNAL*. 2011;11:1525–1535. DOI: 10.1100/tsw.2011.137.
13. Wang X., Hu Z., Hu J., Du J., Mitch W. E. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*. 2006;147(9):4160–4168. DOI: 10.1210/en.2006-0251.
14. Kim K. W., Baek M.-O., Choi J.-Y., Son K. H., Yoon M.-S. Analysis of the Molecular Signaling Signatures of Muscle Protein Wasting Between the Intercostal Muscles and the Gastrocnemius Muscles in db/db Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(23):6062. DOI: 10.3390/ijms20236062.
15. Wang M., Pu D., Zhao Y., Chen J., Zhu S., Lu A., Liao Z., Sun Y., Xiao Q. Sulforaphane protects against skeletal muscle dysfunction in spontaneous type 2 diabetic db/db mice. *Life Sciences*. 2020;255:117823. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117823.
16. Yu J., Loh K., Yang H.-Q., Du M.-R., Wu Y.-X., Liao Z.-Y., Guo A., Yang Y.-F., Chen B., Zhao Y.-X., Chen J.-L., Zhou J., Sun Y., Xiao Q. The Whole-transcriptome Landscape of Diabetes-related Sarcopenia Reveals the Specific Function of Novel lncRNA Gm20743. *Communications Biology*. 2022;5(1):774. DOI: 10.1038/s42003-022-03728-8.
17. Pollari E., Prior R., Robberecht W., Van Damme P., Van Den Bosch L. In Vivo Electrophysiological Measurement of Compound Muscle Action Potential from the Forelimbs in Mouse Models of Motor Neuron Degeneration. *Journal of Visualized Experiments*. 2018;(136):57741. DOI: 10.3791/57741.
18. Rutkove S. B., Chen Z.-Z., Pandeya S., Callegari S., Mourey T., Nagy J. A., Nath A. K. Surface Electrical Impedance Myography Detects Skeletal Muscle Atrophy in Aged Wildtype Zebrafish and Aged gpr27 Knockout Zebrafish. *Biomedicines*. 2023;11(7):1938. DOI: 10.3390/biomedicines11071938.
19. Chugh D., Iyer C. C., Wang X., Bobbili P., Rich M. M., Arnold W. D. Neuromuscular junction transmission failure is a late phenotype in aging mice. *Neurobiology of Aging*. 2020;86:182–190. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.022.
20. Padilla C. J., Harrigan M. E., Harris H., Schwab J. M., Rutkove S. B., Rich M. M., Clark B. C., Arnold W. D. Profiling age-related muscle weakness and wasting: neuromuscular junction transmission as a driver of age-related physical decline. *GeroScience*. 2021;43(3):1265–1281. DOI: 10.1007/s11357-021-00369-3.
21. Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Okovityi S. V. Neuromuscular Joint Function Impairment in Leptin-Resistant Mice. *Journal Biomed*. 2023;19(3):77–81. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-77-81.
22. Gregory N. S., Gibson-Corley K., Frey-Law L., Sluka K. A. Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. *Pain*. 2013;154(12):2668–2676. DOI: 10.1016/j.pain.2013.07.047.
23. Gregory N. S., Brito R. G., Oliveira Fusaro M. C. G., Sluka K. A. ASIC3 Is Required for Development of Fatigue-Induced Hyperalgesia. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(2):1020–1030. DOI: 10.1007/s12035-014-9055-4.
24. Lesnak J. B., Inoue S., Lima L., Rasmussen L., Sluka K. A. Testosterone protects against the development of widespread muscle pain in mice. *Pain*. 2020;161(12):2898–2908. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001985.
25. Voronkov A. V., Pozdnyakov D. I., Rukovitsyna V. M., Oganesyan E. T. Impact of new derivatives chromon-3-aldehyde in the development of muscle dysfucntion in experimental conditions. *Crimean Journal of Internal Diseases*. 2018;4:67–71. (In Russ.)
26. Maurissen J. P. J., Marable B. R., Andrus A. K., Stebbins K. E. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicology and Teratology*. 2003;25(5):543–553. DOI: 10.1016/s0892-0362(03)00073-4.
27. Baker C., Retzik-Stahr C., Singh V., Plomondon R., Anderson V., Rasouli N. Should metformin remain the first-line therapy for treatment of type 2 diabetes? *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2021;12:2042018820980225. DOI: 10.1177/2042018820980225.
28. Lyu Q., Wen Y., He B., Zhang X., Chen J., Sun Y., Zhao Y., Xu L., Xiao Q., Deng H. The ameliorating effects of metformin on disarrangement ongoing in gastrocnemius muscle of sarcopenic and obese sarcopenic mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2022;1868(11):166508. DOI: 10.1016/j.bbadis.2022.166508.
29. Petrocelli J. J., McKenzie A. I., de Hart N. M. M. P., Reidy P. T., Mahmassani Z. S., Keeble A. R., Kaput K. L., Wahl M. P., Rondina M. T., Marcus R. L., Welt C. K., Holland W. L., Funai K., Fry C. S., Drummond M. J. Disuse-induced muscle fibrosis, cellular senescence, and senescence-associated secretory phenotype in older adults are alleviated during re-ambulation with metformin pre-treatment. *Aging Cell*. 2023;22(11):e13936. DOI: 10.1111/acel.13936.

30. Bazhanova E. D., Okovityi S. V., Belykh M. A. Effect of sodium 4,4'-(propanediamide)dibenzoate and metformin on the dynamics of apoptosis and proliferation of hepatocytes in mice with diabetes and obesity. *Experimental and clinical pharmacology.* 2018;81(5):17–20. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-5-17-20.
31. Belykh M. A. Impact of 4,4'-(propanediamide)dibenzoate sodium on manifestations of experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Journal Biomed.* 2021;17(3):95–99. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-95-99.
32. Li Z., Ji G. E. Ginseng and obesity. *Journal of Ginseng Research*. 2018;42(1):1–8. DOI: 10.1016/j.jgr.2016.12.005.
33. Povydysh M. N., Titova M. V., Ivanov I. M., Klushin A. G., Kochkin D. V., Galishev B. A., Popova E. V., Ivkin D. Y., Luzhanin V. G., Krasnova M. V., Demakova N. V., Nosov A. M. Effect of phytopreparations based on bioreactor-grown cell biomass of *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* and *Panax japonicus* on carbohydrate and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus. *Nutrients.* 2021;13(11):3811. DOI: 10.3390/nu13113811.
34. Povydysh M. N., Titova M. V., Ivkin D. Y., Krasnova M. V., Vasilevskaya E. R., Fedulova L. V., Ivanov I. M., Klushin A. G., Popova E. V., Nosov A. M. The hypoglycemic and hypocholesterolemic activity of *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* and *Panax japonicus* cell culture biomass in rats with high-fat diet-induced obesity. *Nutrients*. 2023;15(3):656. DOI: 10.3390/nu15030656.
35. Titova M. V., Popova E. V., Ivanov I. M., Fomenkov A A., Nebera E. A., Vasilevskaya E. R., Tolmacheva G. S., Kotenkova E. A., Klychnikov O. I., Metalnikov P. S., Tyurina T. M., Paek K.-Y. Toxicological evaluation of ginsenoside-rich cell culture biomass of *Panax japonicus* produced in a large-scale bioreactor system. *Industrial Crops and Products*. 2024;208:117761. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117761.
36. Spruss A., Kanuri G., Stahl C., Bischoff S. C., Bergheim I. Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. *Lab Invest.* 2012;92(7):1020–1032. DOI: 10.1038/labinvest.2012.75.
37. Belykh M. A., Okovityi S. V. Effectiveness assessment of a new malonic acid derivative as an antisteatotic agent in high-fat diet in mice. *Experimental and ᶜlinical Pharmacology.* 2018;81(S):28–29. (In Russ.)
38. Attele A. S., Zhou Y.-P., Xie J.-T., Wu J. A., Zhang L., Dey L., Pugh W., Rue P. A., Polonsky K. S., Yuan C.-S. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes.* 2002;51(6):1851–1858. DOI: 10.2337/diabetes.51.6.1851.
39. Prikhodko V. A., Alekseeva Yu. S., Zakhlevnaya D. A., Bolotova V. Ts. Effects of an Ajuga turkestanica extract on muscle contractility recovery following electrical stimulation-induced fatigue in mice. In: Ways and forms for pharmaceutical education improvement. Current issues in new drug development and research: Proceedings of the IX International scientific and methodological conference "Pharmeducation-2023". 28–29 September 2023. Voronezh. Voronezh: Voronezh State University; 2023. P. 619–623. (In Russ.) DOI: 10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-619-623.
40. Inamura N., Fujisige A., Miyake S., Ono A., Tsuchiya T. The effects of temperature on the mechanical performance in fatigued single muscle fibers of the frog induced by twitch and tetanus. *The Japanese Journal of Physiology.* 2000;50(1):49–57. DOI: 10.2170/jjphysiol.50.49.
41. Fitch S., McComas A. Influence of human muscle length on fatigue. *The Journal of Physiology.* 1985;362(1):205–213. DOI: 10.1113/jphysiol.1985.sp015671.
42. Bruton J., Pinniger G. J., Lännergren J., Westerblad H. The effects of the myosin-II inhibitor N-benzyl-p-toluene sulphonamide on fatigue in mouse single intact toe muscle fibres. *Acta Physiologica.* 2006;186(1):59–66. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2005.01499.x.
43. Allen D. G., Lamb G. D., Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiological Reviews*. 2008;88(1):287–332. DOI: 10.1152/physrev.00015.2007.
44. Wan J.-J., Qin Z., Wang P.-Y., Sun Y., Liu X. Muscle fatigue: general understanding and treatment. *Experimental & Molecular Medicine.* 2017;49(10):e384. DOI: 10.1038/emm.2017.194.
45. Germinario E., Esposito A., Midrio M., Peron S., Palade P. T., Betto R., Danieli-Betto D. High-frequency fatigue of skeletal muscle: role of extracellular Ca^{2+}. *European Journal of Applied Physiology.* 2008;104(3):445–453. DOI: 10.1007/s00421-008-0796-5.
46. Khairullin A. E., Teplov A. Y., Grishin S. N., Farkhutdinov A. M., Ziganshin A. U. The thermal sensitivity of purinergic modulation of contractile activity of locomotor and respiratory muscles in mice. *Biophysics.* 2019;64(5):812–817. DOI: 10.1134/S0006350919050075.
47. Vesga-Castro C., Aldazabal J., Vallejo-Illarramendi A., Paredes J. Contractile force assessment methods for in vitro skeletal muscle tissues. *eLife.* 2022;11:e77204. DOI: 10.7554/eLife.77204.
48. Wineinger M. A., Walsh S. A., Abresch T. Muscle fatigue in animal models of neuromuscular disease. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation.* 2002;81(11):S81–S98. DOI: 10.1097/00002060-200211001-00010.
49. Yamada T., Ashida Y., Tamai K., Kimura I., Yamauchi N., Naito A., Tokuda N., Westerblad H., Andersson D. C., Himori K. Improved skeletal muscle fatigue resistance in experimental autoimmune myositis mice following high-intensity interval training. *Arthritis Research & Therapy.* 2022;24(1):156. DOI: 10.1186/s13075-022-02846-2.
50. Lindqvist J., Pénisson-Besnier I., Iwamoto H., Li M., Yagi N., Ochala J. A myopathy-related actin mutation increases contractile function. *Acta Neuropathologica.* 2012;123(5):739–746. DOI: 10.1007/s00401-012-0962-z.
51. Gineste C., De Winter J. M., Kohl C., Witt C. C., Giannesini B., Brohm K., Le Fur Y., Gretz N., Vilmen C., Pecchi E., Jubeau M., Cozzone P. J., Stienen G. J. M., Granzier H., Labeit S., Ottenheijm C. A. C., Bendahan D., Gondin J. *In vivo* and *in vitro* investigations of heterozygous nebulin knock-out mice disclose a mild skeletal muscle phenotype. *Neuromuscular Disorders*. 2013;23(4):357–369. DOI: 10.1016/j.nmd.2012.12.011.
52. Gineste C., Ottenheijm C., Le Fur Y., Banzet S., Pecchi E., Vilmen C., Cozzone P. J. , Koulmann N., Hardeman E. C., Bendahan D., Gondin J. Alterations at the cross-bridge level are associated with a paradoxical gain of muscle function *in vivo* in a mouse model of nemaline myopathy. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e109066. DOI: 10.1371/journal.pone.0109066.
53. Williams J. H., Ward C. W., Klug G. A. Fatigue-induced alterations in Ca2+ and caffeine sensitivities of skinned muscle fibers. *Journal of Applied Physiology.* 1993;75(2):586–593. DOI: 10.1152/jappl.1993.75.2.586.

54. Moldovan M., Krarup C. Evaluation of Na^+/K^+ pump function following repetitive activity in mouse peripheral nerve. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006;155(2):161–171. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2005.12.015.
55. Hwang J. H., Kang S. Y., Jung H. W. Effects of American wild ginseng and Korean cultivated wild ginseng pharmacopuncture extracts on the regulation of C2C12 myoblasts differentiation through AMPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2022;25(6):192. DOI: 10.3892/mmr.2022.12708.
56. Kim A., Park S.-M., Kim N. S., Lee H. Ginsenoside Rc, an Active Component of *Panax ginseng*, Alleviates Oxidative Stress-Induced Muscle Atrophy via Improvement of Mitochondrial Biogenesis. *Antioxidants*. 2023;12(8):1576. DOI: 10.3390/antiox12081576.
57. Estaki M., Noble E. G. North American ginseng protects against muscle damage and reduces neutrophil infiltration after an acute bout of downhill running in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2014;40(2):116–121. DOI: 10.1139/apnm-2014-0331.
58. Cristina-Souza G., Santos-Mariano A. C., Lima-Silva A. E., Costa P. L., Domingos P. R., Silva S. F., Abreu W. C., De-Oliveira F. R., Osiecki R. *Panax ginseng* Supplementation Increases Muscle Recruitment, Attenuates Perceived Effort, and Accelerates Muscle Force Recovery After an Eccentric-Based Exercise in Athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2022;36(4):991–997. DOI: 10.1519/JSC.0000000000003555.
59. Zhang H., Zhao C., Hou J., Su P., Yang Y., Xia B., Zhao X., He R., Wang L., Cao C., Liu T., Tian J. Red ginseng extract improves skeletal muscle energy metabolism and mitochondrial function in chronic fatigue mice. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1077249. DOI: 10.3389/fphar.2022.1077249.
60. Ahmad S. S., Chun H. J., Ahmad K., Choi I. Therapeutic applications of ginseng for skeletal muscle-related disorder management. *Journal of Ginseng Research*. 2024;48(1):12–19. DOI: 10.1016/j.jgr.2023.06.003.
61. Van Le T. H., Lee G. J., Long Vu H. K., Know S. W., Nguyen N. K., Park J. H., Nguyen M. D. Ginseng Saponins in Different Parts of *Panax vietnamensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2015;63(11):950–954. DOI: 10.1248/cpb.c15-00369.
62. Jeong J.-J., Van Le T. H., Lee S.-Y., Eun S.-H., Nguyen M. D., Park J. H., Kim D.-H. Anti-inflammatory effects of vina-ginsenoside R2 and majonoside R2 isolated from *Panax vietnamensis* and their metabolites in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *International Immunopharmacology*. 2015;28(1):700–706. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.07.025.
63. Tran Q. L., Adnyana I. K., Tezuka Y., Harimaya Y., Saiki I., Kurashige Y., Tran Q. K., Kadota S. Hepatoprotective effect of majonoside R2, the major saponin from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*). *Planta Medica*. 2002;68(5):402–406. DOI: 10.1055/s-2002-32069.
64. Thu V. T., Yen N. T. H., Tung N. H., Bich P. T., Han J., Kim H. K. Majonoside-R2 extracted from Vietnamese ginseng protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation injury via modulating mitochondrial function and biogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2021;36:127814. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.127814.
65. Chan H.-H., Hwang T.-L., Bhaskar Reddy M. V., Li D.-T., Qian K., Bastow K. F., Lee K.-H., Wu T.-S. Bioactive constituents from the roots of *Panax japonicus* var. *major* and development of a LC-MS/MS method for distinguishing between natural and artifactual compounds. *Journal of Natural Products*. 2011;74(4):796–802. DOI: 10.1021/np100851s.
66. Yousuf Y., Datu A., Barnes B., Amini-Nik S., Jeschke M. G. Metformin alleviates muscle wasting post-thermal injury by increasing Pax7-positive muscle progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):18. DOI: 10.1186/s13287-019-1480-x.
67. Kang M. J., Moon J. W., Lee J. O., Kim J. H., Jung E. J., Kim S. J., Oh J. Y., Wu S. W., Lee P. R., Park S. H., Kim H. S. Metformin induces muscle atrophy by transcriptional regulation of myostatin via HDAC6 and FoxO3a. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2021;13(1):605–620. DOI: 10.1002/jcsm.12833.
68. Walton R. G., Dungan C. M., Long D. E., Tuggle S. C., Kosmac K., Peck B. D., Bush H. M., Villasante Tezanos A. G., McGwin G., Windham S. T., Ovalle F., Bamman M. M., Kern P. A., Peterson C. A. Metformin blunts muscle hypertrophy in response to progressive resistance exercise training in older adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial: The MASTERS trial. *Aging Cell*. 2019;18(6):e13039. DOI: 10.1111/acel.13039.
69. Sokolova A. V., Klimova A. V., Dragunov D. O., Arutyunov G. P. Effect of metformin therapy on muscle mass and strength in patients with and without diabetes. Meta-analysis of 15 studies. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(3):4331. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4331.
70. Deacon R. M. J. Measuring the strength of mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(76):2610. DOI: 10.3791/2610.
71. Sharma A. N., Elased K. M., Garrett T. L., Lucot J. B. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiology & Behavior*. 2010;101(3):381–388. DOI: 10.1016/j.physbeh.2010.07.002.
72. Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Okovityi S. V. Cognitive and behavioural dysfunction in leptin-resistant mice. In: Proceedings of the 29th International Annual ISBS "Stress and Behavior" Neuroscience and Biological Psychiatry Conference. 18-19 May 2023. Saint Petersburg. 2023. P. 18.
73. De Gregorio C., Contador D., Campero M., Ezquer M., Ezquer F. Characterization of diabetic neuropathy progression in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Biology Open*. 2018;7(9):bio036830. DOI: 10.1242/bio.036830.
74. Roberts T. J., Gabaldón A. M. Interpreting muscle function from EMG: lessons learned from direct measurements of muscle force. *Integrative and Comparative Biology*. 2008;48(2):312–320. DOI: 10.1093/icb/icn056.
75. Ingalls C. P., Warren G. L., Lowe D. A., Boorstein D. B., Armstrong R. B. Differential effects of anesthetics on in vivo skeletal muscle contractile function in the mouse. *Journal of Applied Physiology*. 1996;80(1):332–340. DOI: 10.1152/jappl.1996.80.1.332.
76. Coelho Nepomuceno A., Landucci Politani E., Landucci Politani da Silva E., Salomone R., Losso Longo M. V., Grassi Salles A., Marques de Faria J. C., Gemperli R. Tibial and fibular nerves evaluation using intraoperative electromyography in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2016;31(8):542–548. DOI: 10.1590/S0102-865020160080000007.
77. Hershenson M., Brouillette R. T., Olsen E., Hunt C. E. The effect of chloral hydrate on genioglossus and diaphragmatic activity. *Pediatric Research*. 1984;18(6):516–519. DOI: 10.1203/00006450-198406000-00006.
78. Zealear D., Li Y., Huang S. An Implantable System For Chronic In Vivo Electromyography. *Journal of Visualized Experiments*. 2020;21;(158):10.3791/60345. DOI: 10.3791/60345.

Оригинальная статья / Research article

УДК 616.127-005.8; 615.22

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1998

Check for updates

CC BY 4.0

Сравнительная эффективность фармакотерапии хронической сердечной недостаточности в эксперименте

Д. Ю. Ивкин✉, А. Б. Зеленцова, М. В. Краснова, А. А. Карпов, В. В. Пажельцев, С. М. Напалкова, И. И. Тернинко, И. А. Титович, С. В. Оковитый

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, 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. Б. Зеленцова – https://orcid.org/0009-0006-2750-098X;
М. В. Краснова – https://orcid.org/0000-0001-8138-6408;
А. А. Карпов – https://orcid.org/0000-0003-0114-5896;
В. В. Пажельцев – https://orcid.org/0009-0008-1871-0680;
С. М. Напалкова – https://orcid.org/0000-0002-9216-8673;
И. И. Тернинко – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015;
И. А. Титович – https://orcid.org/0000-0002-1343-4663;
С. В. Оковитый – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Статья поступила: 11.11.2024 **Статья принята в печать:** 24.12.2024 **Статья опубликована:** 26.12.2024

Резюме

Введение. Комбинированная терапия хронической сердечной недостаточности (ХСН) является актуальной и важной стратегией лечения, поскольку она позволяет достичь улучшения прогноза, оптимального контроля симптомов заболевания и повышения качества жизни пациентов.

Цель. Сравнение эффективности производного малоновой кислоты этмабена, ингибитора натрий-глюкозного котранспортера эмпаглифлозина и их комбинаций с вариативностью стартового препарата при экспериментальной постинфарктной хронической сердечной недостаточности у крыс.

Материалы и методы. На модели постинфарктной хронической сердечной недостаточности, воспроизведенной перманентным лигированием левой коронарной артерии у крыс, методом эхокардиографического исследования была проведена сравнительная оценка монотерапии этмабеном (60 мг/кг) и эмпаглифлозином (1 мг/кг) с комбинированным режимом применения этих препаратов в течение 1 месяца. Оценка концентрации этмабена в миокарде проведена методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение. Выявлен антагонизм между этмабеном и эмпаглифлозином, проявляющийся снижением эффекта комбинированной терапии по отношению к любому из компонентов, показано снижение концентрации производного малоновой кислоты в миокарде под действием ингибитора натрий-глюкозного котранспортёра 2-го типа.

Заключение. На основании полученных данных спланирован пул дополнительных исследований фармакокинетики и фармакодинамики этмабена.

Ключевые слова: эмпаглифлозин, этмабен, крысы, ВЭЖХ

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

Вклад авторов. Д. Ю. Ивкин, М. В. Краснова и А. А. Карпов выполняли экспериментальное фармакодинамическое исследование, А. Б. Зеленцова, Д. Ю. Ивкин и В. В. Пажельцев – фармакокинетическое. Д. Ю. Ивкин, И. А. Титович, И. И. Тернинко и С. В. Оковитый осуществляли планирование эксперимента, обработку результатов и написание статьи. С. М. Напалкова выполняла консультативную работу.

Для цитирования: Ивкин Д. Ю., Зеленцова А. Б., Краснова М. В., Карпов А. А., Пажельцев В. В., Напалкова С. М., Тернинко И. И., Титович И. А., Оковитый С. В. Сравнительная эффективность фармакотерапии хронической сердечной недостаточности в эксперименте. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):349–357. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1998

© Ивкин Д. Ю., Зеленцова А. Б., Краснова М. В., Карпов А. А., Пажельцев В. В., Напалкова С. М., Тернинко И. И., Титович И. А., Оковитый С. В., 2025

© Ivkin D. Yu., Zelentsova A. B., Krasnova M. V., Karpov A. A., Pazheltsev V. V., Napalkova S. M., Terninko I. I., Titovich I. A., Okovitiy S. V., 2025

Comparative efficacy study of experimental chronic heart failure

Dmitry Yu. Ivkin✉, Anna B. Zelentsova, Marina V. Krasnova, Andrey A. Karpov, Vasiliy V. Pazheltsev, Svetlana M. Napalkova, Inna I. Terninko, Irina A. Titovich, Sergey V. Okovitiy

[1] 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 B. Zelentsova – https://orcid.org/0009-0006-2750-098X;
Marina V. Krasnova – https://orcid.org/0000-0001-8138-6408;
Andrey A. Karpov – https://orcid.org/0000-0003-0114-5896;
Vasiliy V. Pazheltsev – https://orcid.org/0009-0008-1871-0680;
Svetlana M. Napalkova – https://orcid.org/0000-0002-9216-8673;
Inna I. Terninko – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015;
Irina A. Titovich – https://orcid.org/0000-0002-1343-4663;
Sergey V. Okovitiy – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Received: 11.11.2024 **Accepted:** 24.12.2024 **Published:** 26.12.2024

Abstract

Introduction. Combination therapy of chronic heart failure (CHF) is an urgent and important treatment strategy, as it allows to achieve an improvement in the prognosis, optimal control of the symptoms of the disease and an increase in the quality of life of patients.

Aim. Comparison of the effectiveness of the malonic acid derivative ethmaben, the sodium-glucose cotransporter inhibitor empagliflozin and their combinations with the variability of the starting drug in experimental post-infarction chronic heart failure in rats.

Materials and methods. In a model of post-infarction chronic heart failure, reproduced by permanent ligation of the left coronary artery in rats, an echocardiographic study was used to compare etmaben and empagliflozin monotherapy with a combined regimen of these drugs. The concentration of etmaben in the myocardium was assessed by HPLC.

Results and discussion. Antagonism between etmaben and empagliflozin was revealed, manifested by a decrease in the effect of combination therapy in relation to any of the components, a decrease in the concentration of malonic acid derivative in the myocardium under the action of a type 2 sodium-glucose cotransporter inhibitor was shown.

Conclusion. Based on the data obtained, additional studies of pharmacokinetics and pharmacodynamics of etmaben were planned.

Keywords: empagliflozin, etmaben, rat, HPLC

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

Contribution of the authors. Dmitry Yu. Ivkin, Marina V. Krasnova and Andrey A. Karpov performed an experimental pharmacodynamic study, Anna B. Zelentsova, Dmitry Yu. Ivkin and Vasiliy V. Pazheltsev – pharmacokinetic. Dmitry Yu. Ivkin, Irina A. Titovich, Inna I. Terninko and Sergey V. Okovitiy carried out the planning of the experiment, processing the results and writing the article. Svetlana M. Napalkova performed advisory work.

For citation: Ivkin D. Yu., Zelentsova A. B., Krasnova M. V., Karpov A. A., Pazheltsev V. V., Napalkova S. M., Terninko I. I., Titovich I. A., Okovitiy S. V. Comparative efficacy study of experimental chronic heart failure. *Drug development & registration*. 2025;14(1):349–357. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1998

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на имеющиеся достижения в области изучения патогенеза и лечения хронической сердечной недостаточности (ХСН), данный клинический синдром остается одним из самых распространенных и тяжелых осложнений сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. Многокомпонентная терапия хронической сердечной недостаточности, основанная на применении нескольких препаратов, каждый из которых имеет свои собственные механизмы действия, эффективна для пациентов со сниженной фракцией выброса, обеспечивая значительные клинические преимущества, включая снижение смертности [3]. Арсенал средств для лечения ХСН постоянно расширяется, недавно в клинические рекомендации были внесены глифлозины [4]. В Санкт-Петербургском государствен-

ном химико-фармацевтическом университете было синтезировано производное малоновой кислоты этмабен (рисунок 1), прошедшее полный цикл доклинических исследований, показав в эксперименте выраженную кардиотропную активность, и первую фазу клинических исследований. Кардиотропная эффективность этмабена, возможно, является класс-эффектом, так как появляются свидетельства о том, что малонаты способствует пролиферации взрослых кардиомиоцитов и регенерации сердца [5]. Ранее были проведены исследования фармакокинетики этмабена на двух видах животных (крысы и кролики) и на здоровых добровольцах, однако измерение концентрации проводили в биожидкостях – сыворотке крови и моче [6]. Исследование на животных позволяет оценивать также распределение в органе-мишени.

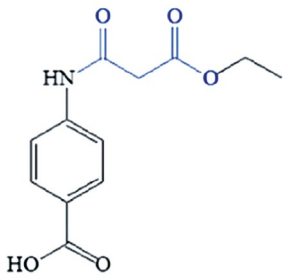


Рисунок 1. Структурная формула этмабена

Figure 1. Structural formula of ethmaben

Целью исследования явилось сравнение эффективности производного малоновой кислоты этмабена, ингибитора натрий-глюкозного котранспортера 2 типа эмпаглифлозина и их комбинаций с вариативностью стартового препарата при экспериментальной постинфарктной ХСН у крыс.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительное изучение эффективности различных режимов терапии через 30, 60 и 90 дней после формирования ХСН.
2. Оценить распределение этмабена в органе-мишени – миокарде крыс при монотерапии и при совместном введении с эмпаглифлозином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Крысы-самцы породы *Brown Norway Catholic Rats* были получены путем размножения в виварии ФГБОУ ВО СПХФУ, и в работе с ними соблюдались все биоэтические нормы (протокол биоэтической комиссии RATS-HF-2023 от 06.03.2023) в соответствии с рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

Моделирование постинфарктной ХСН проводили по стандартной методике лигирования левой коронарной артерии [7]. Через месяц после перевязки животных вводили в наркоз [смесь «Золетила 50» (0,5 мг/кг массы тела, Virbac, Франция) и «Ксилазина» (0,05 мл/кг массы тела, Interchemie Werken «de Adelaar» BV, Нидерланды)] и осуществляли рандомизацию животных, исходя из значения фракции укорочения левого желудочка (ФУ ЛЖ), определяемой в ходе эхокардиографического исследования (ЭхоКГ), проводимого с использованием ультразвуковой системы MyLab Touch SL 3116 (Esaote, Италия). Были сформированы 3 группы животных: группа № 1 – патология без лечения (контроль, $n = 10$), животные группы № 2 получали эмпаглифлозин в дозе 1 мг/кг ($n = 20$), группы № 3 – этмабен в дозе 60 мг/кг ($n = 20$). Через месяц ежедневного перорального введения препаратов животных вновь вводили в наркоз по описанной ранее схеме и повторно оценивали ЭхоКГ. Животные группы № 2 были повторно рандомизированы и разделены на 2 подгруппы: 2А – продолжали получать эмпаглифлозин, 2Б – с добавлением этмабена. Та же манипуляция была проведена с животными группы № 3: 3А – продолжили получать этмабен, 3Б – с добавлением эмпаглифлозина. После месяца терапии повторно проведено ЭхоКГ, все животные из групп 2Б и 3Б и 3 животных из группы 3А выводились из эксперимента для проведения скринингового фармакокинетического (ФК) анализа – оценки распределения производного малоновой кислоты в органе-мишени – миокарде. Далее, на протяжении последующего месяца, животные групп № 1, 2А и 3А продолжали лечение, затем они вновь подвергались ЭхоКГ-исследованию и ФК-анализу. Схема эксперимента приведена на рисунке 2.

Объектом скринингового фармакокинетического исследования служило сердце, полученное от здоровых экспериментальных животных и животных с целевой патологией. Оценка содержания этмабена в объекте исследования проводилась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-спектрофотометрическим детектированием. Хроматографические условия были подобраны ранее при осуществлении аналитической части фармацевтической разработки лекарственного средства, содержащего этмабен, в форме таблеток.

Хроматографические условия определения этмабена [8]:

Колонка	250 × 4,6 мм, 5 мкм. Сорбент – октадецилсиликагель Марка: Inertsil ODS-3 (Пр.: Phenomenex, США)

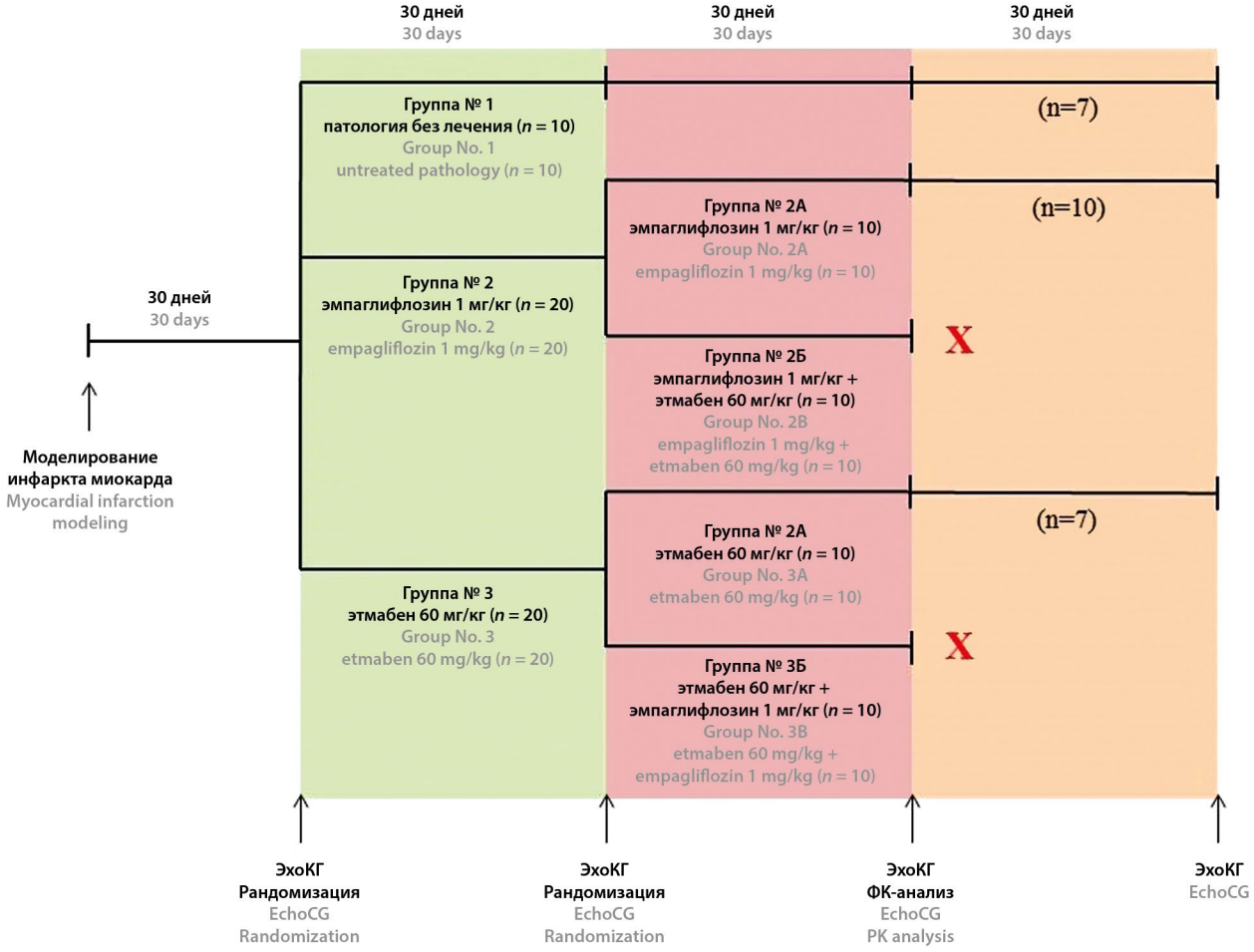


Рисунок 2. Схема проведения эксперимента.

Примечание. ЭхоКГ – эхокардиографическое исследование; ФК-анализ – фармакокинетический анализ

Figure 2. Scheme of the experiment.

Note. EchoCG – echocardiography; PK analysis – pharmacokinetic analysis

Подвижная фаза	0,02% раствор H_3PO_4 в воде деионизированной / ацетонитрил, градиентное элюирование, уравновешивание колонки 10 мин
	Время 0,02 % H_3PO_4 ацетонитрил
	0 мин 85 % 15 %
	20 мин 60 % 40 %
Скорость потока	1 мл/мин
Температура колонки	40 °C
Детектор	УФ 270 нм
Объем пробы	10 мкл

Объем инжекции был увеличен до 100 мкл с целью повышения нижнего предела количественного определения методики анализа, а также увеличено время хроматографирования с сохранением наклона градиентного элюирования.

Для определения возможности применения аналитической методики количественного определения содержания основного вещества в субстанции для целей биоаналитических исследований путем проведения предварительной оценки по показателям «линейность», «предел количественного определения», «прецизионность» и «селективность». Предел количественного определения устанавливался путем последовательного разбавления модельного раствора этмабена до достижения величины «сигнал – шум» не менее 10. На основании полученных данных была построена и оценена градуировочная кривая в диапазоне концентраций ПКО – 100 · ПКО. Оценку прецизионности проводили во всем диапазоне линейности для трех уровней концентрации этмабена по значениям RSD времен удерживания и площадей пиков. Результаты предварительной оценки пригодности методики представлены в таблице 1

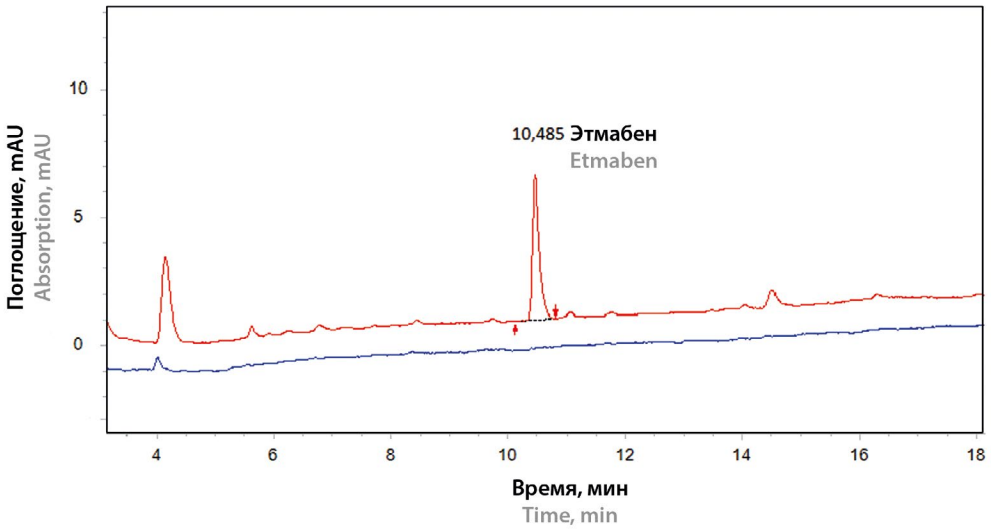


Рисунок 3. Наложение хроматограмм раствора интактной пробы (синий) и модельного (красный) раствора, полученного при использовании ацетонитрила в качестве осадителя, орган – сердце (приближенный вид хроматограммы)

Figure 3. Overlay of chromatograms of intact test (blue) and model (red) solutions, obtained by using acetonitrile as a precipitator, organ – heart (approximate view of the chromatogram)

Таблица 1. Результаты оценки пригодности методики определения этмабена

Table 1. Results of suitability assessments method of ethmaben

Характеристика Characteristic	Результаты Results
Предел количественного определения Limit of quantitative determination	ПКО = 10 нг/мл S/N = 11 ± 1 LOQD = 10 ng/ml S/N = 11 ± 1
Линейность Linearity	Диапазон концентраций: 10–1000 нг/мл. Уравнение линейной регрессии: S = 0,40C + 1,42. Коэффициент корреляции: 0,9991 Concentration range: 10–1000 ng/ml. Linear regression equation: S = 0.40C + 1.42. Correlation coefficient: 0.9991
Прецизионность Precision	C = 10 нг/мл RSD(t) = 1,1 % RSD(S) = 2,4 % C = 100 нг/мл RSD(t) = 0,9 % RSD(S) = 1,5 % C = 1000 нг/мл RSD(t) = 1,0 % RSD(S) = 0,9 % C = 10 ng/ml RSD(t) = 1.1% RSD(S) = 2.4% C = 100 ng/ml RSD(t) = 0.9% RSD(S) = 1.5% C = 1000 ng/ml RSD(t) = 1.0% RSD(S) = 0.9%

Значение свободного члена в уравнении калибровочного графика допустимо, что объясняется шумом базовой линии на хроматограмме и, как следствие, многокомпонентностью биологической матрицы. Ввиду относительно низкого значения он не оказывает значимого влияния на результаты измерений. Значения относительного стандартного отклонения при изучении прецизионности не превышают 15 %, допускаемых для биоаналитических методик, что удовлетворяет критериям приемлемости, установленным регулятором[1].

Отсутствие пиков с временами удерживания, близкими к времени удерживания этмабена (около 10 мин), на хроматограмме интактной пробы (рисунок 3) служит одним из основных параметров подтверждения специфичности предложенных хроматографических условий.

Оптимальные условия пробоподготовки изучались в ходе эксперимента на миокарде, в который была произведена добавка с известным содержанием этмабена, по сравнению с органом, заведомо не содержавшим целевой компонент (интактная проба).

Крыс декапитировали, производилась аутопсия, и извлекалось сердце. Сердце перфузировали 0,9%-м раствором хлорида натрия для удаления крови. Контроль удаления крови производился визуально. Каждое сердце взвешивалось, измельчалось до гомогенного состояния с 3-кратным объемом физио-

[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».

Таблица 2. Сравнительная осадительная способность ацетонитрила и метанола

Table 2. Comparative precipitation abilities of acetonitrile and methanol

Орган Organ	**Масса навески, мг** Weight, mg	**Осадитель** Precipitator	**Средняя площадь пиков и СКО (n = 3)** Average peak area, RSD (*n* = 3)	**Осадительная способность, %** Precipitation abilities, %
Сердце Heart	396	Ацетонитрил Acetonitrile	17,3 (1,1 %)	80
Сердце Heart	333	Метанол Methanol	6,1 (1,3 %)	24

логического раствора. Гомогенат центрифугировали (8000 об/мин, 10 мин) для удаления механических включений клеточной матрицы. Затем к 1 мл полученного супернатанта добавляли в первом случае 1 мл метанола, а во втором случае 1 мл ацетонитрила для осаждения белков с целью сравнительного изучения осадительной эффективности каждого растворителя. Раствор был вновь центрифугирован (8000 об/мин, 15 мин), количественно отделен от выпавших в осадок белковых соединений и доведен выступающей в роли буфера 0,1%-й муравьиной кислотой до 5,0 мл.

Для модельного эксперимента опыт был повторен, но перед проведением пробоподготовки к органу была добавлена аликвота 10 мкл раствора этмабена с концентрацией 500 мг/мл. Модельный эксперимент проведен в трех повторах.

Интактные и модельные растворы хроматографировали трижды.

Для каждого из примененных растворителей была рассчитана эффективность осадительной способности, результаты которой приведены в таблице 2.

Из полученных данных можно сделать вывод, что для осаждения белков ацетонитрил эффективнее метанола, так как обладает лучшей осадительной способностью и удовлетворительной воспроизводимостью, поэтому он был выбран для дальнейшей работы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После введения препаратов в течение 1 месяца ФУ ЛЖ у животных группы этмабена (группа № 3) статистически значимо увеличилась по отношению к контролю (группа № 1) в 1,59 раза ($p = 0{,}0064$) и эмпаглифлозину (группа № 2) в 1,35 раза ($p = 0{,}0250$). Сходная кардиотропная активность была выявлена и в коротких схемах лечения, оцененных ранее [9]. Эмпаглифлозин (группа № 2) не вызывал значимого увеличения ФУ ЛЖ по сравнению с контролем (группа № 1). Возможно, это обусловлено относительно коротким сроком лечения животных, так как эти данные коррелируют с ранее полученными сведениями при изучении долгосрочных схем терапии, где улучшение функциональной активности миокарда обычно происходило на более поздних сроках наблюдения [10]. Через 2 месяца лечения продемонстрировано отсутствие синергизма между этмабеном и эмпаглифлозином вне зависимости от препарата стартовой терапии (группа № 2Б и группа № 3Б), однако продолжение лечения этмабеном (группа № 3А) все так же демонстрировало определенный прирост ФУ ЛЖ у животных (в 1,80, 1,67, 194 и 1,45 раз; $p = 0{,}0009$, $p = 0{,}0048$, $p = 0{,}0117$ и *ns* соответственно) по сравнению с остальными группами животных (группа № 1, 2, 2Б и 3Б соответственно). Последующее введение и эмпаглифлозина (группа № 2А), и этмабена (группа № 3А) на протяжении последующих 30 дней (суммарная длительность лечения – 3 месяца от рандомизации) способствовало дальнейшему увеличению ФУ ЛЖ у этих животных. Изменение ФУ ЛЖ в динамике продемонстрировано на рисунке 4.

Феномен отсутствия синергизма между производным малоновой кислоты и ингибитором натрий-глюкозного котранспортёра 2 типа стал неожиданностью и потребовал дополнительной оценки. На сегодняшний день накоплен большой объем информации о возможных механизмах реализации кардиотропного действия эмпаглифлозина [11–17], а данные о механизме действия этмабена фрагментарны [18], что не позволяет выдвинуть гипотезу о фармакодинамическом взаимодействии.

В связи с этим было проведено исследование распределения этмабена в органе-мишени – миокарде. При анализе концентрации в сердце животных группы 3А (797 ± 77 нг/г), группы 2Б (78 ± 7 нг/г) и группы 3Б (80 ± 6 нг/г) была выявлена разница в концентрациях практически в 10 раз, т. е. введение эмпаглифлозина уменьшало этот показатель, что могло привести к выявленному снижению эффективности комбинированной терапии. Статистически значимой разницы между группами 2Б и 3Б не наблюдалось, что не позволяет сделать однозначный выбор в пользу одного или другого фармакологического агента на старте терапии. Был определен возможный метаболит этмабена и спланированы дополнительные исследования сравнительной фармакокинетики производного малоновой кислоты у здоровых животных и крыс с целевой патологией, синтез возможного метаболита и оценка его эффективности.

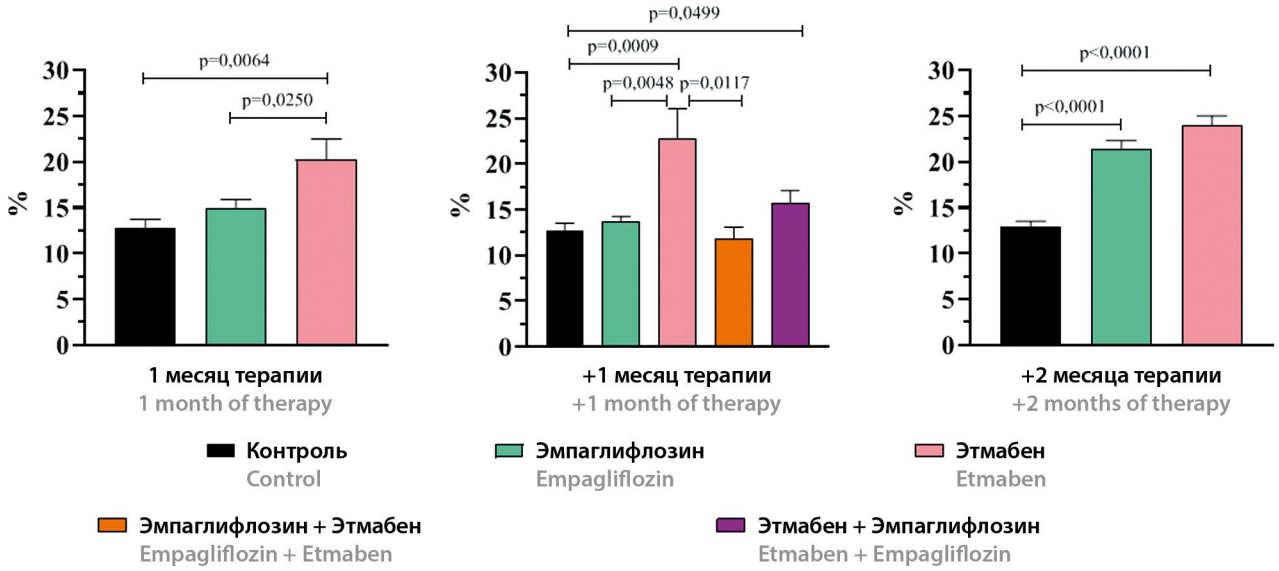


Рисунок 4. Результаты оценки фракции укорочения миокарда левого желудочка при терапии экспериментальной ХСН.

Примечание. Контроль – группа № 1, Эмпаглифлозин – группа № 2, Этмабен – группа № 3, Эмпаглифлозин + Этмабен – группа № 2Б, Этмабен + Эмпаглифлозин – группа № 3Б

Figure 4. Results of left ventricular myocardial shortening fraction evaluation in experimental CHF.

Note. Control – group № 1, Empagliflozin – group № 2, Etmaben – group № 3, Empagliflozin + Etmaben – group № 2B, Etmaben + Empagliflozin – group № 3B

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование выявило кардиотропный эффект этмабена начиная с первого месяца применения и эмпаглифлозина – при длительности лечения не менее трех месяцев – при монотерапии экспериментальной ХСН у крыс, антагонистическое взаимодействие между препаратами при совместном назначении и позволило спланировать дальнейшие неклинические исследования, касающиеся фармакокинетики и фармакодинамики производного малоновой кислоты, как перспективного средства при сердечно-сосудистой патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. McDonagh T. A., Metra M., Adamo M., Gardner R. S., Baumbach A., Böhm M., Burri H., Butler J., Čelutkienė J., Chioncel O., Cleland J. G. F., Coats A. J. S., Crespo-Leiro M. G., Farmakis D., Gilard M., Heymans S., Hoes A. W., Jaarsma T., Jankowska E. A., Lainscak M., Lam C. S. P., Lyon A. R., McMurray J. J. V., Mebazaa A., Mindham R., Muneretto C., Piepoli M. F., Price S., Rosano G. M. C., Ruschitzka F., Skibelund A. K. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2021;42(36):3599–3726. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab368.
2. McDonagh T. A., Metra M., Adamo M., Gardner R. S., Baumbach A., Böhm M., Burri H., Butler J., Čelutkienė J., Chioncel O., Cleland J. G. F., Generosa Crespo-Leiro M., Farmakis D., Gilard M., Heymans S., Hoes A. W., Jaarsma T., Jankowska E. A., Lainscak M., Lam C. S. P., Lyon A. R., McMurray J. J. V., Mebazaa A., Mindham R., Muneretto C., Piepoli M. F., Price S., Rosano G. M. C., Ruschitzka F., Skibelund A. K. 2023 Focused Update of the 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2023;44(37):3627–3639. DOI: 10.1093/eurheartj/ehad195.
3. Shoji S., Mentz R. J. Beyond quadruple therapy: the potential roles for ivabradine, vericiguat, and omecamtiv mecarbil in the therapeutic armamentarium. *Heart Failure Reviews*. 2024;29(5):949–955. DOI: 10.1007/s10741-024-10412-y.
4. Шляхто Е. В., Терещенко С. Н., Чесникова А. И., и др., ред. Клинические рекомендации. Хроническая сердечная недостаточность. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2024. 236 с.
5. 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.
6. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1965.
7. Карпов А. А., Ивкин Д. Ю., Драчева А. В., Питухина Н. Н., Успенская Ю. К., Ваулина Д. Д., Усков И. С., Эйвазова Ш. Д., Минасян С. М., Власов Т. Д., Бурякина А. В., Галагудза М. М. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки. *Биомедицина*. 2014;1(3):32–48.
8. 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.
9. 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;65(4):49–52.
10. Krasnova M., Kulikov A., Okovityi S., Ivkin D., Karpov A., Kaschina E., Smirnov A. Comparative efficacy of empagliflozin and drugs of baseline therapy in post-infarct heart failure in normoglycemic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2020;393(9):1649–1658. DOI: 10.1007/s00210-020-01873-7.
11. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1868.
12. Chen S., Wang Q., Bakker D., Hu X., Zhang L., van der Made I., Tebbens A. M., Kovácsházi C., Giricz Z., Brenner G. B., Ferdinandy P., Schaart G., Gemmink A., Hesselink M. K. C., Rivaud M. R., Pieper M. P., Hollmann M. W., Weber N. C., Balligand J.-L., Creemers E. E., Coronel R., Zuurbier C. J. Empagliflozin prevents heart failure through inhibition of the NHE1-NO pathway, independent of SGLT2. *Basic Research in Cardiology*. 2024;119(5):751–772. DOI: 10.1007/s00395-024-01067-9.
13. 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.
14. 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.
15. Zuurbier C. J., Baartscheer A., Schumacher C. A., Fiolet J. W. T., Coronel R. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin inhibits the cardiac Na^+/H^+ exchanger 1: Persistent inhibition under various experimental conditions. *Cardiovascular Research*. 2021;117(14):2699–2701. DOI: 10.1093/cvr/cvab129.
16. Chung Y. J., Park K. C., Tokar S., Eykyn T. R., Fuller W., Pavlovic D., Swietach P., Shattock M. J. SGLT2 inhibitors and the cardiac Na^+/H^+ exchanger-1: the plot thickens. *Cardiovascular Research*. 2021;117(14):2702–2704. DOI: 10.1093/cvr/cvab184.
17. 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 $[Na^+]_i$ in the heart. *Cardiovascular Research*. 2021;117(14):2794–2806. DOI: 10.1093/cvr/cvaa323.
18. Ивкин Д. Ю., Гришина А. Ю., Красова Е. К. Сравнение возможных фармакологических эффектов инновационных препаратов производных малоновой кислоты – этмабена и малобена. В сб.: От молекулы до лекарственного препарата: Сборник материалов II Всероссийской научной конференции. 23 сентября 2024 года. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет; 2024. С. 29–31.

REFERENSES

1. McDonagh T. A., Metra M., Adamo M., Gardner R. S., Baumbach A., Böhm M., Burri H., Butler J., Čelutkienė J., Chioncel O., Cleland J. G. F., Coats A. J. S., Crespo-Leiro M. G., Farmakis D., Gilard M., Heymans S., Hoes A. W., Jaarsma T., Jankowska E. A., Lainscak M., Lam C. S. P., Lyon A. R., McMurray J. J. V., Mebazaa A., Mindham R., Muneretto C., Piepoli M. F., Price S., Rosano G. M. C., Ruschitzka F., Skibelund A. K. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2021;42(36):3599–3726. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab368.
2. McDonagh T. A., Metra M., Adamo M., Gardner R. S., Baumbach A., Böhm M., Burri H., Butler J., Čelutkienė J., Chioncel O., Cleland J. G. F., Generosa Crespo-Leiro M., Farmakis D., Gilard M., Heymans S., Hoes A. W., Jaarsma T., Jankowska E. A., Lainscak M., Lam C. S. P., Lyon A. R., McMurray J. J. V., Mebazaa A., Mindham R., Muneretto C., Piepoli M. F., Price S., Rosano G. M. C., Ruschitzka F., Skibelund A. K. 2023 Focused Update of the 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2023;44(37):3627–3639. DOI: 10.1093/eurheartj/ehad195.
3. Shoji S., Mentz R. J. Beyond quadruple therapy: the potential roles for ivabradine, vericiguat, and omecamtiv mecarbil in the therapeutic armamentarium. *Heart Failure Reviews*. 2024;29(5):949–955. DOI: 10.1007/s10741-024-10412-y.
4. Shlyakhto E. V., Tereshchenko S. N., Chesnikova A. I., et al., editors. Clinical guidelines. Chronic heart failure. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2024. 236 p. (In Russ.)
5. 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.
6. 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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1965.
7. Karpov A. A., Ivkin D. Yu., Dracheva A. V., Pitukhina N. N., Uspenskaya Yu. K., Vaulina D. D., Uskov I. S., Eyvazova Sh. D., Minasyan S. M., Vlasov T. D., Buryakina A. V.,

Galagudza M. M. Modeling of postinfarction heart failure by occlusion of the left coronary artery in rats: technique and methods of morphofunctional assessment. *Biomedicine*. 2014;1(3):32–48. (In Russ.)

8. 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.
9. Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Dracheva A. V., Pitukhina N. N., Ivkina A. S., Buryakina A. V., Teslev A. A. Effect of a benzoic acid derivative on the development of experimental chronic heart failure. *Pharmacy*. 2016;65(4):49–52. (In Russ.)
10. Krasnova M., Kulikov A., Okovityi S., Ivkin D., Karpov A., Kaschina E., Smirnov A. Comparative efficacy of empagliflozin and drugs of baseline therapy in post-infarct heart failure in normoglycemic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2020;393(9):1649–1658. DOI: 10.1007/s00210-020-01873-7.
11. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1868.
12. Chen S., Wang Q., Bakker D., Hu X., Zhang L., van der Made I., Tebbens A. M., Kovácsházi C., Giricz Z., Brenner G. B., Ferdinandy P., Schaart G., Gemmink A., Hesselink M. K. C., Rivaud M. R., Pieper M. P., Hollmann M. W., Weber N. C., Balligand J.-L., Creemers E. E., Coronel R., Zuurbier C. J. Empagliflozin prevents heart failure through inhibition of the NHE1-NO pathway, independent of SGLT2. *Basic Research in Cardiology*. 2024;119(5):751–772. DOI: 10.1007/s00395-024-01067-9.
13. 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.
14. 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.
15. Zuurbier C. J., Baartscheer A., Schumacher C. A., Fiolet J. W. T., Coronel R. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin inhibits the cardiac Na^+/H^+ exchanger 1: Persistent inhibition under various experimental conditions. *Cardiovascular Research*. 2021;117(14):2699–2701. DOI: 10.1093/cvr/cvab129.
16. Chung Y. J., Park K. C., Tokar S., Eykyn T. R., Fuller W., Pavlovic D., Swietach P., Shattock M. J. SGLT2 inhibitors and the cardiac Na^+/H^+ exchanger-1: the plot thickens. *Cardiovascular Research*. 2021;117(14):2702–2704. DOI: 10.1093/cvr/cvab184.
17. 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 $[Na^+]_i$ in the heart. *Cardiovascular Research*. 2021;117(14):2794–2806. DOI: 10.1093/cvr/cvaa323.
18. Ivkin D. Yu., Grishina A. Yu., Krasova E. K. Comparison possible pharmacological effects of innovative drugs of malonic acid derivatives – ethmaben and maloben. In: From molecule to drug: Collection of materials of the II All-Russian scientific conference. September 23, 2024. St. Petersburg: St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University; 2024. P. 29–31.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.076.9; 615.214.32

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1939

Check for updates

CC BY 4.0

Коррекция депрессивноподобного состояния у крыс, вызванного социальным стрессом, с помощью нового производного тиетан-1,1-диоксида

Г. Г. Гайсина, И. Л. Никитина, Е. Э. Клен, Р. А. Карагузин, А. В. Самородов✉

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России). 450008, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3

✉ **Контактное лицо:** Самородов Александр Владимирович. **E-mail:** AVSamorodov@gmail.com

ORCID: Г. Г. Гайсина – https://orcid.org/0000-0002-1936-3720;
И. Л. Никитина – https://orcid.org/0000-0002-6283-5762;
Е. Э. Клен – https://orcid.org/0000-0001-7538-6030;
Р. А. Карагузин – https://orcid.org/0000-0001-7538-6030;
А. В. Самородов – https://orcid.org/0000-0001-9302-499X.

Статья поступила: 01.10.2024 **Статья принята в печать:** 19.02.2025 **Статья опубликована:** 21.02.2025

Резюме

Введение. Для изучения механизмов развития депрессии и оценки антидепрессивного эффекта новых соединений используют разные животные модели, среди которых модели социального взаимодействия, основанные на действии эмоциональных стрессоров, характеризуются наиболее высокой конструктивной, наглядной и предиктивной валидностью. Модель депрессии у крыс, базирующаяся на повторяющемся опыте социальных поражений, позволяет индуцировать депрессивноподобное состояние, максимально приближенное к депрессии у человека, и оценивать эффект новых веществ с антидепрессивной активностью.

Цель. Исследовать антидепрессивный эффект 3-этокситиетан-1,1-диоксида (3ЭТД) на модели зоосоциального взаимодействия у крыс.

Материалы и методы. Белые неинбредные крысы-самцы массой 200–250 г (интрудеры) ежедневно на протяжении 24 дней получали 3ЭТД (2 мг/кг, группы «3ЭТД» и «Стресс + 3ЭТД») или физиологический раствор (группы «Контроль» и «Стресс») в/б. Через 30 минут после введения животные групп «Стресс» и «Стресс + 3ЭТД» подвергались 10-минутным конфронтациям с резидентами (неинбредными крысами-самцами массой 350–400 г). На +23 сутки оценивали развитие депрессивноподобного состояния у интрудеров всех групп в тесте «принудительное плавание», на +24 проводили тесты «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Ежедневно регистрировали массу тела интрудеров и количество потребленного корма, по окончании эксперимента – весовые коэффициенты их внутренних органов.

Результаты и обсуждение. Длительная повторяющаяся конфронтация с резидентами приводила к развитию депрессивноподобного состояния у интрудеров к +23 суткам. 3ЭТД проявлял антидепрессивные свойства, устраняя последствия социального стресса у интрудеров: статистически значимо снижал поведение отчаяния в тесте «принудительное плавание», повышал исследовательскую, социальную и двигательную активность животных, долю активных форм защитного поведения, снижая долю пассивных форм, в ходе взаимодействия с резидентами и не влиял на прирост массы тела и потребление пищи.

Заключение. 3ЭТД при ежедневном внутрибрюшинном введении в дозе 2 мг/кг на протяжении 24 суток эффективно корректирует последствия зоосоциального взаимодействия, оказывая антидепрессивное действие.

Ключевые слова: тиетаны, антидепрессивная активность, зоосоциальное взаимодействие, крысы, депрессия

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

Вклад авторов. Е. Э. Клен синтезировала соединения, участвовала в обсуждении результатов и написании текста статьи. И. Л. Никитина разработала идею и дизайн эксперимента, участвовала в обсуждении результатов и написании текста статьи. Г. Г. Гайсина проводила эксперимент, участвовала в обсуждении результатов и написании текста статьи.

© Гайсина Г. Г., Никитина И. Л., Клен Е. Э., Карагузин Р. А., Самородов А. В., 2025
© Gaisina G. G., Nikitina I. L., Klen E. E., Karaguzin R. A., Samorodov A. V., 2025

А. В. Самородов обрабатывал данные, участвовал в обсуждении результатов и написании текста статьи. Р. А. Карагузин участвовал в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-25-00144 «Создание средства для коррекции депрессии при нарушении мозгового кровообращения», ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России).

Соответствие принципам этики. Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (протокол № 9 от 28.10.2020 г.).

Для цитирования: Гайсина Г. Г., Никитина И. Л., Клен Е. Э., Карагузин Р. А., Самородов А. В. Коррекция депрессивноподобного состояния у крыс, вызванного социальным стрессом, с помощью нового производного тиетан-1,1-диоксида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):358–364. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1939

Correction of depressive-like state in rats induced by social stress using a new 3-substituted thietane-1,1-dioxide derivative

Gulnara G. Gaisina, Irina L. Nikitina, Elena E. Klen, Rail A. Karaguzin, Aleksandr V. Samorodov✉

Bashkir State Medical University (BSMU). 3, Lenina str., Ufa, Republic of Bashkortostan, 450008, Russia

✉ **Corresponding author:** Aleksandr V. Samorodov. **E-mail:** AVSamorodov@gmail.com

ORCID: Gulnara G. Gaisina – https://orcid.org/0000-0002-1936-3720;
Irina L. Nikitina – https://orcid.org/0000-0002-6283-5762;
Elena E. Klen – https://orcid.org/0000-0001-7538-6030;
Rail A. Karaguzin – https://orcid.org/0000-0001-7538-6030;
Aleksandr V. Samorodov – https://orcid.org/0000-0001-9302-499X.

Received: 01.10.2024 **Accepted:** 19.02.2025 **Published:** 21.02.2025

Abstract

Introduction. Among the various animal models of depression used to study the pathogenesis of depression and to evaluate the antidepressant action of new compounds, models based on social stress are characterized by high constructive, face and predictive validity. The rat model of depression based on the repeated social defeats allows to induce a depressive-like state corresponding to depression in humans and to evaluate the effect of new substances with antidepressant activity.

Aim. To study the antidepressant effect of 3-ethoxythietane-1,1-dioxide (3ETD) on rats using resident-intruder paradigm.

Materials and methods. White outbred male rats weighing 200–250 g (intruders) received 3ETD (2 mg/kg, groups "3ETD" and "Stress + 3ETD") or saline (groups "Control" and "Stress") intraperitoneally daily for 24 days. Thirty minutes after the administration, the animals of the "Stress" and "Stress + 3ETD" groups were subjected to 10-minute interaction with the residents (outbred male rats weighing 350–400 g). On day +23, intruders were tested in the forced swimming test, on day +24, the open field and elevated plus maze tests were performed. The body weight of the intruders and the amount of food consumed were recorded daily. At the end of the experiment, the weight coefficients of their internal organs were recorded.

Results and discussion. Chronic repeated confrontation with residents led to the development of a depressive-like state in intruders by day +23. 3ETD exhibited antidepressant properties, eliminating the effects of social stress in intruders: 3ETD reduced despair behavior in the forced swimming test, increased exploratory, social, and motor activity of animals, the proportion of active forms of protective behavior, and reduced the proportion of passive forms during the resident-intruder interaction.

Conclusion. 3ETD, when administered intraperitoneally daily at a dose of 2 mg/kg for 24 days, exhibited a pronounced antidepressant effect, eliminating the depressive-like state in rats caused by repeated social defeats.

Keywords: thietane, antidepressive agents, social defeat, rats, depression

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 E. Klen synthesized the compound, participated in the discussion of the results and writing the text of the article. Irina L. Nikitina developed the idea and design of the experiment, participated in the discussion of the results and writing the text of the article. Gulnara G. Gaisina performed the experiment, processed the data, participated in the discussion of the results and writing the text of the article. Aleksandr V. Samorodov processed the data, participated in the discussion of the results and writing the text of the article. Rail A. Karaguzin participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. This research was funded by the Russian Science Foundation grant N23-25-00144 “Development of a drug for the correction of depression associated with cerebrovascular disorders” (https://rscf.ru/en/project/23 -25-00144).

Compliance with the principles of ethics. This research was funded by the Russian Science Foundation grant N23-25-00144 "Development of a drug for the correction of depression associated with cerebrovascular disorders" (https://rscf.ru/en/project/23-25-00144).

For citation: Gaisina G. G., Nikitina I. L., Klen E. E., Karaguzin R. A., Samorodov A. V. Correction of depressive-like state in rats induced by social stress using a new 3-substituted thietane-1,1-dioxide derivative. *Drug development & registration*. 2025;14(1):358–364. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1939

ВВЕДЕНИЕ

Для изучения механизмов развития депрессии и оценки антидепрессивного эффекта новых соединений используют разные животные модели, среди которых модели социального взаимодействия (социального поражения, социальной изоляции, отлучения потомства от матери и ультразвуковая модель), основанные на действии эмоциональных стрессоров, характеризуются наиболее высокой конструктивной, наглядной и предиктивной валидностью [1]. Модель депрессии у крыс, базирующаяся на негативном опыте социальных поражений (межсамцовых конфронтаций), позволяет индуцировать депрессивноподобное состояние, максимально приближенное к депрессии у человека. В течение первых 6 суток межсамцовых конфронтаций у интрудеров формируется острая стрессовая реакция, продолжение межсамцовых конфронтаций приводит к формированию отчетливого депрессивноподобного состояния [2].

Поиск новых антидепрессантов является одной из важнейших задач фармакологии. На протяжении десятилетий распространенность и бремя депрессивных расстройств продолжают расти и занимать лидирующие позиции среди причин нетрудоспособности: так, с 2009 по 2019 гг. доля депрессивных расстройств в структуре 25 ведущих причин глобального бремени болезней возросла на 61,1 % (по показателю потерянных лет здоровой жизни – DALYs) [3], а пандемия COVID-19 увеличила глобальную распространенность депрессии на 27,6 % [4]. Необходимость замещения импортных средств, в том числе психотропных, отечественными обусловлена реалиями современной геополитической обстановки и закреплена в Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2030 г.

В результате систематических исследований, проводимых на кафедре фармакологии Башкирского государственного медицинского университета (БГМУ), было найдено перспективное малотоксичное соединение – 3-этокситиетан-1,1-диоксид (3ЭТД), проявляющее выраженную антидепрессивную активность при однократном и длительном внутрибрюшинном (в/б) введении неинбредным мышам-самцам [5] в широком диапазоне доз [6].

Цель настоящего исследования – углубленная характеристика антидепрессивного эффекта 3ЭТД на животной модели депрессивноподобного состояния «резидент – интрудер» [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 24 белых неинбредных крысах-самцах (массой 250–400 г) и самках (массой 200–250 г), которых содержали при температуре 20–22 °С и относительной влажности воздуха 40–60 % в условиях 12-часового светового режима (включение света в 08:00); животные имели свободный доступ к воде и пище (экструдированный корм ГОСТ Р 50258-92, ООО «ГРУППА-СПЕЦКОМ», Россия).

Для моделирования депрессивноподобного состояния у крыс-самцов использовали метод «резидент – интрудер» [7]. За неделю до начала эксперимента (на –6 сутки) крупные крысы-самцы массой 350–400 г (резиденты) были помещены в индивидуальные клетки 90 × 50 × 60 см, в которых они содержались до окончания эксперимента без смены подстила. Для выработки поведения доминирования в течение этой недели резиденты содержались вместе со стерилизованными самками (с –6 по 0 сутки) и дважды в день (утром и вечером на –2 и –1 сутки) подвергались 10-минутному контакту с крысами-самцами меньшей массы (250–300 г), которые далее не участвовали в эксперименте.

Крысы-самцы массой 250–300 г случайным образом были распределены в 4 экспериментальные группы по 6 животных в каждой: 1 – Контроль, 2 – 3ЭТД, 3 – Стресс, 4 – Стресс + 3ЭТД.

Животные групп 1 и 2 (интактные) не контактировали с резидентами и содержались в отдельном помещении на протяжении всего эксперимента. Животные групп 3 и 4 (стрессированные, интрудеры) ежедневно подвергались взаимодействию с резидентами в течение 10 минут таким образом, чтобы повторного контакта между резидентами и интрудерами не происходило. По окончании конфронтации между резидентом и интрудером устанавливали прозрачную перфорированную перегородку, и интрудер оставался в клетке резидента на сутки (до следующей конфронтации с новым резидентом).

3-этокситиетан-1,1-диоксид (3ЭТД) суспендировали и разводили в физиологическом растворе и вводили в/б (0,4 мл на 200 г массы тела) в дозе 2 мг/кг животным групп 2 и 4 за 30 минут до начала конфронтаций. Животные групп 1 и 3 получали эквиобъемное количество физиологического раствора в/б.

Конфронтации «резидент – интрудер» осуществляли ежедневно в темное время суток в течение 10 минут на протяжении 24 дней (с 0 по +23 сутки). Через 30 минут после введения физиологического раствора / 3ЭТД интрудеров групп 3 и 4 подсаживали в клетки резидентов, в 20:00 вынимали перегородки между резидентами и интрудерами и начинали видеозапись (Panasonic V760). Поведение интрудеров анализировали с помощью программы RealTimer (ООО «НПК Открытая Наука», Россия): регистрировали суммарную длительность в секундах поведенческих паттернов «латентный период первого взаимодействия», «социальное исследование», «несоциальное исследование», «половой акт» (инициированный интрудером), «борьба», «нападение», «вертикальная стойка», «стойка с упором», «перемещение», «груминг», «сидит», «движение прочь», «бегство», «защитная вертикальная поза», «замирание», «поза подчинения», «латентный период позы подчинения». Затем рассчитывали длительность типов поведения «социальное взаимодействие» (сумма паттернов «половой акт», «борьба» и «нападение»), «бездействие» (сумма паттернов «вертикальная стойка», «стойка с упором», «перемещение», «несоциальное исследование», «груминг», «сидит») и «защита» (сумма паттернов «движение прочь», «бегство», «защитная вертикальная поза», «замирание» и «поза подчинения») и суммарную долю типов поведения и отдельных поведенческих паттернов в структуре поведения интрудеров по формуле:

$$\text{суммарная доля} = \text{сумма значений удельного веса в каждый из дней эксперимента} \times 100 / 24.$$

На +23 сутки проводили тест «принудительное плавание» (ТПП) по R. Porsolt [8], на +24 сутки – тесты «открытое поле» (ОП) и «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) [9]. После проведения тестов животных подвергали эвтаназии, выделяли внутренние органы (печень, селезенку, тимус, надпочечники) и определяли их весовые коэффициенты. Дополнительно на протяжении всего эксперимента регистрировали массы тела интрудеров и количество потребленной ими пищи.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы STATISTICA 13.3 (StatSoft, США): оценивали нормальность распределения и рассчитывали медиану (Me), межквартильный интервал, непараметрические критерии Краскелла – Уоллиса и Манна – Уитни (для сравнения независимых выборок), Фридмана и Уилкоксона (для сравнения зависимых выборок) [10]. Для всех видов анализа уровень статистической значимости различий принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Хронический социальный стресс увеличивал длительность иммобилизации (ДИМ) в ТПП на +23 сутки на 23 % ($p = 0{,}016$) по сравнению с интактным контролем, а 3ЭТД устранял этот эффект, снижая ДИМ на 30 % ($p = 0{,}011$) по сравнению с группой «Стресс» до уровня интактного контроля (рисунок 1, А).

В тестах ОП и ПКЛ (+24 сутки) значительных изменений в поведении интрудеров выявлено не было (рисунок 1, Б).

Под влиянием хронического социального стресса поведение интрудеров значительно изменялось на протяжении эксперимента: отмечалось снижение длительности «социального взаимодействия», «бездействия», «социального исследования», «латентного периода подчинения», а также повышение длительности «защиты» за счет пассивных форм защиты («замирания» и «позы подчинения») по сравнению с исходным уровнем (0 сутки).

3ЭТД корректировал стрессиндуцированные изменения в поведении интрудеров. При анализе структуры поведения интрудеров было выявлено, что 3ЭТД снижал суммарную долю «позы подчинения» (в 2,2 раза, $p = 0{,}018$) и «латентного периода первого взаимодействия» (в 1,3 раза, $p = 0{,}045$), а также повышал суммарную долю «социального взаимодействия» (в 2,8 раз, $p = 0{,}045$) по сравнению с группой «Стресс».

При парном сравнении групп в каждой временной точке эксперимента было установлено, что 3ЭТД статистически значимо повышал длительность «социального исследования» в 6–27 раз (+2, +3, +4, +6, +16 сутки), «социального взаимодействия» в 5–26 раз (+3, +4, +6, +7, +22 сутки) за счет паттернов «нападение» (+4, +5 сутки), «борьба» (+3, +22 сутки), «половой акт» (+4 сутки), а также длительность «бездействия» в 2–5 раз (+2, +6, +14 сутки) за счет паттернов «перемещение» (+1, +2, +4, +5, +6, +7 сутки), «несоциальное исследование» (+6, +14 сутки), «вертикальная стойка» (+7 сутки) и «стойка с упором» (+6, +7 сутки). Длительность защитного поведения под влиянием 3ЭТД снижалась в 1,3–2 раза (+2, +4, +6, +14 сутки) за счет пассивных форм защиты «поза подчинения» (+21, +22 сутки) и «замирание» (+4, +6 сутки), однако при этом отмечалось увеличение активных защитных форм «бегство» (+7, +11, +19 сутки) и «движение прочь» (+6, +16, +17 сутки) по сравнению с группой «Стресс» ($p < 0{,}05$ для критерия Манна – Уитни).

Потребление пищи, масса тела интрудеров и весовые коэффициенты их внутренних органов были сопоставимы во всех экспериментальных группах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Модели депрессивноподобного состояния, основанные на социальном стрессе, характеризуются общностью поведенческих и патогенетических изменений у лабораторных животных и людей в зависи-

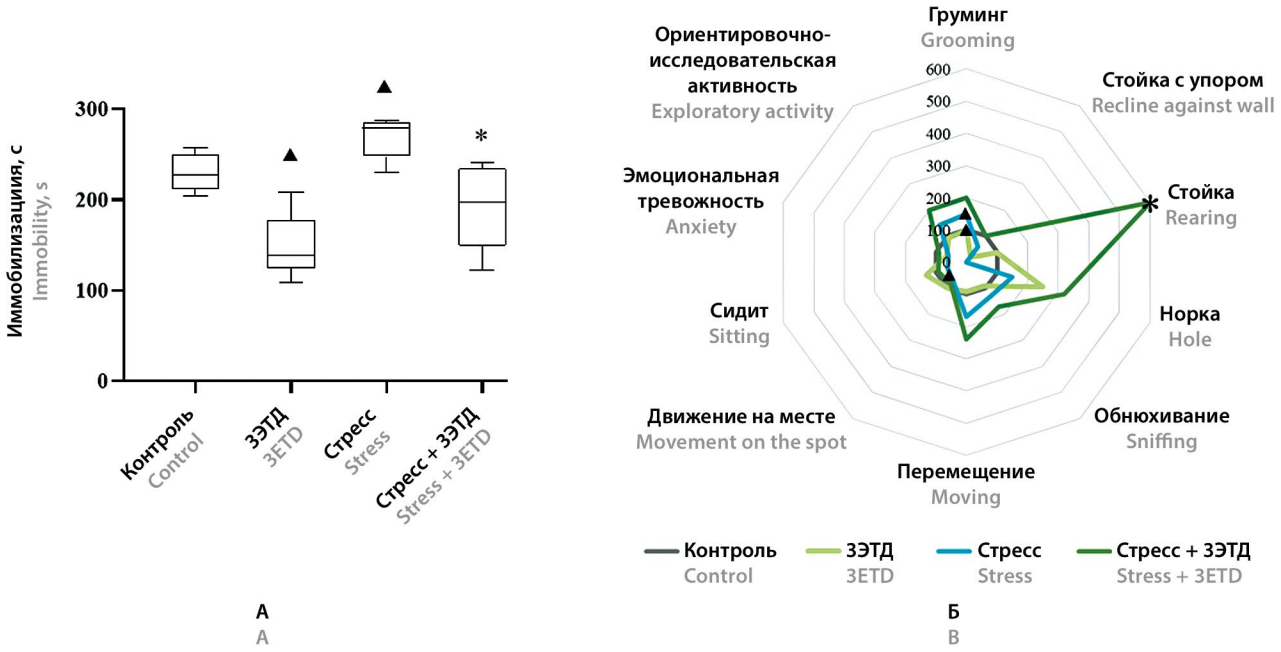


Рисунок 1. Влияние ЭЭТД на поведение крыс-интрудеров, подвергнутых социальному стрессу, в тестах «принудительное плавание» (А) и «открытое поле» (В):

ЭЭТД – 3-этокситиетан-1,1-диоксид; на рисунке А приведены медиана, межквартильный интервал, минимальное и максимальное значения; на рисунке Б – медианы, выраженные в процентах по отношению к интактному контролю; * – $p < 0,05$, по сравнению с группой «Стресс», ▲ – $p < 0,05$, по сравнению с интактным контролем (критерий Манна – Уитни).

Figure 1. Effect of 3ETD on the behavior of intruders in the forced swimming test (A) and open field test (B):

Note. 3ETD – 3-ethoxythietane-1,1-dioxide; figure A shows the median, interquartile range, minimum and maximum values; figure B shows the medians expressed as a percentage relative to the vehicle; * – $p < 0,05$, compared to the "Stress" group, ▲ – $p < 0,05$, compared to vehicle (Mann-Whitney test).

мости от их положения в социальной иерархии, что позволяет легко экстраполировать выявленные эффекты на человека и обеспечивает высокую конструктивную валидность метода. Использованная нами модель зоосоциального взаимодействия (многократного подвергания интрудеров опыту социальных поражений при взаимодействии с резидентами), базирующаяся на методе Koolhaas и соавт. [7], позволяет не только моделировать у интрудеров состояние, патогенетически близкое к развитию депрессии у человека под влиянием негативных социальных факторов, но и характеризовать антидепрессивный эффект новых молекул, исследуя изменения поведенческих паттернов в процессе социальных контактов. Подобный подход успешно применяется для разработки новых психотропных средств [11–14].

Под влиянием хронического социального стресса к концу эксперимента у интрудеров было смоделировано депрессивноподобное состояние, проявлявшееся значительным увеличением ДИМ ТПП по сравнению с контролем (+23 сутки), а также снижением коммуникативности, исследовательской и двигательной активности, активных форм защиты, увеличением пассивных форм поведения в ходе взаимодействия с резидентами, о чем свидетельствует снижение длительности паттерна «социальное исследование», типов поведения «социальное взаимодействие» (паттерна «борьба») и «бездействие» (паттернов «несоциальное исследование», «вертикальная стойка», «стойка с упором», «перемещение», «груминг»), паттерна «движение прочь» и увеличение продолжительности паттернов «сидит», «замирание» и «поза подчинения» в динамике по сравнению с исходным уровнем (день 0). Масса тела интрудеров, потребление корма и весовые коэффициенты внутренних органов под влиянием социального стресса значимо не изменялись.

ЭЭТД эффективно корректировал депрессивноподобное состояние у крыс, снижая ДИМ ТПП до уровня интактных животных. В ходе взаимодействия с резидентами ЭЭТД повышал коммуникативность и защитную агрессию интрудеров, увеличивая «социальное исследование» и «социальное взаимодействие», и снижал «латентный период первого взаимодействия» и «груминг», являющийся показателем социальной пассивности. Снижение типа поведения «защита» под влиянием ЭЭТД по сравнению со стрессированными животными было связано с

уменьшением доли пассивных форм защиты – «замирания», имевшего наибольший удельный вес в структуре поведения интрудеров обеих групп, и «позы подчинения» – основного критерия развития депрессивноподобного состояния [7]. ЭЭТД также значительно повышал индивидуальное поведение крыс – исследовательскую активность (увеличивал длительность и суммарную долю паттерна «несоциальное исследование»), горизонтальную («перемещение») и вертикальную («вертикальная стойка», «стойка с упором») двигательную активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЭЭТД при длительном ежедневном в/б введении эффективно корректировал депрессивноподобное состояние у крыс-интрудеров, сформированное в процессе длительно повторяющихся межсамцовых конфронтаций (модель «резидент – интрудер»): снижал поведение отчаяния в тесте «принудительное плавание» (на 30 %), повышал исследовательскую (на 35 %), социальную (на 122 %) и двигательную активность животных (на 129 %), долю активных форм защитного поведения (на 115 %), снижая долю пассивных форм (на 14 %), в ходе взаимодействия с резидентами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ушакова В. М., Морозова А. Ю., Резник А. М., Костюк Г. П., Чехонин В. П. Молекулярно-биологические аспекты депрессивных состояний: современный взгляд на проблему. *Молекулярная биология*. 2020;54(5):725–749.
2. Бахшалиева А. Я. Особенности развития депрессивного состояния у крыс с различным индивидуально-типологическим поведенческим статусом. *Нейрофизиология*. 2010;42(2):153–161.
3. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2020;396(10258):1204–1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9.
4. Santomauro D. F., Mantilla Herrera A. M., Shadid J., Zheng P., Ashbaugh C., Pigott D. M., Abbafati C., Adolph C., Amlag J. O., Aravkin A. Y., Bang-Jensen B. L., Bertolacci G. J., Bloom S. S., Castellano R., Castro E., Chakrabarti S., Chattopadhyay J., Cogen R. M., Collins J. K., Dai X., Dangel W. J., Dapper C., Deen A., Erickson M., Ewald S. B., Flaxman A. D., Frostad J. J., Fullman N., Giles J. R., Zergaw Giref A., Guo G., He J., Helak M., Hulland E. N., Idrisov B., Lindstrom A., Linebarger E., Lotufo P. A., Lozano R., Magistro B., Carvalho Malta D., Månsson J. C., Marinho F., Mokdad A. H., Monasta L., Naik P., Nomura S., O'Halloran J. K., Ostroff S. M., Pasovic M., Penberthy L., Reiner (Jr.) R. C., Reinke G., Ribeiro A. L. P., Sholokhov A., Sorensen R. J. D., Varavikova E., Vo A. T., Walcott R., Watson S., Wiysonge C. S., Zigler B., Hay S. I., Vos T., Murray C. J. L., Whiteford H. A., Ferrari A. J. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *The Lancet*. 2021;398(10312):1700–1712. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02143-7.
5. Халиуллин Ф. А., Никитина И. Л., Клен Е. Э., Гайсина Г. Г., Макарова Н. Н. Синтез, антидепрессивная активность и прогноз токсических рисков 3-алкокси(сульфанил)тиетан-1,1-диоксидов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(12):8–15.
6. Гайсина Г. Г., Никитина И. Л. Исследование диапазона эффективных доз нового производного 3-замещенного тиетан-1,1-диоксида. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2020;15(6):48-50.
7. Koolhaas J. M., Coppens C. M., de Boer S. F., Buwalda B., Meerlo P., Timmermans P. J. A. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(77):e4367. DOI: 10.3791/4367.
8. Porsolt R. D. Animal model of depression. *Biomedicine*. 1979;30(3):139–140.
9. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M., Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013;6(3):126–135. DOI: 10.2478/intox-2013-0020.
10. Oliveira A. G. Biostatistics Decoded. Hoboken: Wiley; 2020. 480 p.
11. Мурталиева В. Х., Ясенявская А. Л., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф., Самотруева М. А. Влияние семакса на уровень нейротрофических факторов как маркеров тревожно-депрессивного состояния в условиях стресса. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2023;86(3):3–10.
12. Carnevali L., Montano N., Tobaldini E., Thayer J. F., Sgoifo A. The contagion of social defeat stress: insights from rodent studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2020;111:12–18. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2020.01.011.
13. Merritt H., Severino G. J., Izquierdo E. J. The Dynamics of Social Interaction Among Evolved Model Agents. *Artificial Life*. 2024;30(2):216–239. DOI: 10.1162/artl_a_00417.
14. El Rawas R., Amaral I. M., Hofer A. Social interaction reward: A resilience approach to overcome vulnerability to drugs of abuse. *European Neuropsychopharmacology*. 2020;37:12–28. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2020.06.008.

REFERENCES

1. Ushakova V. M., Morozova A. Yu., Reznik A. M., Kostyuk G. P., Chekhonin V. P. Molecular biological aspects of depressive states: a modern view of the problem. *Molecular Biology*. 2020;54(5):725–749. (In Russ.)
2. Bakhshalieva A. Ya. Peculiarities of depressive state development in rats with different individual-typological behavioral state. *Neurophysiology*. 2010;42(2):153–161. (In Russ.)
3. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2020;396(10258):1204–1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9.
4. Santomauro D. F., Mantilla Herrera A. M., Shadid J., Zheng P., Ashbaugh C., Pigott D. M., Abbafati C., Adolph C., Amlag J. O., Aravkin A. Y., Bang-Jensen B. L., Bertolacci G. J., Bloom S. S., Castellano R., Castro E., Chakrabarti S., Chattopadhyay J., Cogen R. M., Collins J. K., Dai X., Dangel W. J., Dapper C., Deen A., Erickson M., Ewald S. B.,

Flaxman A. D., Frostad J. J., Fullman N., Giles J. R., Zergaw Giref A., Guo G., He J., Helak M., Hulland E. N., Idrisov B., Lindstrom A., Linebarger E., Lotufo P. A., Lozano R., Magistro B., Carvalho Malta D., Månsson J. C., Marinho F., Mokdad A. H., Monasta L., Naik P., Nomura S., O'Halloran J. K., Ostroff S. M., Pasovic M., Penberthy L., Reiner (Jr.) R. C., Reinke G., Ribeiro A. L. P., Sholokhov A., Sorensen R. J. D., Varavikova E., Vo A. T., Walcott R., Watson S., Wiysonge C. S., Zigler B., Hay S. I., Vos T., Murray C. J. L., Whiteford H. A., Ferrari A. J. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *The Lancet*. 2021;398(10312):1700–1712. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02143-7.

5. Khaliullin F. A., Nikitina I. L., Klen E. E., Gaysina G. G., Makarova N. N. Synthesis, Antidepressant Activity, and Prediction of Toxic Risks of 3-Alkoxy(Sulfanyl)Thietane-1,1-Dioxides. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(12):8–15. (In Russ.)
6. Gaisina G. G., Nikitina I. L. Study of the range of effective doses of a new 3-substituted thietane-1,1-dioxide derivative. *Bashkortostan Medical Journal*. 2020;15(6):48-50. (In Russ.)
7. Koolhaas J. M., Coppens C. M., de Boer S. F., Buwalda B., Meerlo P., Timmermans P. J. A. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(77):e4367. DOI: 10.3791/4367.
8. Porsolt R. D. Animal model of depression. *Biomedicine*. 1979;30(3):139–140.
9. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M., Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013;6(3):126–135. DOI: 10.2478/intox-2013-0020.
10. Oliveira A. G. Biostatistics Decoded. Hoboken: Wiley; 2020. 480 p.
11. Murtalieva V. Kh., Yasenyavskaya A. L., Andreeva L. A., Myasoedov N. F., Samotrueva M. A. The influence of semax on the level of neurotrophic factors as markers of anxiety and depression under stress. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2023;86(3):3–10. (In Russ.)
12. Carnevali L., Montano N., Tobaldini E., Thayer J. F., Sgoifo A. The contagion of social defeat stress: insights from rodent studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2020;111:12–18. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2020.01.011.
13. Merritt H., Severino G. J., Izquierdo E. J. The Dynamics of Social Interaction Among Evolved Model Agents. *Artificial Life*. 2024;30(2):216–239. DOI: 10.1162/artl_a_00417.
14. El Rawas R., Amaral I. M., Hofer A. Social interaction reward: A resilience approach to overcome vulnerability to drugs of abuse. *European Neuropsychopharmacology*. 2020;37:12–28. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2020.06.008.

Оригинальная статья / Research article

УДК 57.043

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1957

Check for updates

CC BY 4.0

Сравнение влияния медного хлорофиллина, рибоксина, индралина и совместного применения глутатиона и аскорбиновой кислоты на выживаемость мышей при фракционированном облучении рентгеновским излучением

Л. А. Ромодин✉, А. А. Московский, О. В. Никитенко, Т. М. Бычкова, Е. Д. Родионова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России). 123098, Россия, г. Москва, ул. Живописная, д. 46, стр. 8

✉ **Контактное лицо:** Ромодин Леонид Александрович. **E-mail:** rla2904@mail.ru

ORCID: Л. А. Ромодин – https://orcid.org/0000-0001-8978-1250;
А. А. Московский – https://orcid.org/0009-0002-4033-0269;
О. В. Никитенко – https://orcid.org/0000-0001-9011-4500;
Т. М. Бычкова – https://orcid.org/0000-0003-2678-6964;
Е. Д. Родионова – https://orcid.org/0009-0005-0676-9253.

Статья поступила: 27.10.2024 **Статья принята в печать:** 20.02.2025 **Статья опубликована:** 25.02.2025

Резюме

Введение. Проблема отсутствия эффективного и безопасного фармакологического средства смягчения последствий воздействия ионизирующего излучения становится все более актуальной. Ее решение затруднено по причине высокой химической токсичности всех известных по-настоящему эффективных радиопротекторов. Сейчас большое внимание уделяется изучению радиозащитных свойств так называемых природных соединений. Но в большинстве данных работ экспериментальная модель подвергалась единоразовому острому облучению. В то же время безопасный и эффективный радиозащитный препарат в условиях фракционированного облучения будет полезен при лучевой терапии онкологических заболеваний и при выполнении космических миссий, а также в условиях радиационного загрязнения территорий.

Цель. Сравнение радиозащитного эффекта медного хлорофиллина, рибоксина, также называемого инозином, и совместного применения глутатиона и аскорбиновой кислоты с таковым для эталонного российского радиопротектора индралина при фракционированном воздействии рентгеновским излучением.

Материалы и методы. Самцы мышей ICR (CD-1) были подвергнуты пяти ежедневным облучениям в дозе 2,5 Гр. В дни каждого облучения экспериментальным животным вводились хлорофиллин (20 мкг/г), индралин (50 мкг/г) в растворе винной кислоты или глутатион (250 мкг/г) и аскорбиновая кислота (150 мкг/г) перед облучением или рибоксин (200 мкг/г) после облучения. Выживаемость мышей оценивалась в течение 30 суток после последнего облучения.

Результаты и обсуждение. Только применение рибоксина обеспечило выживаемость 10 % облученных животных, однако без статистически значимого повышения средней продолжительности жизни погибших особей относительно группы интактных мышей. Значимое повышение данного параметра обеспечило только использование индралина. Медный хлорофиллин не оказал радиозащитного действия. Возможно, применение безметаллических производных хлорофилла в будущем сможет оказать радиопротекторное действие в данных условиях. Совместное применение глутатиона и аскорбиновой кислоты привело к гибели 2 из 10 мышей в период облучений и введений препаратов, не обеспечив повышения выживаемости в период наблюдений.

Заключение. Применение медного хлорофиллина и глутатиона с аскорбиновой кислотой не обеспечило повышения выживаемости и средней продолжительности жизни умерших мышей, подвергнутых облучению в дозе 12,5 Гр, распределенной на 5 фракций по 2,5 Гр. Применение индралина повысило только продолжительность жизни павших животных. Рибоксин способствовал выживанию 10 % соответствующей группы.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, радиопротектор, фракционированное облучение, хлорофиллин, рибоксин, инозин, индралин, глутатион, аскорбиновая кислота

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

© Ромодин Л. А., Московский А. А., Никитенко О. В., Бычкова Т. М., Родионова Е. Д., 2025
© Romodin L. A., Moskovskij A. A., Nikitenko O. V., Bychkova T. M., Rodionova E. D., 2025

Вклад авторов. Л. А. Ромодин – научное обоснование исследования и разработка протокола эксперимента, организационная часть исследования, участие в эксперименте с животными, анализ экспериментальных данных в контексте литературных сведений, написание текста статьи. А. А. Московский – участие в эксперименте с животными, редактура текста статьи. О. В. Никитенко и Т. М. Бычкова – проведение эксперимента с животными и обработка экспериментальных данных. Е. Д. Родионова – участие в эксперименте с животными, подготовка англоязычной версии статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, https://rscf.ru/project/23-24-00383/

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ ГНЦ ФМБЦ имени А. И. Бурназяна (выписка из протокола № 113 от 07.02.2024 г.) и выполнено в соответствии с Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных (International Guiding Principlesfor Biomedical Research Involving Animals, 1985).

Для цитирования: Ромодин Л. А., Московский А. А., Никитенко О. В., Бычкова Т. М., Родионова Е. Д. Сравнение влияния медного хлорофиллина, рибоксина, индралина и совместного применения глутатиона и аскорбиновой кислоты на выживаемость мышей при фракционированном облучении рентгеновским излучением. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):365–374. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1957

Comparison of the effects of copper chlorophyllin, riboxin, indralin and the combined use of glutathione and ascorbic acid on the survival of mice during fractionated X-ray irradiation

Leonid A. Romodin✉, Alexander A. Moskovskij, Olga V. Nikitenko, Taisia M. Bychkova, Elizaveta D. Rodionova

A. I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the FMBA of Russia. 46/8, Zhivopisnaya str., Moscow, 123098, Russia

✉ **Corresponding author:** Leonid A. Romodin. **E-mail:** rla2904@mail.ru

ORCID: Leonid A. Romodin – https://orcid.org/0000-0001-8978-1250;
Alexander A. Moskovskij – https://orcid.org/0009-0002-4033-0269;
Olga V. Nikitenko – https://orcid.org/0000-0001-9011-4500;
Taisia M. Bychkova – https://orcid.org/0000-0003-2678-6964;
Elizaveta D. Rodionova – https://orcid.org/0009-0005-0676-9253.

Received: 27.10.2024 **Accepted:** 20.02.2025 **Published:** 25.02.2025

Abstract

Introduction. The problem of effectiveness and safe pharmacological means of reducing the consequences of exposure to the ionizing effect is becoming increasingly urgent. This solution is difficult due to the high chemical toxicity of all known modern effective radioprotectors. Nowadays, much attention is paid to the study of the radioprotective properties of the so-called effects. But in most of these works, the experimental model was subjected to a one-time acute irradiation. At the same time, a safe and effective radioprotective drug under conditions of fractionated irradiation will be useful in radiation therapy for oncological diseases and during space missions, as well as in conditions of radiation contamination of territories.

Aim. Comparison of the radioprotective effect of copper chlorophyllin, riboxin, also called inosine, and the combined use of glutathione and ascorbic acid with that of the reference Russian radioprotector indralin during fractionated exposure to X-ray radiation.

Materials and methods. Male ICR (CD-1) mice were exposed to five daily irradiations of 2.5 Gy. On the days of each irradiation, experimental animals were administered chlorophyllin (20 μg/g), indralin (50 μg/g) in a solution of tartaric acid or glutathione (250 μg/g) and ascorbic acid (150 μg/g) before irradiation or riboxin (200 μg/g) after irradiation. The survival of mice was assessed within 30 days after the last irradiation.

Result and discussion. Only the use of Riboxin ensured the survival of 10 % of irradiated animals, but without a statistically significant increase in the average life expectancy of dead animals relative to the group of intact mice. A significant increase in this parameter was provided only by the use of indralin. Copper chlorophyllin had no radioprotective effect. Perhaps the use of metal-free chlorophyll derivatives in the future will be able to have a radioprotective effect under these conditions. The combined use of glutathione and ascorbic acid led to the death of 2 out of 10 mice during the period of irradiation and drug administration, without providing an increase in survival during the observation period.

Conclusion. The use of copper chlorophyllin and glutathione with ascorbic acid did not increase the survival rate and average life expectancy of deceased mice irradiated at a dose of 12.5 Gy, distributed into 5 fractions of 2.5 Gy. The use of indralin only increased the life expectancy of dead animals. Riboxin contributed to the survival of 10 % of the corresponding group.

Keywords: ionizing radiation, radioprotector, fractionated irradiation, chlorophyllin, riboxin, inosine, indralin, glutathione, ascorbic acid

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

Contribution of the authors. Leonid A. Romodin – scientific substantiation of the study and development of the experimental protocol, organizational part of the study, participation in the experiment with animals, analysis of experimental data in the context of literary information, writing the text of the article. Alexander A. Moskovskij – participation in the experiment with animals, editing the text of the article. Olga V. Nikitenko and Taisia M. Bychkova – conducting an experiment with animals and processing experimental data. Elizaveta D. Rodionova – participation in the experiment with animals, preparation of the English version of the article.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation Grant No. 23-24-00383, https://rscf.ru/project/23-24-00383/

Compliance with the principles of ethics. The study was approved by the Ethics Committee of the State Scientific Center FMBC named after A.I. Burnazyan (extract from protocol No. 113 of 02/07/2024) and was carried out in accordance with the International Guidelines for Biomedical Research Involving Animals (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, 1985).

For citation: Romodin L. A., Moskovskij A. A., Nikitenko O. V., Bychkova T. M., Rodionova E. D. Comparison of the effects of copper chlorophyllin, riboxin, indralin and the combined use of glutathione and ascorbic acid on the survival of mice during fractionated X-ray irradiation. *Drug development & registration*. 2025;14(1):365–374. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1957

ВВЕДЕНИЕ

Проблема поиска эффективного, но при том безопасного способа фармакологической защиты при действии ионизирующего излучения продолжает оставаться актуальной, несмотря на то что активные разработки в этой области ведутся с середины XX века. Связано это с высокой химической токсичностью всех по-настоящему эффективных радиопротекторов и с низкой степенью радиозащитного эффекта, который оказывают малотоксичные препараты [1].

Радиопротектором называют радиозащитный препарат, действующий непосредственно в момент воздействия радиации [2] и способный защитить при облучении в летальной дозе [3]. Фактор изменения дозы – отношение полулетальной дозы ионизирующего излучения на фоне применения препарата к таковой для облученного контроля – для радиопротекторов должен быть не менее 1,2 [4].

Другие типы радиозащитных препаратов, радиомитигаторы и радиомодуляторы, также могут быть полезными при терапии лучевого синдрома. Данные соединения менее токсичны, но величина их радиозащитного эффекта существенно ниже, однако они могут оказывать положительное действие и при использовании после воздействия излучения [2, 3]. Радиомитигаторы ускоряют восстановление тканей после облучения посредством активации провоспалительных сигнальных путей и усиления секреции гемопоэтических ростовых факторов, а радиомодуляторы, среди которых много антиоксидантов и антимутагенов, повышают общую резистентность организма [3].

В последнее время большое внимание в контексте разработки радиозащитных препаратов уделяется веществам природного происхождения, среди которых много естественных метаболитов организма [2, 5–7]. Большинство из этих веществ следует относить к радиомодуляторам, однако многие исследователи не оставляют попыток найти среди них вещество с выраженными радиопротекторными свойствами [5, 6].

Лучевая болезнь во многом является свободнорадикальной патологией, в патогенезе которой важную роль играет состояние окислительного стресса [8, 9]. Известно, что ионизирующее излучение приводит к резкому снижению содержания естественных антиоксидантов в тканях организма [8, 10]. Поэтому логичным выглядит коррекция лучевого синдрома экзогенными антиоксидантами.

Так, в литературе есть сообщения о радиозащитном эффекте аскорбиновой кислоты [11] и экзогенного глутатиона [12]. А ввиду того, что собственный клеточный глутатион, являющийся основным компонентом естественной системы антиоксидантной защиты организма [13], при окислении в клетках восстанавливается аскорбатом [14, 15], нам показалось целесообразным совместное применение данных веществ для терапии лучевой болезни.

В литературе достаточно много сообщений о радиозащитных свойствах содержащего азотистое основание гипоксантин рибонуклеозида рибоксина, также называемого инозином [16–20]. Механизм радиозащитного действия данного соединения четко не установлен. Авторы [17] связывают его с показанными

ими антиоксидантными свойствами данного вещества. М. В. Васин и И. Б. Ушаков объясняют радиозащитное действие рибоксина тем, что общим свойством нуклеозидов является способность усиливать анаболические процессы по механизму субстратного регулирования, что приводит к интенсификации синтеза белка и нуклеиновых кислот и ускоряет репарацию радиационных повреждений ДНК [21].

Интерес вызывают работы, посвященные изучению радиозащитных свойств препаратов на основе зеленого пигмента растений хлорофилла [22–25]. Основное внимание в литературе посвящено не самому хлорофиллу, а водорастворимому продукту его омыления – хлорофиллину [23–25]. Содержащая медь форма данного соединения является стабильным пищевым красителем, часто используемым в качестве биологически активной добавки к пище.

В наших недавних работах мы исследовали радиопротекторные свойства хлорофиллина, рибоксина и тролокса. Мы установили, что фактор изменения дозы (ФИД) для медного хлорофиллина и рибоксина, вводимых мышам внутрибрюшинно в дозировке 100 мкг/г перед облучением, равен 1,1 [26] и 1,07 [27] соответственно. Фактором изменения дозы называют отношение полулетальной дозы радиации на фоне применения препарата к таковой для группы облученного контроля [4].

Данные значения не позволяют изолированно использовать указанные вещества как радиопротекторы при разовом облучении в большой дозе [4]. Однако достоверных сведений касательно эффективности данных соединений при фракционированном облучении до настоящего исследования в литературе не было. А между тем использование безопасного и эффективного при фракционированном облучении радиозащитного вещества может быть полезным в некоторых схемах лучевой терапии онкологических заболеваний, а также при выполнении космических миссий.

Целью настоящей работы было сравнение радиозащитного эффекта медного хлорофиллина, рибоксина и совместного применения глутатиона и аскорбиновой кислоты с таковым для эталонного российского радиопротектора индралина при их введении самцам мышей ICR (CD-1), подвергнутых пяти ежедневным облучениям рентгеновским излучением в дозе 2,5 Гр, по тесту 30-суточной выживаемости. Структурные формулы изучаемых веществ приведены на рисунке 1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были выполнены на 60 аутбредных самцах мышей линии ICR (CD-1) SPF-категории (массой 36,2 ± 0,4 г), полученных из питомника лабораторных животных Российской академии наук (г. Пущино). Фракционированное тотальное облучение мышей осуществляли на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия), мощность дозы в контейнере с мышами составляла 0,85 Гр/мин ±10 %, анодное напряжение – 200 кВ, алюминиевый фильтр 1,5 мм.

Животные подвергались пяти ежедневным облучениям в дозе 2,5 Гр. Таким образом, суммарная доза рентгеновского излучения, полученная на протяжении эксперимента, составила 12,5 Гр. Экспериментальные животные были разделены на 6 групп по 10 особей: группы виварного и облученного контроля, группы, животные в которых получали хлорофиллин, рибоксин, индралин, а также группа, мыши в которой подвергались совместному влиянию глутатиона и аскорбиновой кислоты.

Указанные препараты вводились мышам в дни облучений. Индралин (ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России) в дозировке 50 мкг/г мы вводили внутрибрюшинно в объеме 0,36 мл за 10–15 мин до каждого облучения, для возможности внутрибрюшинного введения мы растворяли индралин в 0,43%-м растворе винной кислоты (Китай). Рибоксин (ОАО «ДАЛЬХИМФАРМ», Россия) в дозировке 200 мкг/г мы вводили внутрибрюшинно в объеме 0,36 мл через 15 мин после каждого облучения. Медный хлорофиллин (Macklin, Китай) в дозировке 20 мкг/г мы вводили внутрибрюшинно в объеме 0,36 мл за 20–30 мин до каждого облучения. Глутатион (препарат «Глатион» производства «Шаньдун Луи Фармасьютикал», Китай) в дозировке 250 мкг/г мы вводили внутрибрюшинно в объеме 0,36 мл за 20–30 мин до каждого облучения, этим же мышам за 5 мин до облучения мы внутрижелудочно вводили аскорбиновую кислоту (ОАО «ДАЛЬХИМФАРМ», Россия) в дозировке 150 мкг/г в объеме 0,1 мл. Средой для растворения изучаемых веществ при внутрибрюшинном введении выступал 0,2%-й раствор уротропина (АО «Мосагроген», Россия). Мышам из группы облученного контроля мы вводили внутрибрюшинно 0,2%-й раствор уротропина в объеме 0,36 мл.

Выживаемость мышей мы оценивали в течение 30 суток после последнего, пятого, облучения. Кумулятивную выживаемость мы рассчитывали по Капплану – Майеру [28]. Кривые выживаемости были проанализированы с использованием log-rank-тестом – сравнение выживаемости групп с учетом всего периода наблюдения. Статистически значимыми считали различия при p (log-rank test) < 0,05. Статистический анализ полученных результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики (U-критерий Манна – Уитни). Данные представлены в виде «среднее значение ± ошибка среднего» ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе виварного контроля гибели не отмечалось, можно говорить об адекватности полученных нами данных по выживаемости в экспериментальных группах. В таблице 1 и на рисунке 2 приведены данные о динамике смертности мышей и средней продолжительности жизни умерших животных.

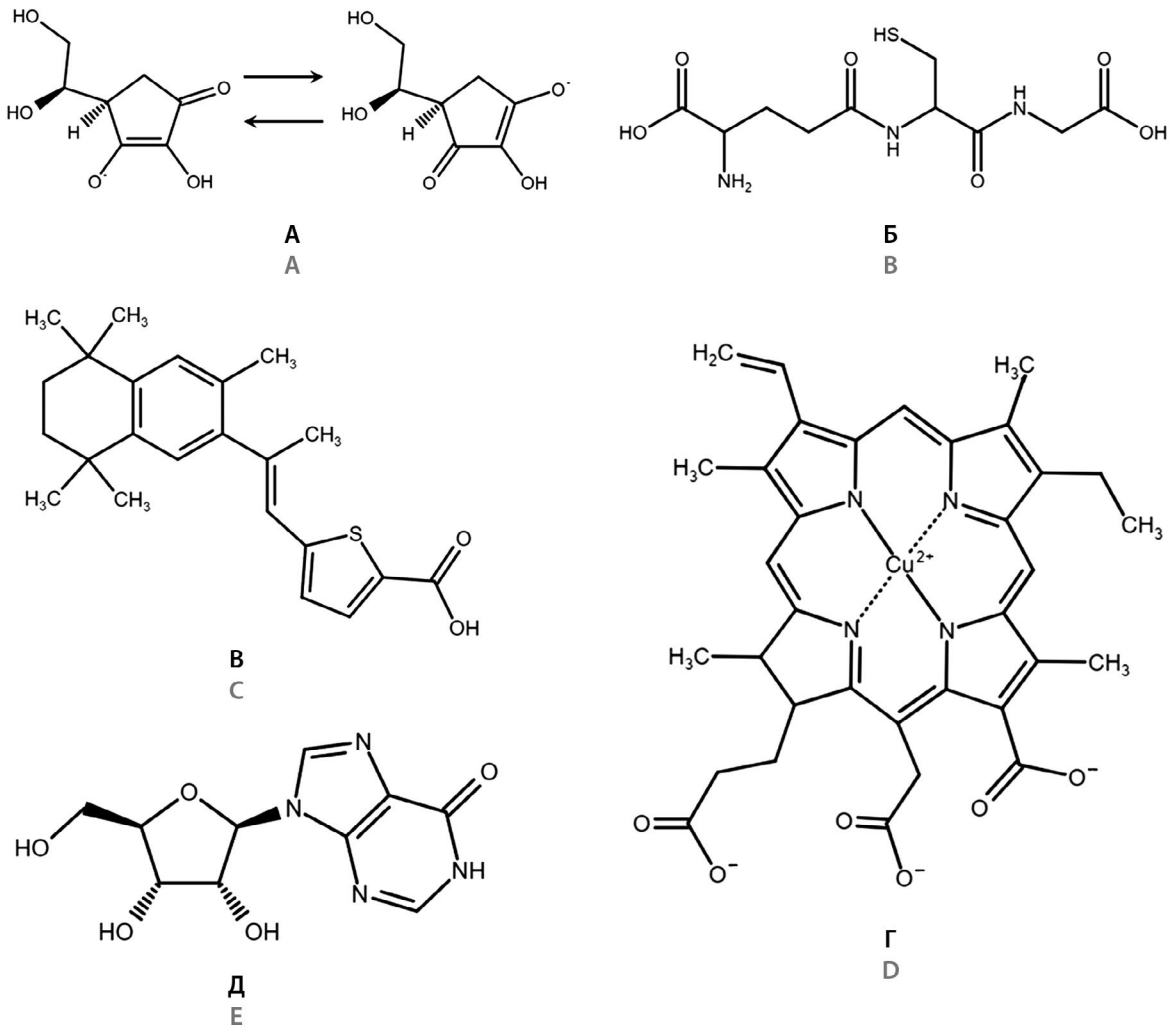


Рисунок 1. Формулы изучаемых веществ:

А – аскорбиновая кислота; Б – глутатион; В – индралин; Г – медный хлорофиллин в форме хлорина e_6; Д –рибоксин (инозин)

Figure 1. The formulas of the studied substances are:

A – ascorbic acid; B – glutathione; C – indralin; D – copper chlorophyllin in the form of chlorin e_6; E – riboxin (inosine)

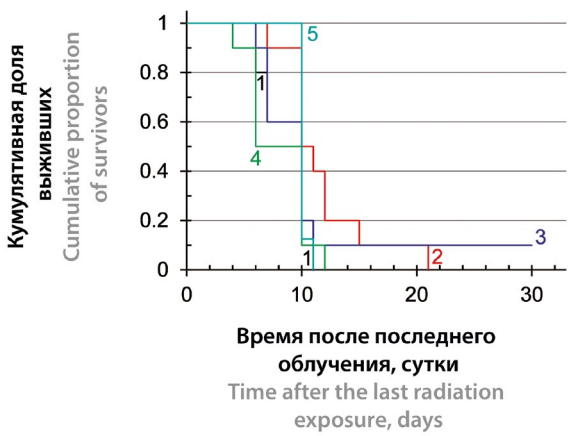


Рисунок 2. Динамика выживаемости самцов мышей ICR (CD-1) по Каплану – Майеру после фракционированного воздействия рентгеновского излучения в суммарной дозе 12,5 Гр: 5 ежедневных воздействий в дозе 2,5 Гр с введением изучаемых веществ в дни облучений.

1 – облученный контроль; 2 – индралин, 50 мкг/г; 3 – рибоксин, 200 мкг/г; 4 – хлорофиллин, 20 мкг/г; 5 – глутатион, 250 мкг/г, и аскорбиновая кислота, 150 мкг/г. Начало отсчета – день последнего облучения

Figure 2. Dynamics of survival of male ICR (CD-1) mice according to Kaplan – Mayer after fractionated exposure to X-rays at a total dose of 12.5 Gy: 5 daily exposures at a dose of 2.5 Gy with the introduction of the studied substances on the days of irradiation.

1 – irradiated control; 2 – indralin, 50 μg/g; 3 – riboxin, 200 μg/g; 4 – chlorophyllin, 20 μg/g; 5 – glutathione, 250 μg/g, and ascorbic acid, 150 μg/g. The countdown starts on the day of the last exposure

Таблица 1. Влияние действия изучаемых веществ на течение лучевого синдрома после пятикратного фракционированного воздействия рентгеновского излучения в суммарной дозе 12,5 Гр на самцов мышей ICR(CD-1)

Table 1. Effect of the action of the studied substances on the course of radiation syndrome after fivefold fractionated exposure to X-rays at a total dose of 12.5 Gy on male ICR(CD-1) mice

Группа, дозировка препарата в дни облучений Group, dosage of the drug on the days of irradiation	Количество мышей в группе в день последнего облучения The number of mice in the group on the day of the last irradiation	Выживаемость Survival rate		Средняя продолжительность жизни павших животных, сутки The average life expectancy of fallen animals, days
		Абсолютная Absolute	%	
I Облученный контроль Irradiated control	10	0	0	7,7 ± 0,6 (2)
II Индралин, 50 мкг/г Indralin, 50 μg/g	10	0	0	10,8 ± 1,2
III Рибоксин, 200 мкг/г Riboxin, 200 μg/g	10	1	10	7,6 ± 0,6 (2)
IV Медный хлорофиллин, 20 мкг/г Copper chlorophyllin, 20 μg/g	10	0	0	7 ± 0,8 (1)
V Глутатион, 250 мкг/г, и аскорбиновая кислота, 150 мкг/г Glutathione, 250 μg/g, and ascorbic acid, 150 μg/g	8	0	0	9,1 ± 0,1
VI Виварный контроль Intact mice	10	10	100	–

Примечание. 1 – статистически значимая разница с группой II (Индралин), $p \leq 0,01$; 2 – статистически значимая разница с группой II (Индралин), $p \leq 0,05$.

Note. 1 – statistically significant difference with group II (Indralin), $p \leq 0,01$; 2 – statistically significant difference with group II (Indralin), $p \leq 0.05$.

Анализ 30-суточной выживаемости показал, что применение исследуемых препаратов при пятикратном фракционированном облучении рентгеновским излучением в суммарной дозе 12,5 Гр не оказало радиозащитного эффекта. Статистически значимых различий между исследуемыми группами по показателю 30-суточной выживаемости отмечено не было.

По показателю средней продолжительности жизни павших животных отмечено статистически значимое увеличение в группе с предварительным введением индралина в дозировке 50 мкг/г за 10–15 мин до каждого сеанса облучения в дозе 2,5 Гр по сравнению с группой с предварительным введением медного хлорофиллина в дозировке 20 мкг/г за 20–30 мин (U-критерий Манна – Уитни, $p \leq 0,01$), а также с группой животных, которым вводили рибоксин в дозировке 200 мкг/г через 15 мин после каждого сеанса облучения, и с группой облученного контроля (U-критерий Манна – Уитни, $p \leq 0,05$).

Если говорить об общей выживаемости облученных мышей, то по итогу эксперимента выжило только 1 облученное животное, которое получало рибоксин в дозировке 200 мкг/г через 15 мин после каждого облучения при внутрибрюшинном введении. Данный факт выглядит особенно интересно в свете недавно проведенного нами эксперимента, результаты которого не опубликованы, по фракционированному облучению мышей. Все его условия аналогичны таковым в настоящей работе, кроме дозы излучения при каждом сеансе воздействия. Тогда она составляла 1,4 Гр, а суммарная доза составила 7 Гр. И в тех условиях выжили почти все экспериментальные животные, включая группу облученного контроля в полном составе. Пало только по 1 животному из группы, получавшей рибоксин, и группы, получавшей глутатион и аскорбиновую кислоту.

То есть введение рибоксина в идентичных, кроме дозы излучения, условиях эксперимента дало, по сути, противоположный эффект. И данный факт требует внимания. Однако необходимо заметить, что как гибель одной мыши, так и выживание одной мыши из группы не дает достаточной статистической значимости для однозначного заявления о тех или иных свойствах изучаемого препарата.

Но тем не менее описанные эффекты наталкивают на мысль о существенных изменениях фармакологических свойств рибоксина, также называемого инозином, при облучении организма в разных режимах. Этим можно объяснить то, что одни исследователи говорят о рибоксине как о перспективном радиозащитном препарате [17, 29], а в других исследованиях рибоксин не показал радиозащитных свойств [27]. На неоднозначность эффектов рибоксина также указывают и авторы [16], показавшие существенную разницу в его радиозащитном действии при различных способах введения.

В этой связи можно предположить, что механизм показанного ранее радиозащитного действия рибоксина [16, 17, 19, 29] в большей степени обусловлен сложным влиянием данного вещества на процессы трансляции при синтезе белка [30], а также другими, еще не описанными в литературе механизмами, а не непосредственно его антиоксидантными свойствами, которые описали авторы [31]. По данной причине рибоксин может по-разному влиять на физиологическое состояние клеток при любых изменениях внешних параметров.

Исходя из вышеизложенного, нам кажется правильным при разработке терапевтических схем лечения лучевой болезни с применением рибоксина предварительно детально изучить его эффекты ровно в тех условиях, для которых разрабатывается данная терапевтическая схема. Под этими условиями подразумевается вид излучения, дозировка и способ введения препарата, режим облучения, доза и мощность дозы излучения.

Индралин является эталонным российским радиопротектором [4, 32]. Поэтому наиболее правильным с точки зрения методологии научного исследования изучать радиозащитные свойства других веществ в контексте сравнительной оценки с таковыми у индралина.

Вопрос о целесообразности применения индралина при фракционированном облучении не имеет в настоящее время однозначного ответа ввиду высокой химической токсичности данного вещества [32]. В настоящем исследовании мы не получили эффекта повышения доли выживших животных на фоне применения индралина по сравнению с группой облученного контроля. Однако мы показали статистически значимое повышение средней продолжительности жизни мышей по сравнению со всеми другими экспериментальными группами. Авторы [33], подвергавшие мышей фракционированному воздействию γ-излучением на фоне применения индралина, получили схожие с нашими данные: в их исследовании индралин значимо повышал среднюю продолжительность жизни облученных животных, не повышая конечную долю выживших.

В настоящем исследовании мы применяли не таблетированную форму индралина для перорального применения, а его инъекционную форму, представляющего собой раствор индралина и винной кислоты в близком к эквимолярному соотношении. В таком виде индралин можно растворять в воде и применять в виде инъекций. Однако ввиду хорошей биодоступности индралина [32] полученные результаты вполне можно экстраполировать и на пероральное применение данного препарата.

В целом полученные нами данные говорят в пользу возможности рассмотрения использования индралина не только в случаях разового острого воздействия ионизирующего излучения, но и при фракционированном облучении организма, например, при лучевой терапии онкологических заболеваний. В настоящее время в клинической практике в этой связи используется, причём довольно ограниченно, лишь радиопротектор амифостин [34, 35].

Так как механизм радиопротекторного действия индралина заключается в создании гипоксии в тканях [32, 33], то для защиты здоровых тканей от воздействия ионизирующего излучения во время сеансов лучевой терапии он может найти применение, например, при лечении гипоксического рака, когда концентрация кислорода в опухоли и так низкая, поэтому ее снижение в крови под действием радиопротектора не окажет защитного эффекта по отношению к опухолевым клеткам.

Применение классических антиоксидантов глутатиона и аскорбиновой кислоты в дозировках 250 и 150 мкг/г соответственно не привело к коррекции лучевого синдрома, вызванного пятикратным облучением в дозе 2,5 Гр, по критерию выживаемости. Однако обращает на себя внимание отсутствие гибели мышей в первые 10 суток после последнего облучения, а также гибель двух животных в течение недели введения препаратов и облучений.

Глутатион, являющийся одним из основных антиоксидантов клетки [13, 14], по механизму радиозащитного действия схож с цистамином и амифостином, реализующим радиопротекторный эффект за счет сульфгидрильных групп [36]. Главным минусом применения данных соединений является химическая токсичность, возникающая вследствие наличия этих же сульфгидрильных групп [37].

Скорее всего, гибель мышей при введении глутатиона была вызвана так называемым восстановительным стрессом. Однако перевод организма в это состояние смог защитить его от действия ионизирующего излучения. Но первоначальный избыток антиоксидантов привел к прекращению их синтеза организмом. А это в сочетании с вызванным облучением резким снижением их пула в организме [8] привело к летальному состоянию уже окислительного стресса, за которым последовала гибель животных. Таким образом, анализируя полученные в настоящей работе данные, для будущих исследований возможности применения экзогенного глутатиона для терапии лучевого синдрома при фракционированном облучении мы можем порекомендовать попробовать снизить до-

зировку препарата непосредственно в дни сеансов облучения, но продолжать его применение уже по завершении серии облучений.

Медный хлорофиллин, радиопротекторные свойства которого мы описали в нашей недавней работе [26], в настоящей работе не показал радиопротекторных свойств. Может быть, это связано с его применением в достаточно низкой концентрации. От ее повышения мы отказались ввиду содержания в составе молекулы изучаемого вещества токсичной меди. Однако не исключено, что использование безметаллического хлорофиллина сможет оказать радиозащитное действие и в условиях фракционированного облучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение инъекционной формы индралина в дни облучений привело к значимому увеличению продолжительности жизни мышей, подвергнутых пяти ежедневным воздействиям рентгеновского излучения в дозе 2,5 Гр (суммарная доза 12,5 Гр), однако не увеличило конечной доли выживших мышей к концу срока 30-суточного наблюдения. Использование в дни облучений медного хлорофиллина и комбинированное применение глутатиона и аскорбиновой кислоты не смогло обеспечить ни выживаемости, ни повышения продолжительности жизни после облучения. Выживаемость 10 % облученных мышей обеспечило применение в дни облучений рибоксина. На основании анализа полученных в настоящей работе данных в контексте результатов предыдущих исследований мы сделали вывод, что механизм радиозащитного действия рибоксина заключается не в непосредственных антиоксидантных свойствах, а во влиянии на энергетические процессы в клетке и на процессы трансляции при синтезе белка, что может интенсифицировать репарацию повреждений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рождественский Л. М. Проблемы разработки отечественных противолучевых средств в кризисный период: поиск актуальных направлений развития. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2020;60(3):279–290. DOI: 10.31857/S086980312003011X.
2. Mun G.-I., Kim S., Choi E., Kim C. S., Lee Y.-S. Pharmacology of natural radioprotectors. *Archives of pharmacal research*. 2018;41(11):1033–1050. DOI: 10.1007/s12272-018-1083-6.
3. Васин М. В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2013;53(5):459–467. DOI: 10.7868/S0869803113050160.
4. Легеза В. И., Ушаков И. Б., Гребенюк А. Н., Антушевич А. Е. Радиобиология, радиационная физиология и медицина. Санкт-Петербург: Фолиант; 2017. 176 с.
5. Raj S., Manchanda R., Bhandari M., Alam M. S. Review on Natural Bioactive Products as Radioprotective Therapeutics: Present and Past Perspective. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2022;23(14):1721–1738. DOI: 10.2174/1389201023666220110104645.
6. Shivappa P., Bernhardt G. V. Natural Radioprotectors on Current and Future Perspectives: A Mini-Review. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2022;14(2):57–71. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs_502_21.
7. Stasiłowicz-Krzemień A., Gościniak A., Formanowicz D., Cielecka-Piontek J. Natural Guardians: Natural Compounds as Radioprotectors in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(13):6937. DOI: 10.3390/ijms25136937.
8. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М., Пальмина Н. П., Храпова Н. Г. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М.: Наука; 1975. 213 с.
9. Лысенко Н. П., Пак В. В., Рогожина Л. В., Кусурова З. Г. Радиобиология. Санкт-Петербург: Лань; 2023. 572 с.
10. Lin Y., Chen X., Yu C., Xu G., Nie X., Cheng Y., Luan Y., Song Q. Radiotherapy-mediated redox homeostasis-controllable nanomedicine for enhanced ferroptosis sensitivity in tumor therapy. *Acta Biomaterialia*. 2023;159:300–311. DOI: 10.1016/j.actbio.2023.01.022.
11. González E., Cruces M. P., Pimentel E., Sánchez P. Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;62:210–214. DOI: 10.1016/j.etap.2018.07.015.
12. Inal M. E., Akgun A., Kahraman A. Radioprotective effects of exogenous glutathione against whole-body gamma-ray irradiation: age- and gender-related changes in malondialdehyde levels, superoxide dismutase and catalase activities in rat liver. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2002;24(4):209–212. DOI: 10.1358/mf.2002.24.4.678452.
13. Averill-Bates D. A. The antioxidant glutathione. *Vitamins and hormones*. 2023;121:109–141. DOI: 10.1016/bs.vh.2022.09.002.
14. Yemelyanov V. V., Prikaziuk E. G., Lastochkin V. V., Aresheva O. M., Chirkova T. V. Ascorbate-glutathione cycle in wheat and rice seedlings under anoxia and subsequent reaeration. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):44–54. DOI: 10.18699/vjgb-24-06.
15. Foyer C. H., Kunert K. The ascorbate-glutathione cycle coming of age. *Journal of Experimental Botany*. 2024;75(9):2682–2699. DOI: 10.1093/jxb/erae023.
16. Вернигорова Л. А., Жорова Е. С., Попов Б. А., Парфенова И. М. Совместное профилактическое применение рибоксина и альгисорба при поступлении в желудочно-кишечный тракт крыс 239Pu. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2005;45(2):201–206.
17. Попова Н. Р., Гудков С. В., Брусков В. И. Природные пуриновые соединения как радиозащитные средства. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014;54(1):38–49. DOI: 10.7868/S0869803114010135.
18. Pospísil M., Netíková J., Pipalová I., Volenec K. Radioprotective effect of inosine and its enhancement by magnesium and global hypoxia. *Physiological Research*. 1991;40(4):445–452.
19. Hou B., Xu Z.-W., Yang C.-W., Gao Y., Zhao S.-F., Zhang C.-G. Protective effects of inosine on mice subjected to lethal total-body ionizing irradiation. *Journal of Radiation Research*. 2007;48(1):57–62. DOI: 10.1269/jrr.06067.
20. Сычёва Л. П., Рождественский Л. М., Лисина Н. И., Шлякова Т. Г., Зорин В. В. Антимутагенная активность и гепатопротекторное действие противолучевых препаратов. *Медицинская генетика*. 2020;19(9):81–82. DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.81-82.
21. Васин М. В., Ушаков И. Б. Потенциальные пути повышения устойчивости организма к поражающему действию ионизирующего излучения с помощью радиомитигато-

ров. *Успехи современной биологии*. 2019;139(3):235–253. DOI: 10.1134/S0042132419030098.
22. Поздеев А. В., Лысенко Н. П. Повышение радиационной устойчивости организма млекопитающих при применении препаратов хлорофилла в условиях радиоактивного загрязнения окружающей среды. *Известия Международной академии аграрного образования*. 2018;2(42):60–62.
23. Geric M., Gajski G., Mihaljevic B., Miljanic S., Domijan A.-M., Garaj-Vrhovac V. Radioprotective properties of food colorant sodium copper chlorophyllin on human peripheral blood cells *in vitro*. *Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019;845:403027. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.02.008.
24. Kumar S. S., Shankar B., Sainis K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2004;1672(2):100–111. DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002.
25. Zimmering S., Olvera O., Hernández M. E., Cruces M. P., Arceo C., Pimental E. Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutation Research Letters*. 1990;245(1):47–49. DOI: 10.1016/0165-7992(90)90024-e.
26. Romodin L. A., Nikitenko O. V., Bychkova T. M., Zrilova Yu. A., Rodionova E. D., Bocharov D. A. Comparative Evaluation of the Radioprotective Properties of Copper Chlorophyllin, Trolox, and Indralin in an Experiment on Mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2024;177(3):328–332. DOI: 10.1007/s10517-024-06183-z.
27. Ромодин Л. А., Никитенко О. В., Бычкова Т. М., Зрилова Ю. А., Родионова Е. Д., Бочаров Д. А. Сравнение радиопротекторных свойств рибоксина (инозина) и индралина при профилактическом введении в дозировках 100 мг/кг по критерию выживаемости облучённых мышей. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2024;69(2):18–23. DOI: 10.33266/1024-6177-2024-69-2-18-23.
28. Kaplan E. L., Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*. 1958;53(282):457–481. DOI: 10.1080/01621459.1958.10501452.
29. Сычёва Л. П., Лисина Н. И., Щеголева Р. А., Рождественский Л. М. Антимутагенное действие противолучевых препаратов в эксперименте на мышах. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2019;59(4):388–393. DOI: 10.1134/S086980311904012X.
30. Srinivasan S., Torres A.G., Ribas de Pouplana L. Inosine in Biology and Disease. *Genes*. 2021;12(4):600. DOI: 10.3390/genes12040600.
31. Гудков С. В., Гудкова О. Ю., Штаркман И. Н., Гапеев А. Б., Чемерис Н. К., Брусков В. И. Гуанозин и инозин как природные генопротекторы для клеток крови мышей при воздействии рентгеновского излучения. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2006;46(6):713–718.
32. Ильин Л. А., Рудный Н. М., Суворов Н. Н., Чернов Г. А., Антипов В. В., Васин М. В., Давыдов Б. И., Михайлов П. П. Индралин – радиопротектор экстренного действия. Противолучевые свойства, фармакология, механизм действия, клиника. М.: Минздрав РФ; 1994. 435 с.
33. Васин М. В., Ушаков И. Б., Чернов Ю. Н., Семенова Л. А., Афанасьев Р. В. Противолучевые свойства индралина и эссенциале Н при раздельном и сочетанном применении в условиях фракционированного γ-облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2021;61(6):645–651. DOI: 10.31857/S0869803121060126.
34. Singh V. K., Seed T. M. The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2019;18(11):1077–1090. DOI: 10.1080/14740338.2019.1666104.
35. Kouvaris J. R., Kouloulias V. E., Vlahos L. J. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *The Oncologist*. 2007;12(6):738–747. DOI: 10.1634/theoncologist.12-6-738.
36. Kuna P., Dostal M., Neruda O., Volenec K., Vodicka I., Navratil L., Petyrek P., Svoboda V., Simsa J., Vavrova J., Hermanska J., Prouza Z., Pitterman P., Listik E., Spurny F., Knajfl J., Podzimek F., Spelda S., Osterreicher J., Konrad F., Havrankova R. Radioprotective effects of amifostine (WR-2721) or cystamine on radiation damage and its repair in rats whole body exposed to fission neutrons. *Acta medica*. 2004;47(1):19–23.
37. Kuna P., Dostal M., Neruda O., Knajfl J., Petyrek P., Podzimek P., Severa J., Svoboda V., Šimša J., Špelda S., Vavrova J., Heřmanska J., Prouza Z., Pitterman P., Listík E., Navrátil L., Spurny F., Konrad F., Vilasova Z., Havrankova R. Acute toxicity and radioprotective effects of amifostine (WR-2721) or cystamine in single whole body fission neutrons irradiated rats. *Journal of Applied Biomedicine*. 2004;2:43–49.

REFERENCES

1. Rozhdestvensky L. M. Difficulties in radiation counter measure preparations development in russiain crysis period: actual approaches searching. *Radiation biology. Radioecology*. 2020;60(3):279–290. (In Russ.) DOI: 10.31857/S086980312003011X.
2. Mun G.-I., Kim S., Choi E., Kim C. S., Lee Y.-S. Pharmacology of natural radioprotectors. *Archives of pharmacal research*. 2018;41(11):1033–1050. DOI: 10.1007/s12272-018-1083-6.
3. Vasin M. V. The Classification of Radiation Protective Agents as the Reflection of the Present State and Development Perspective of Current Radiation Pharmacology. *Radiation biology. Radioecology*. 2013;53(5):459–467. (In Russ.) DOI: 10.7868/S0869803113050160.
4. Legeza V. I., Ushakov I. B., Grebenyuk A. N., Antushevich A. E. Radiobiology, radiation physiology and medicine. Saint-Petersburg: Foliant; 2017. 176 p. (In Russ.).
5. Raj S., Manchanda R., Bhandari M., Alam M. S. Review on Natural Bioactive Products as Radioprotective Therapeutics: Present and Past Perspective. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2022;23(14):1721–1738. DOI: 10.2174/1389201023666220110104645.
6. Shivappa P., Bernhardt G. V. Natural Radioprotectors on Current and Future Perspectives: A Mini-Review. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2022;14(2):57–71. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs_502_21.
7. Stasiłowicz-Krzemień A., Gościniak A., Formanowicz D., Cielecka-Piontek J. Natural Guardians: Natural Compounds as Radioprotectors in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(13):6937. DOI: 10.3390/ijms25136937.
8. Burlakova E. B., Alesenko A. V., Molochkina E. M., Palmina N. P., Khrapova N. G. Bioantioxidants in radiation damage and malignant growth. Moscow: Nauka; 1975. 213 p. (In Russ.)
9. Lysenko N. P., Pak V. V., Rogozhina L. V., Kusurova Z. G. Radiobiology. Saint-Petersburg: Lan; 2023. 572 p. (In Russ.)
10. Lin Y., Chen X., Yu C., Xu G., Nie X., Cheng Y., Luan Y., Song Q. Radiotherapy-mediated redox homeostasis-controllable nanomedicine for enhanced ferroptosis sensitivity in tumor therapy. *Acta Biomaterialia*. 2023;159:300–311. DOI: 10.1016/j.actbio.2023.01.022.

11. González E., Cruces M. P., Pimentel E., Sánchez P. Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;62:210–214. DOI: 10.1016/j.etap.2018.07.015.
12. Inal M. E., Akgun A., Kahraman A. Radioprotective effects of exogenous glutathione against whole-body gamma-ray irradiation: age- and gender-related changes in malondialdehyde levels, superoxide dismutase and catalase activities in rat liver. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2002;24(4):209–212. DOI: 10.1358/mf.2002.24.4.678452.
13. Averill-Bates D. A. The antioxidant glutathione. *Vitamins and hormones*. 2023;121:109–141. DOI: 10.1016/bs.vh.2022.09.002.
14. Yemelyanov V. V., Prikaziuk E. G., Lastochkin V. V., Aresheva O. M., Chirkova T. V. Ascorbate-glutathione cycle in wheat and rice seedlings under anoxia and subsequent reaeration. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):44–54. DOI: 10.18699/vjgb-24-06.
15. Foyer C. H., Kunert K. The ascorbate-glutathione cycle coming of age. *Journal of Experimental Botany*. 2024;75(9):2682–2699. DOI: 10.1093/jxb/erae023.
16. Vernigorova L. A., Zhorova E. S., Popov B. A., Parfenova I. M. Joint prophylactic use of riboxin and algisorb upon entry into the gastrointestinal tract of rats 239Pu. *Radiation biology. Radioecology*. 2005;45(2):201–206. (In Russ.)
17. Popova N. R., Gudkov S. V., Bruskov V. I. Natural purine compounds as radioprotective agents. *Radiation biology. Radioecology*. 2014;54(1):38–49. (In Russ.) DOI: 10.7868/S0869803114010135.
18. Pospísil M., Netíková J., Pipalová I., Volenec K. Radioprotective effect of inosine and its enhancement by magnesium and global hypoxia. *Physiological Research*. 1991;40(4):445–452.
19. Hou B., Xu Z.-W., Yang C.-W., Gao Y., Zhao S.-F., Zhang C.-G. Protective effects of inosine on mice subjected to lethal total-body ionizing irradiation. *Journal of Radiation Research*. 2007;48(1):57–62. DOI: 10.1269/jrr.06067.
20. Sycheva L. P., Rozhdestvenskii L. M., Lisina N. I., Shliakova T. G., Zorin V. V. Antimutagenic activity and hepatoprotective effect of anti-radiation drugs. *Medical Genetics*. 2020;19(9):81–82. (In Russ.) DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.81-82.
21. Vasin M. V., Ushakov I. B. Potential ways of increase in bogy resistance to damaging actionof ionizing radiation with the aids of radiomitigators. *Biology Bulletin Reviews*. 2019;139(3):235–253. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0042132419030098.
22. Pozdeev A. V., Lysenko N. P. Increasing the radiation resistance of the mammalian body when using chlorophyll preparations in conditions of radioactive environmental pollution. *Izvestija Mezhdunarodnoj akademii agrarnogo obrazovanija*. 2018;2(42):60–62. (In Russ.)
23. Geric M., Gajski G., Mihaljevic B., Miljanic S., Domijan A.-M., Garaj-Vrhovac V. Radioprotective properties of food colorant sodium copper chlorophyllin on human peripheral blood cells *in vitro*. *Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019;845:403027. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.02.008.
24. Kumar S. S., Shankar B., Sainis K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2004;1672(2):100–111. DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002.
25. Zimmering S., Olvera O., Hernández M. E., Cruces M. P., Arceo C., Pimental E. Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutation Research Letters*. 1990;245(1):47–49. DOI: 10.1016/0165-7992(90)90024-e.
26. Romodin L. A., Nikitenko O. V., Bychkova T. M., Zrilova Yu. A., Rodionova E. D., Bocharov D. A. Comparative Evaluation of the Radioprotective Properties of Copper Chlorophyllin, Trolox, and Indralin in an Experiment on Mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2024;177(3):328–332. DOI: 10.1007/s10517-024-06183-z.
27. Romodin L. A., Nikitenko O. V., Bychkova T. M., Zrilova Yu. A., Rodionova E. D., Bocharov D. A. Comparison of the Radioprotective Properties of Riboxin (Inosine) and Indralin with Prophylactic Administration at Dosages of 100 mg/кg According to the Survival Criterion of Irradiated Mice. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2024;69(2):18–23. (In Russ.) DOI: 10.33266/1024-6177-2024-69-2-18-23.
28. Kaplan E. L., Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*. 1958;53(282):457–481. DOI: 10.1080/01621459.1958.10501452.
29. Sycheva L. P., Lisina N. I., Shchegoleva R. A., Rozhdestvenskiy L. M. Antimutagenic effect of anti-radiation drugs in an experiment on mice. *Radiation biology. Radioecology*. 2019;59(4):388–393. (In Russ.) DOI: 10.1134/S086980311904012X.
30. Srinivasan S., Torres A.G., Ribas de Pouplana L. Inosine in Biology and Disease. *Genes*. 2021;12(4):600. DOI: 10.3390/genes12040600.
31. Gudkov S. V., Gudkova O. Yu., Shtarkman I. N., Gapeev A. B., Chemeris N. K., Bruskov V. I. Guanosine and inosine as natural geroprotectors for mouse blood cells when exposed to X-rays. *Radiation biology. Radioecology*. 2006;46(6):713–718. (In Russ.)
32. Il'in L. A., Rudny N. M., Suvorov N. N., Chernov G. A., Antipov V. V., Vasin M. V., Davydov B. I., Mihailov P. P. Indralin – an emergency radioprotector. Anti-radiation properties, pharmacology, mechanism of action, clinic. Moscow: Minzdrav Rossiyskoy Federacii; 1994. 435 p. (In Russ.)
33. Vasin M. V., Ushakov I. B., Chernov Yu. N., Semenova L. A., Afanasyev R. V. Radioprotective properties of indralin and essentiale h for separate and combined application under fractionated γ-irradiation. *Radiation biology. Radioecology*. 2021;61(6):645–651. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0869803121060126.
34. Singh V. K., Seed T. M. The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2019;18(11):1077–1090. DOI: 10.1080/14740338.2019.1666104.
35. Kouvaris J. R., Kouloulias V. E., Vlahos L. J. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *The Oncologist*. 2007;12(6):738–747. DOI: 10.1634/theoncologist.12-6-738.
36. Kuna P., Dostal M., Neruda O., Volenec K., Vodicka I., Navratil L., Petyrek P., Svoboda V., Simsa J., Vavrova J., Hermanska J., Prouza Z., Pitterman P., Listik E., Spurny F., Knajfl J., Podzimek F., Spelda S., Osterreicher J., Konrad F., Havrankova R. Radioprotective effects of amifostine (WR-2721) or cystamine on radiation damage and its repair in rats whole body exposed to fission neutrons. *Acta medica*. 2004;47(1):19–23.
37. Kuna P., Dostal M., Neruda O., Knajfl J., Petyrek P., Podzimek P., Severa J., Svoboda V., Šimša J., Špelda S., Vavrova J., Heřmanska J., Prouza Z., Pitterman P., Listík E., Navrátil L., Spurny F., Konrad F., Vilasova Z., Havrankova R. Acute toxicity and radioprotective effects of amifostine (WR-2721) or cystamine in single whole body fission neutrons irradiated rats. *Journal of Applied Biomedicine*. 2004;2:43–49.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-375-377

Check for updates

CC BY 4.0

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

Разработка и регистрация лекарственных средств. 2024;13(4):45–59. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1897. Статья опубликована: 15.11.2024.

На странице 45 в исходную версию статьи авторы добавили еще двух авторов.
Вместо: Л. А. Мирошниченко, Т. Ю. Полякова, И. А. Хлусов, Е. Ю. Авдеева, В. Г. Лужанин, М. Ю. Хлусова, М. В. Белоусов
Исправлено на: Л. А. Мирошниченко, Т. Ю. Полякова, И. А. Хлусов, Е. Ю. Авдеева, В. Г. Лужанин, Е. И. Молохова, А. Л. Голованенко, М. Ю. Хлусова, М. В. Белоусов

На странице 45 было добавлено ORCID авторов Е. И. Молохова, А. Л. Голованенко.
Вместо: 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; М. Ю. Хлусова – https://orcid.org/0000-0001-9583-5358;
М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.
Исправлено на: 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.

На странице 45 в раздел «Вклад авторов» была добавлена информация о вкладе авторов в статью Е. И. Молохова, А. Л. Голованенко.
Вместо: 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 участвовали в написании и утверждении текста статьи.
Исправлено на: 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.

На странице 46 в раздел «Для цитирования» были добавлены еще два автора.
Вместо: Мирошниченко Л. А., Полякова Т. Ю., Хлусов И. А., Авдеева Е. Ю., Лужанин В. Г., 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
Исправлено на: 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

На странице 45 в раздел «Охраны авторского права» были добавлены два автора
Вместо: © Мирошниченко Л. А., Полякова Т. Ю., Хлусов И. А., Авдеева Е. Ю., Лужанин В. Г., Хлусова М. Ю., Белоусов М. В., 2024
Исправлено на: 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

Внесение исправление не повлияло на содержание статьи.

Обновлена онлайн-версия статьи на сайте журнала.

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

Drug development & registration. 2024;13(4):45–59. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1897. Published: 15.11.2024.

On page 46, the authors added two more authors to the original version of the article.
Instead: Larisa A. Miroshnichenko, Tatiana Yu. Polyakova, Igor A. Khlusov, Elena Yu. Avdeeva, Vladimir G. Luzhanin, Marina Yu. Khlusova, Mikhail V. Belousov
Corrected to: Larisa A. Miroshnichenko, Tatiana Yu. Polyakova, Igor A. Khlusov, Elena Yu. Avdeeva, Vladimir G. Luzhanin, Elena I. Molokhova, Anna L. Golovanenko, Marina Yu. Khlusova, Mikhail V. Belousov

On page 46 the ORCID of the authors Elena I. Molokhova, Anna L. Golovanenko was added.
Instead: 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;
Marina Yu. Khlusova – https://orcid.org/0000-0001-9583-5358; Mikhail V. Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.
Corrected to: 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.

On page 46, information about the contribution of the authors to the article by Elena I. Molokhov, Anna L. Golovanenko was added to the "Contribution of the authors" section.
Instead: 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, participated in writing and approving the text.
Corrected to: 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.

On page 46, two more authors were added to the "For citation" section.
Instead: Miroshnichenko L. A., Polyakova T. Yu., Khlusov I. A., Avdeeva E. Yu., Luzhanin V. G., 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
Corrected to: 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

On page 45, two authors have been added to the "Copyright Protection" section
Instead: Miroshnichenko L. A., Polyakova T. Yu., Khlusov I. A., Avdeeva E. Yu., Luzhanin V. G., Khlusova M. Yu., Belousov M. V., 2024
Corrected to: 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

The correction did not affect the content of the article.

The online version of the article on the journal's website has been updated.

ФАРММЕДПРОМ

О ФАРМЕ ЛЕГКО И ПОНЯТНО ДЛЯ ВСЕХ

- Практическая польза
- Достоверная информация
- Экспертные мнения

Разъясняем и соединяем

Фармацевтическая и медицинская промышленность

Врачи и пациенты

pharmmedprom.ru

pharmmedprom

pharmmedprom

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этичного поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля **«Разработка и регистрация лекарственных средств»** является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале **«Разработка и регистрация лекарственных средств»**, должно соответствовать науке:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки, фармацевтические науки, биологические науки);
- 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал отдает приоритет аспирантским и докторским работам, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.
2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

   Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – http://www.consort-statement.org

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате А4 Microsof Word (*doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
6. ORCID всех авторов статьи.

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1)

Ключевые слова: (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах, и не повторять название статьи.

Вклад авторов. Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: http://elibrary.ru

Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производителя и страну происхождения [пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: Синдранол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацеутикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, страну происхождения [пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете, в прослеживаемом формате, с четкими, разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т. д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: M – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа $M \pm m$, указать объем выборки n. Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т. п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т. д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте http://www.translit.ru

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.

5. В конце описания в круглых скобках указывается (In Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychophar-macogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: http://www. nlm.nih.gov/citingmedicine.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B . Obesity among individuals with serious mental illness. Acta Psychiatr Scand. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/

Варианты библиографического описания патентов: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте http://search.crossref.org/ или https://www. citethisforme.citethisforme.com.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутририсуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *tif, *jpg, *cdr, *ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.

научно-производственный журнал

РРЛС

разработка и регистрация лекарственных средств

Журнал является Open Access изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.

Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений.

Основные пять тематических разделов журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», соответствует отраслям науки:

- ✓ 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки, фармацевтические науки, биологические науки).
- ✓ 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки).
- ✓ 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Журнал индексируется в ведущих научных базах:

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНИТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Издательские услуги:

Английский перевод статей

- ➢ Услуга комплексного перевода.
- ➢ Производство англоязычной статьи, включающее верстку и научный перевод.

Специальный выпуск журнала

- ➢ При заключении договора сотрудничества возможна публикации специального выпуска журнала.

Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России», был выпущен номером Том 10, № 4 (2021).

Журнал является **Open Access** изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.

Основатель журнала и главный редактор – д. фарм. н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич**

По вопросам сотрудничества просьба обращаться на почту: **info@cpha.ru**

научно-производственный журнал

РРЛС

разработка и регистрация лекарственных средств

Электронный журнал

Печатный журнал

Информационный ресурс

Фармацевтический журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств»

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**

Партнер ключевых мероприятий отрасли

Периодичность выхода журнала **4 раза в год**

Распространяется **бесплатно**

Мы в Telegram

По вопросам сотрудничества

info@pharmjournal.ru
info@chpa.ru