

**Модуль постколоночной дериватизации из серии ВЭЖХ "Скороход".
Готовые решения, проверенные временем**

Анализ аминокислот в соответствии с ГФ РФ

- Оригинальная разработка на основе отечественной компонентной базы
- Единственный модуль постколоночной дериватизации в РФ: более 10 лет успешной работы с хроматографами разных марок
- Инертное исполнение ВЭЖХ-системы
- Лоток для бутылей с системой подачи инертного газа
- Катионообменные колонки собственного производства
- Набор реагентов для определения аминокислот в комплекте
- Оptionальный фотохимический реактор ($\lambda = 254$ или 365 нм)

Альтернативные применения постколоночной дериватизации

- Биогенные амины
- Монензин, наразин, салиномицин, семдурамицин, мадурамицин
- Гидрат гадодиамида



- ✓ **Короткие сроки производства: 60 календарных дней**
- ✓ **2 года гарантии**
- ✓ **Демонстрация методики на вашей площадке**
- ✓ **Квалификация IQ/OQ**

SKOROHOD



+7 (926) 142-95-12



nan@sevko.net

SEVKO

Том 14, № 3. 2025

Volume 14, No. 3. 2025

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



ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ

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

ПОЧЕМУ МЫ?



СЕРТИФИКАТЫ

Первая в России биоаналитическая лаборатория, сертифицированная по GLP



СОВРЕМЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Все исследования выполняются на современном проверенном оборудовании



ОПЫТ

100+ исследований
выполняются ежегодно



ЛУЧШИЕ СПЕЦИАЛИСТЫ

В составе лаборатории
работают 30+ сотрудников



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2025. Том 14, № 3

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2025. Volume 14, No. 3

Цели и задачи журнала

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

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

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

Третий раздел описывает аналитические методики контроля качества.

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

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

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Редакционная коллегия

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

Арчакова О. А. – к. фарм. н., заведующая ЛБАИ ИЦ ООО «ЦФА», Москва, Россия

Бахрушина Е. О. – д. 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 фармацевтической естествознания Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Комаров Т. Н. – д. 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 фарма-ции Медицинского института непрерывного образования, ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ». Врач – Клинический фармаколог ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» имени Н. А. Семашко», Москва, Россия

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

Селиванова И. А. – проф., д. фарм. н., профессор кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

Сливкин А. И. – проф., д. фарм. н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

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

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

Сысуев Б. Б. – доц., д. фарм. н., руководитель Центра фармацевтической разработки и инновационных лек. форм Сеченовского университета, Москва, Россия

Тернинко И. И. – доцент, д. фарм. н., начальник Испытательной лаборатории, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

Тринеева О. В. – д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

Шиков А. Н. – д. фарм. н., профессор кафедры технологии фармацевтических препаратов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

Wrood S. Al-Khfajy (Ирак) – д. фарм. н., Assistant professor, Department of Pharmacology and toxicology, College of Pharmacy, Mustansiriyah University, Багдад, Ирак

ISSN 2305-2066 (Print)

ISSN 2658-5049 (Online)

Учредители печатной версии	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1
	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2
Учредители онлайн версии	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1
Издатель	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1
Директор журнала	Кульджанова Н. В.
Заведующий редакцией	Михайлова Н. С.
Основан	Журнал издается с ноября 2012 г.
Периодичность	4 выпуска в год
Префикс DOI	10.33380
Адрес редакции	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Россия, 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1 www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Адрес типографии	ООО «МАКС ПРЕСС» Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103
Копирайт	© Разработка и регистрация лекарственных средств, 2025
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License 
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

Olga A. Archakova – Cand. of Sci. (Pharm.), LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", Moscow, Russia

Elena O. Bakhrushina – Dr. 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 – Dr. of Sci. (Pharm.), LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ISSN 2305-2066 (Print)	
ISSN 2658-5049 (Online)	
Print version founders	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia Siberian State Medical University Address: 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia
Online version founders	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia
Publisher	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia
Journal director	Natalia V. Kuldjanova
Managing Editor	Nadezhda S. Mikhaylova
Founded:	The journal has been published since November 2012.
Frequency	Quarterly
DOI Prefix	10.33380
Editorial office address	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Printing house address	LLC "MAX PRESS" 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia
Copyright	© Drug development & registration, 2025
Content distribution terms	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License 
Price	Free

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

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции	10
Поиск и разработка новых лекарственных средств	
Разработка и изучение растительной композиции для комплексной терапии гриппа А А. Али Альшами, А. В. Панов, С. А. Кедик, Э. А. Амиргулова, Е. Н. Ветрова, Е. А. Доровских, Т. Ю. Ковалева	39
Дурнишник обыкновенный (<i>Xanthium strumarium</i> L.): химические компоненты и биологическая активность (обзор) Н. С. Попков, В. Д. Замыслова, М. Н. Повыдыш	60
Разработка, характеристика, трансфер банков клеток на основе <i>Escherichia coli</i> для производства биофармацевтических препаратов (обзор) Е. А. Буслаева, С. А. Аликина, З. Р. Хасаншина, Л. М. Кряжевских, А. Н. Кучеренко, Р. В. Драй	71
Производные 2-амино-4-(2-фурил)пиридин-3-карбонитрилов как перспективные антистафилококковые препараты Д. С. Беспалов, Д. М. Егоров, А. С. Крылов, Е. Н. Чернова, И. Л. Кузикова, З. А. Жаковская	82
Фармацевтическая технология	
Экспериментальное и CFD-исследование новой конструкции прямооточного циклона Е. В. Флисюк, В. С. Топталов, О. М. Флисюк, И. Г. Лихачев, Ю. М. Коцур	92
Выбор полимерного носителя для создания твердой дисперсной системы диосмина методом экструзии горячего расплава А. А. Данилова, Е. В. Вишняков, Е. С. Сурбеева, К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, Е. В. Флисюк	98
Методы анализа лекарственных средств	
Подходы к контролю качества носителей лекарственных средств (обзор) У. А. Ефремова, П. А. Чугунова, Е. С. Поникаровская, И. И. Тернинко	108
Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения Р. Э. Ермаченков, А. Л. Марков, М. М. Агаев, А. М. Алиев, М. Н. Повыдыш, И. И. Тернинко	124
Разработка и оценка качества фитосом с экидистероидами серпухи венценосной Е. И. Молохова, Д. Е. Липин, Ю. В. Сорокина, В. Г. Лужанин	137
Разработка и валидация методики количественного определения эзомепразола магния тригидрата в воздухе рабочей зоны методом ВЭЖХ-МС/МС А. Ю. Савченко, П. А. Жильцов, И. И. Картамышев, Д. Ф. Гуранда, М. В. Никулин	147
Доклинические и клинические исследования	
Влияние глицирризиновой кислоты на функцию нейромоторного аппарата у лептинрезистентных мышей Т. М. Матюзок, В. А. Приходько, С. М. Напалкова, О. В. Буюклинская, С. В. Оковитый	160
Создание клеточных моделей для оценки специфической активности биологических препаратов для лечения фибротических заболеваний У. Д. Дьячкова, Н. А. Басалова, М. А. Виговский, А. Ю. Ефименко, О. А. Григорьева	168
Автоматизированный количественный анализ окраса шерстного и кожного покрова лабораторных животных В. А. Приходько, У. В. Ногаева, Д. Ю. Ивкин, С. В. Оковитый	178

**Влияние разных доз парикальцитола на экспрессию рецепторов к витамину D
в ткани печени мышей**

Т. П. Сатаева, В. Ю. Малыгина, А. А. Давыдова, М. А. Кривенцов, А. К. Гуртовая 188

Эффективность применения экзосом на модели хронического кожного поражения *in vivo*

И. И. Глазко, Е. А. Дубова, И. Е. Балакин, О. В. Рукодайнй, В. И. Пустовойт 196

Некролог 205

CONTENTS

Introduction	10
Research and development of new drug products	
The development and study of herbal composition for complex therapy of influenza A Anas Ali Alshami, Aleksey V. Panov, Stanislav A. Kedik, Elza A. Amirgulova, Elizaveta N. Vetrova, Ekaterina A. Dorovskikh, Tatyana Yu. Kovaleva	39
<i>Xanthium strumarium</i> L.: chemical components and biological activity (review) Nikita S. Popkov, Valeria D. Zamyslova, Maria N. Povydysh	60
<i>Escherichia coli</i> cell bank: development, characterization, and transfer for biopharmaceutical medicines production (review) Eugenia A. Buslaeva, Svetlana A. Alikina, Zukhra R. Khasanshina, Larisa M. Kriazhevskikh, Anastasiya N. Kucherenko, Roman V. Drai	71
Derivatives of 2-amino-4-(furan-2-yl)pyridine-3-carbonitriles as promising antistaphylococcal drugs Denis S. Bupalov, Dmitry M. Egorov, Aleksandr S. Krylov, Ekaterina N. Chernova, Irina L. Kuzikova, Zoya A. Zhakovskaya	82
Pharmaceutical Technology	
Experimental and CFD study of a new design of a direct-flow cyclone Elena V. Flisyuk, Valery S. Toptalov, Oleg M. Flisyuk, Ilya G. Likhachev, Yulia M. Kotsur	92
Polymer carrier selection for creation of diosmin solid dispersion system by hot melt extrusion Alexandra A. Danilova, Evgeniy V. Vishnyakov, Elizaveta S. Surbeeva, Konstantin A. Gusev, Denis N. Maimistov, Elena V. Flisyuk	98
Analytical Methods	
Approaches to quality control of drug carriers (review) Ulyana A. Efremova, Polina A. Chugunova, Elizaveta S. Ponikarovskaya, Inna I. Terninko	108
Study of seasonal variations in the component composition of essential oil of rosemary of Dagestan origin Roman E. Ermachenkov, Andrey L. Markov, Musafir M. Agaev, Aslan M. Aliev, Maria N. Povydysh, Inna I. Terninko	124
Development and evaluation of the quality of phytosomes with ecdysteroids <i>Serratula coronata</i> L. Elena I. Molokhova, Daniil E. Lipin, Yulia V. Sorokina, Vladimir G. Luzhanin	137
Development and validation of esomeprazole magnesium trihydrate determination in workplace air using HPLC-MS/MS Alla Yu. Savchenko, Pavel A. Zhiltcov, Ilya I. Kartamyshev, Dorel T. Guranda, Maksim V. Nikulin	147
Preclinical and clinical study	
Effects of glycyrrhizinic acid on neuromotor function in leptin-resistant mice Tatyana M. Matuzok, Veronika A. Prihodko, Svetlana M. Napalkova, Olga V. Buyuklinskaya, Sergey V. Okovityi	160
In vitro models for biological activity evaluation of a new antifibrotic drug based on the vesicular fraction of the human mesenchymal stromal cells secretome Uliana D. Dyachkova, Nataliya A. Basalova, Maksim A. Vigovskiy, Anastasia Yu. Efimenko, Olga A. Grigorieva	168
Automated quantitative analysis of coat and skin coloration in laboratory animals Veronika A. Prihodko, Ulyana V. Nogaeva, Dmitry Yu. Ivkin, Sergey V. Okovityi	178

Effect of different doses of paricalcitol on the expression of vitamin D receptors in mice liver tissue

Tatiana P. Sataieva, Veronika Yu. Malygina, Alexandra A. Davydova, Maxim A. Kriventsov, Anna K. Gurtovaya 188

Efficacy of exosomes in a chronic skin lesion model *in vivo*

Irina I. Glazko, Elena A. Dubova, Evgenii I. Balakin, Oleg V. Rukodayny, Vasily I. Pustovoyt 196

Obituary 205

Редакционная статья / Editorial article

Регистрационные лабораторные исследования лекарственных средств. Мастер-классы от команды ЦФА

19 сентября 2025 года в Технопарке «Калибр» состоится бесплатное мероприятие «Разработка и регистрация лекарственных средств. Мастер-классы от команды ЦФА».

Registration laboratory studies of medicinal products. Master classes from the CPHA team

On September 19, 2025, the Kalibr Technopark will host a free event entitled "Drug development and registration. Master Classes from the CPHA Team".



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

Что Вы узнаете на бесплатном мастер-классе:

- обсудим вопросы регистрационных лабораторных исследований лекарственных средств;
- рассмотрим самые актуальные вопросы применения методов ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, ИФА для биоаналитических исследований;
- обсудим метод ТСРР и другие методы моделирования высвобождения лекарственных средств в условиях *in vitro*;
- рассмотрим возможные запросы регулятора (как отечественного, так и стран ЕАЭС, например, Республики Беларусь и Республики Казахстан) по исследованиям биоэквивалентности и ТСРР;
- поделимся лайфхаками, как грамотно ответить на запросы регулятора.

Впервые будет презентован новый метод оценки высвобождения в условиях *in vitro*, про который мы ранее никогда не рассказывали. Данный метод откроет совершенно новые возможности в прогнозировании биоэквивалентности!

Целевая аудитория: фармацевтические предприятия-производители и их сотрудники из отделов разработки, контроля качества, регистрации, произ-

водства и развития; сотрудники лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений.

Хедлайнеры мастер-класса:

Шохин Игорь Евгеньевич – Генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики». Главный редактор журналов «Разработка и регистрация лекарственных средств» и «Гербариум».

Рождественский Дмитрий Анатольевич – Начальник отдела координации работ в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий Департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК.

Ерёменко Наталья Николаевна – Заместитель начальника управления экспертизы №1 по эффективности и безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля ГЛС ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.



Редакционная статья / Editorial article

Евгений Сергеевич Северин. Воспоминания коллег

Профессиональная деятельность профессора Евгения Сергеевича Северина. Воспоминания коллег посвящены профессору.

Evgeniy S. Severin. Memories of colleagues

Professional activity of professor Evgeniy S. Severin. Memories of colleagues are dedicated to the professor.



*Людей неинтересных в мире нет.
Их судьбы – как истории планет.
У каждой все особое, свое.
И нет планет, похожих на нее.*

Е. Евтушенко

Евгений Сергеевич Северин родился в 1934 году в семье ученых. Его отец – выдающийся советский биохимик академик АН и АМН СССР, герой Социалистического Труда Сергей Евгеньевич Северин, возглавлявший кафедру биохимии МГУ в течение 51 года. К своему успеху Евгений Сергеевич шел многие годы. По окончании химфака МГУ Евгений Сергеевич был учеником и долголетним сотрудником ведущих советских ученых – академиков А. Е. Браунштейна и В. А. Энгельгарта.

К своему научному успеху Е. С. Северин шел многие годы.

1952–1957 гг. – студент химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова; 1957–1959 гг. – инженер-химик Института фармакологии и химиотерапии АМН СССР; 1959–1985 гг. – младший научный сотрудник, старший научный сотрудник, зав. лабораторией, зам. директора по науке Института молекулярной биологии АН СССР; 1963 г. – присуждена степень кандидата химических наук; 1964–1965 гг. – Институт биологической

и органической химии Чехословацкой академии наук, Чехословакия; 1967–1968 гг. – департамент биохимии Кембриджского университета, Великобритания; 1972 г. – присуждена степень доктора химических наук; 1978 г. – присвоено звание профессора; 1985–2018 гг. – директор Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения; в 1991 г. избран членом-корреспондентом РАН; 1994–2009 гг. – заведующий кафедрой биохимии ММА им. И. В. Сеченова.

Награды:

- 1970 – Медаль «За доблестный труд».
- 1981 – Орден Дружбы народов.
- 1984 – Государственная премия СССР за цикл исследований по пиридоксальскому катализу.
- 1990 – Открытие № 012 в области биохимической фармакологии.
- 1991 – Ленинская премия.
- 1996 – Премия им. В. С. Гулевича.
- 2007 – Премия им. В. С. Гулевича.

Профессор Е. С. Северин имеет более 680 научных трудов, 17 авторских свидетельств и более 40 патентов на изобретения, более 20 монографий и учебных пособий, 1 открытие. Благодарные ученики стали крупными учеными и с успехом работают в нашей стране и за ее пределами.

Научная деятельность Евгения Сергеевича тесно связана не только с такими всемирно известными научными учреждениями, как Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Институт молекулярной биологии, который теперь носит имя В. А. Энгельгардта и для которого он многие годы был верным соратником и опорой, Российская академия наук, Первый Московский государственный медицинский университет им. М. И. Сеченова, но и со многими научно-исследовательскими институтами и лабораториями, которые создавались при его участии.

Научная деятельность Евгения Сергеевича проходила рядом и в определенной степени при сотрудничестве со многими выдающимися учеными нашего времени. Их отзывы и наблюдения приведены ниже.

Отзывы и наблюдения выдающихся ученых о научной деятельности Евгения Сергеевича Северина

«Острая наблюдательность, живое, творческое воображение, отличная методическая вооруженность дают все основания видеть в Е. С. Северине одаренного и талантливого исследователя, стоящего в первых рядах очередного поколения, приходящего на смену нам, представителям более давно сформировавшихся возрастных групп.

Проводимое Е. С. Севериным всестороннее изучение механизмов клеточной активности открывает широкие перспективы для направленного воздействия на генную активность клетки, в частности, при опухолевой трансформации»

*Академик АН и АМН СССР,
Герой Социалистического труда **В. А. Энгельгардт**,
директор Института молекулярной биологии
АН СССР (1964–1984)*



В. А. Энгельгардт

«Участие таких ученых, как Е. С. Северин, было особенно ценно в реализации указанной программы, так как они стремились предусматривать в своих исследованиях полный цикл научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических разработок с выходом на конечный результат. Таким образом, было получено и организовано производство оригинальных диагностических и лекарственных препаратов, медицинских материалов нового поколения и изготовление на их основе изделий и приборов для использования в медицинской практике».

*Профессор, доктор экономических наук,
лауреат Государственной премии СССР
А. Е. Панов, в 1970–90 годы –
ответственный работник аппарата
Совета Министров СССР*



А. Е. Панов

«Все вместе мы создавали в России новое направление – молекулярную медицину, открыли в Московской медицинской академии имени И. М. Сеченова первый в России Научно-исследовательский институт молекулярной медицины, основали журнал «Молекулярная Молекулярная медицина».

Наши совместные труды были отмечены престижными премиями, а члены нашего коллектива были избраны членами Российской академии медицинских наук».

*Академик РАН
Михаил Александрович Пальцев,
ректор ММА им. И. М. Сеченова
(1987–2009)*



М. А. Пальцев, Е. С. Северин и С. В. Грачев

«В лице Е. С. Северина мы имеем ученого, создавшего и развивающего оригинальное направление исследований в области физиологических процессов клетки».

*Академик АН СССР, АМН СССР,
профессор **Н. П. Бехтерева** (1969–1990),
директор ИЭМ АМН СССР*

«Под руководством Е. С. Северина проведены работы по созданию на основе клеточной инженерии отечественных диагностических препаратов, имеющих важное значение для здравоохранения. Созданы и внедряются в практические медицинские учреждения иммуноферментные системы для диагностики ряда опасных инфекционных заболеваний (чума, холера, туляремия, сибирская язва и др.), а также вирусных инфекций».

*Академик РАН, РАМН,
Герой Социалистического труда,
лауреат Нобелевской премии **Е. И. Чазов**,
директор НМИЦ кардиологии МЗ России
(до 2021)*

«Под руководством Е. С. Северина разработан принципиально новый метод избирательной доставки противоопухолевых препаратов в раковые клетки на основе эндоцитоза различных факторов роста и активно исследуются проблемы избирательной регуляции апоптоза с помощью антисмысловых олигонуклеотидов и различных генных конструкций».

*Академик АН СССР президент
Дальневосточного отделения АН СССР
Г. Б. Еляков*

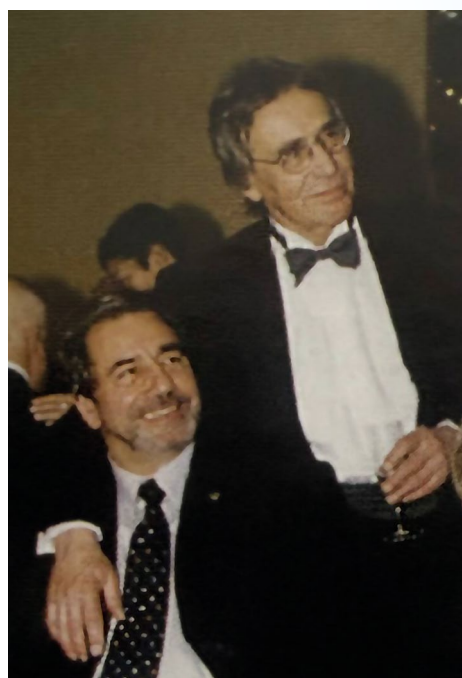
«Отдельной областью научных интересов Е. С. Северина и его сотрудников является изучение рецепторного портрета клеток человека с целью установления различий между нормальными и опухолевыми клетками. Е. С. Севериным успешно продолжают исследования способов регуляции активности и защитных систем организма с помощью модификации активности дендритных и лимфоидных клеток периферической крови с помощью рекомбинантных белков теплового шока. Последнее направление является новым и перспективным для иммунотерапии в онкологии».

*Академик АМН СССР и РАН,
профессор **А. И. Воробьев**,
директор НИИ гематологии*

«Мы учились вместе с Евгением Сергеевичем (Женей) с 1 по 10 класс. Жили в одном доме, где проживало много медицинских светил: А. И. Абри-

косов, Н. Н. Приоров, А. Л. Мясников, И. В. Давыдовский. Наши родители часто общались на заседаниях Академии. А я с моим братом дружил с Женей. Особенно нас сближало лето, которое мы проводили на даче в Подмосковье. Там же готовились к вступительным экзаменам в институт. При даче был спортивный корт. Мы только учились играть, а рядом жили маститые теннисисты: Андриан и Наталья Сперанские. Иногда собирались и великие мастера – Е. Корбут, Н. Филиппова. Наталья Георгиевна иногда снисходила до игры с нами. Из нашей детской компании она выделяла Женю; как и его отец, Евгений Сергеевич стал замечательным биохимиком и, насколько я знаю, сохранил любовь к теннису».

*Академик РАН, профессор, Герой Труда России
Коновалов Александр Николаевич,
президент Национального
медицинского исследовательского центра
нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко*



А. Н. Коновалов

ДОРОГОЙ УЧИТЕЛЬ

«8 мая 2014 г. мы зашли на дачу в Ново-Дарьино к Евгению Сергеевичу. Он нас встретил в рабочей одежде и за любимым занятием – строительно-хозяйственной деятельностью на участке.

«Во как!» – подумал я. – «Шеф верен себе!» Потом мы пили португальский портвейн, обсуждали разные планы и вспоминали прошедшее...

Здесь уместно вернуться ровно на 50 лет назад: в такой же майский день 1964 г. мои родители приценивались к даче, продававшейся в этом поселке, и Евгений Сергеевич был главным, как теперь принято говорить, промоутером в этом процессе. В итоге дача была куплена и стала родным домом уже для четырех поколений нашей семьи.

Для моей карьеры и жизни это обстоятельство стало основополагающим – через шесть лет я поступил на химфак МГУ, а еще через год впервые появился в лаборатории в Институте молекулярной биологии делать курсовую работу, да так и остался там на всю жизнь.

В первый раз я попробовал свои силы в знаменитом процессе выделения аспартаттрансаминазы, где были задействованы придуманные Евгением Сергеевичем технологические приемы типа использования мясорубки с мясocomбината в качестве блендера и стиральной машины в качестве центрифуги! Вот жизнь была! Нынешние молодые исследователи, которые имеют дело с чрезвычайно миниатюрными приспособлениями, вряд ли могут представить себе тогдашний процесс препаративного выделения белка, и многие, безусловно, в тех условиях имели бы «бледный вид».

Так началась моя научная деятельность под руководством Евгения Сергеевича. Он тогда был молодым с. н. с., только что вернулся из Кембриджа, где переделывался из химика-органика в биохимика, и только что стал заместителем В. А. Энгельгардта. Он буквально кипел идеями, учил всех нас и учился сам. Именно в начале 70-х произошла трансформация его научных интересов от исследований механизма действия пиридоксальных ферментов к исследованию регуляторных клеточных процессов, тому, что сейчас называется «cell signaling». Наша лаборатория была первой в СССР, которая занялась протеинкиназами и клеточным фосфорилированием и бла-

годаря научной хватке, энтузиазму и настойчивости шефа довольно быстро вышла на передовые позиции в мире. В эти первые годы существования лаборатории в ней была замечательная атмосфера – все были молоды, любили науку, много работали, публиковали хорошие статьи, не задумываясь об импакт-факторах.

Но коллективы, как и люди, развиваются неравномерно. Бывают взлеты, бывают падения, бывают длинные монотонные плато. Так и у нас: проблемы возникали и ликвидировались, сотрудники появлялись и уходили – жизнь нас разбрасывала сначала по разным городам, а потом и по разным странам. Пришла пора и мне выбирать самостоятельное плавание. Жалею ли, что так поступил? Нет! Жалею ли, что исчезла старая лаборатория, равно как и молодость? Еще как!

Время течет неумолимо – наше поколение уже начало уходить.

В жизни каждого человека есть разные периоды и поступки: некоторыми гордиться, некоторых стыдиться, о некоторых не хочешь вспоминать. Тем не менее выражение «жизнь удалась (или не удалась)» в целом является правильным.

У Евгения Сергеевича жизнь – удалась. Он прекрасный ученый, влиятельный человек, остроумный собеседник, а также крупный хозяйственник (на даче). Евгений Сергеевич – отец продвинутых детей и дед подающих надежды внуков. Его ученики трудятся в самых разных точках планеты, и все они, я уверен, часто вспоминают своего Учителя.

Я, со своей стороны, не только вспоминаю Евгения Сергеевича, но и старался с ним почаще общаться. Как видно, мы на тот момент еще не надоели друг другу».

*Кочетков Сергей Николаевич, академик РАН,
профессор, главный редактор
журнала «Биоорганическая химия»*



С. Н. Кочетков и Е. С. Северин.
Баховские чтения, 2014 год



Е. С. Северин

«Я учился на 4-м курсе химического факультета МГУ, и пора было определяться с направлением научной жизни. Было несколько возможностей, среди которых превалировало две – кафедра химической энзимологии и лаборатория Вацлава Леоновича Кретьевича в Институте биохимии им. А. Н. Баха. Моя бабушка, известный химик-органик Надежда Николаевна Шорыгина, решила посоветоваться с Николаем Константиновичем Кочетковым, и после состоявшихся личных консультаций, в которых принимал участие и я непосредственно, было принято решение представить меня Евгению Сергеевичу Северину, у которого в то время уже работал сын Николая Константиновича Сережа. И вот в середине декабря 1976 года я явился на собеседование в узкий кабинет-пенал с откидными скамейками и столами. В комнате, кроме Евгения Сергеевича, были двое – Сергей Кочетков, молодой стажер-исследователь (ныне чл.-корр. РАН), и очень симпатичная молодая женщина с распущенными темными волосами, младший научный сотрудник Лидия Павловна Сащенко (ныне профессор, д. б. н., зав. лабораторией в Институте биологии гена).

Евгений Сергеевич в момент первой встречи не произвел на меня однозначного впечатления. Он крутился на вертящемся стуле и ел сушки из кармана, быстро спрашивал меня о работах Билла Дженкса и Лайнуса Поллинга и при этом расспрашивал про балет (если не изменяет память, говорили о тогдашней прима Надежде Павловой). Затем Евгений Сергеевич спросил меня, чем я занимаюсь у Березина и нравится ли мне эта тематика. Я ответил весьма дипломатично. Он сказал мне четко: «О ферментах известно уже почти все. Можно спросить Браунштейна. А вот проблема рака пока не решена.

Надо заниматься фосфорилированием. Паоло Фаселла смог определить 11 стадий реакции с участием пиридоксальных ферментов. Ты должен так же поступить с ферментами, переносящими фосфорил на белки, то есть с протеинкиназами». Вообще императивность свойственна Евгению Сергеевичу. Иногда это ему помогало, но часто мешало. «Ты сможешь быстро, года за два, сделать кандидатскую диссертацию, а вот Лиде это войдет в докторскую». Оба плана не реализовались в указанные сроки. Я работал над диссертацией с большим энтузиазмом 5 лет, а Лидия Павловна защитила докторскую много позже, уже работая у Георгия Павловича Георгиева.

Тогда я ушел несколько обескураженный. Образ молодого профессора (а тогда Северину было 42 года) никак не укладывался у меня в привычные рамки. Я пришел к бабушке и рассказал

о встрече. Она спокойно сказала: «Ну что же, нестандартный человек. Попробуй, поработай. А ставка у него научная есть?» Я сказал, что предложили старшего лаборанта. Она подумала и сказала:

«В университете не оставайся. Заставят преподавать. А вот на лаборанты я бы не соглашалась». В итоге Евгений Сергеевич привел меня к академику Александру Евсеевичу Браунштейну и попросил со мной поговорить. Вероятно, я тогда Александру Евсеевичу понравился, и он отдал мне ставку стажера-исследователя, которую ему предоставил Юрий Анатольевич Овчинников. Так я стал работать у Северина (молодого). Так его называли, чтобы отличить от старшего Северина – Сергея Евгеньевича, его отца. Я должен сказать, что совершенно не жалею о сделанном с помощью Николая Константиновича Кочеткова и моей бабушки выборе. Евгений Сергеевич вместе со своими молодыми коллегами (Лидией Павловной и Сергеем Кочетковым) научили меня работать, разбираться в биохимии (по образованию я скорее был физико-химик) и, что, пожалуй, самое главное, стремиться к получению оригинальных результатов. Я потом всегда цитировал слова Северина своим студентам и молодым ученикам: «Вы этого не можете – нужны ли нам такие сотрудники?», «Итак, сколько вы стоите слайдов в мой доклад?». В доперестроечный период наша наука была не столь открытой. И Северин всегда стремился сообщить нам последние данные, почерпнутые им в последней зарубежной поездке. Благодаря Евгению Сергеевичу я познакомился с В. А. Энгельгардтом, А. Е. Браунштейном, Нобелевским лауреатом Эдвином Кребсом, открывшим фосфорилирование белков. Моя кандидатская была посвящена исследованию механизма фосфорилирования белков протеинкиназами. При этом я активно использовал методы предсационной кинетики. Работа шла непросто, и Северин шутил: «Медленно изучаешь быструю кинетику». В итоге работа была опубликована в четырех статьях Европейского биохимического журнала, но в ИМБ закрывался защитный совет на переоформление. Дали дополнительно несколько заседаний, в частности для защиты докторской Кости Скрябина. Северин сказал: «У тебя месяц на оформление и написание. Не успеешь – будешь защищать через год». Я успел за 17 дней. Северин не похвалил, но, мне кажется, был доволен. Сделал ряд замечаний карандашом. Исправлять было некогда. Ведь было набрано не на компьютере. Я в душе извинился перед ним и стер замечания. Так и отдал в защитный совет. Потом я рассказал историю Евгению Сергеевичу. Он посмеялся.

Заканчивая эти строки, скажу лишь, что я очень благодарен судьбе. На начальном этапе моей карьеры был человек, учителю, которому я верил и который научил меня работать».

*Академик РАН, профессор А. Г. Габибов,
директор Института биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова*

«Впервые Евгения Сергеевича Северина я увидел в 1978 г., будучи студентом третьего курса кафедры биохимии животных биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова. Тогда заведующим кафедрой был академик АН СССР Северин Сергей Евгеньевич (старший), отец Евгения Сергеевича.

В это время Евгений Сергеевич, профессор, доктор химических наук, был заведующим лабораторией энзиматической регуляции клеточной активности и заместителем по науке директора Института молекулярной биологии АН СССР академика Владимира Александровича Энгельгардта.

На кафедре биохимии животных МГУ Е. С. Северин преподавал спецкурс по химической энзимологии. Помню его первую лекцию. Мы, привыкшие к размеренным, академичным лекциям преподавателей биофака МГУ, были поражены той легкостью и изящностью, с которой Евгений Сергеевич рассказывал нам о химической природе механизмов ферментативного катализа. Все настолько было логично и понятно, что мы после лекции не смогли даже «покрытиковать» все основные положения его прекрасного доклада. Все лекции семестра прошли как на одном дыхании, и все студенты без проблем получили зачеты. Надо отметить, что все лекции профессор читал без перерыва, сказав, что по-другому не может. Потом мы только узнали, что Е. С. Северин достаточно долго работал в университете г. Кембриджа в Великобритании и что он по квалификации химик, а не биолог.

В 1980 г. я делал дипломную работу под руководством Евгения Сергеевича, которую защитил в 1981 г. В его лаборатории энзиматической регуляции клеточной активности (ЛЭРКА) ИМБ АН СССР я познакомился со многими прекрасными людьми и учеными, которые и в настоящее время, будучи академиками РАН, продолжают поддерживать российскую науку на качественно высоком уровне. Да, это люди, которые прошли научную школу Е. С. Северина.

Я проработал с Евгением Сергеевичем достаточно долгое время. От аспиранта до ведущего научного сотрудника. Под его внимательным руководством защитил кандидатскую диссертацию. Его помощь была важна и при защите моей докторской диссертации, и при получении звания профессора по специальности «биохимия».

В 1994 г. Евгений Сергеевич Северин, уже ставший членом-корреспондентом РАН, был приглашен академиком РАН М. А. Пальцевым, ректором Московской медицинской академии имени И. М. Сеченова, на должность заведующего кафедрой биологической химии. Необходимо было поднять научный уровень кафедры, которая была одной из самых больших по числу сотрудников. Он, как всегда, сразу активно взялся за дело. На кафедре появилась хорошо оснащенная лаборатория. В лаборатории стали работать студенты. Параллельно с этим Евгений Сергеевич с преподавателями кафедры начинает издавать учебники и научно-методические пособия по биохимии. Изданный им большой учебник по биохимии и в настоящее время остается самым востребованным учебником для медицинских вузов России и за рубежом. Кстати, этот учебник благодаря настойчивости Евгения Сергеевича был переведен на казахский язык.

Под нашей совместной редакцией благодаря активности сотрудников кафедры на свет появился учебник «Биохимия с упражнениями и задачами» для стоматологов, который оказался полезным и для других медицинских специальностей. Этот учебник мы издали и на английском языке для иностранных студентов.

Евгений Сергеевич пригласил меня на кафедру биологической химии в 1998 г. на должность профессора. С этого времени я работаю на кафедре, продолжая его дело. В 2009 г. кафедру возглавил сын Евгения Сергеевича – член-корреспондент РАН Сергей Евгеньевич Северин (младший).

Начиная с 2017 г. я сам уже работаю в должности заведующего кафедрой биологической химии Первого Московского медицинского университета имени И. М. Сеченова. Со мной продолжают работать сотрудники, которые хорошо знали Евгения Сергеевича и его сына Сергея Евгеньевича (младшего) и продолжают с любовью вспоминать их как добрых и справедливых руководителей. Царствие им Небесное! Хочу особо подчеркнуть, что Евгений Сергеевич за период с 1994 по 2009 гг. заложил в фундамент кафедры биологической химии сильный научно-педагогический потенциал, который до сих пор помогает мне в руководстве этой кафедрой. Добрая память о Евгении Сергеевиче Северине навсегда останется в наших сердцах».

*Заведующий кафедрой биологической химии
Первого Московского государственного
медицинского университета имени И. М. Сеченова,
ведущий научный сотрудник биологического
факультета МГУ имени М. В. Ломоносова
доктор биологических наук,
профессор Глухов Александр Иванович*

«Девять лет, с января 1986 по февраль 1995 года, мне выпала честь работать под непосредственным руководством Евгения Сергеевича. Это был яркий, счастливый и определяющий в плане моего развития как ученого период. Я считаю себя полноправным учеником Евгения Сергеевича, хотя у нас нет ни одной совместной публикации. Вот такой парадокс! Дело в том, что широкий научный кругозор Евгения Сергеевича, его организационный талант в сочетании с умением делегировать ответственность позволили ему фактически заложить основы развития молекулярной диагностики на основе тонких физических методов исследования вещества (колебательной спектроскопии, электрохимии, зондовой микроскопии, плазмоники), полимерной химии, энзимологии и иммунологии. Широкая натура Евгения Сергеевича позволила ему поручить и полностью доверить развитие этого важнейшего направления коллективу молодых ученых Института прикладной молекулярной биологии (преобразованного далее во Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения). В итоге Евгений Сергеевич дал старт исследованиям, которые позволили разработать новые высокочувствительные методы специфического и быстрого определения физико-химических характеристик клеток, тканей и объектов окружающей среды. Созданные сейчас сенсорные материалы и аналитические системы позволяют сформировать независимую технологическую основу нового поколения медицинской диагностики, а также приборов мониторинга химической, биологической и экологической безопасности.



И. Н. Курочкин

Но самое важное для меня отметить следующее. За время работы с Евгением Сергеевичем я как-то невольно начал копировать несколько важнейших черт его характера. Первое – внимание к мелочам в научном процессе и в организации быта ученого. Второе – всегда отстаивать свое мнение, несмотря на жесткую критику и противодействие. Третье – если Вы выступаете с докладом, то он должен быть ярким и самым лучшим, в противном случае лучше не выступать. Насколько могу, я стараюсь следовать этим позициям, что придает мне уверенность в себе. И я безмерно благодарен Евгению Сергеевичу за такой урок!»

*Директор Института биохимической физики
им. Н. М. Эмануэля РАН
доктор химических наук,
профессор Курочкин Илья Николаевич*

Редакционная статья / Editorial article

Интервью в рамках цикла «Мнение лидеров»

В новом интервью из цикла «Мнение лидеров» мы поговорили с директором департамента специальных проектов холдинга «Нацимбио» Госкорпорации «Ростех» Татьяной Смоляновой и генеральным директором Центра Фармацевтической Аналитики Игорем Шохиним о том, как рождаются отечественные иммунобиологические препараты.

The interview as part of the "Leadership Opinion" Series

In a new interview from the "Leadership Opinion" series, we spoke with Tatyana Smolyanova, Director of the Special Projects Department of the Nacimbio of the Rostec State Corporation, and Igor Shokhin, General Director of the Center of Pharmaceutical Analytics, about how domestic immunobiological drugs are born.



«НАШЕ СОТРУДНИЧЕСТВО С ХОЛДИНГОМ «НАЦИМБИО» ДЛИТСЯ УЖЕ ПОЧТИ 10 ЛЕТ»

За каждым флаконом – годы научных поисков, испытаний и строгих проверок. Мы обсудили путь от лаборатории до масштабного производства, принципы замещения импорта и стандарты, по которым в России создаются лекарственные средства, ничем не уступающие зарубежным. Также вспомнили непростой опыт пандемии, когда лаборатории работали без выходных, а образцы анализировались буквально в новогоднюю ночь.

Интервью провела **Наталья Кульджанова**, директор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Наталья Кульджанова: Татьяна Ивановна, за последние годы холдинг «Нацимбио» выпустил на рынок ряд новых иммунобиологических препаратов («Ультрикс® Квадри», «ВАКТРИВИР», Вакцина менингококковая групп А и С полисахаридная, «КОВИД-глобулин», «БиоГам», Антиген-Нео®), на регистрации находится вакцина аАКДС-М. Какими принципами вы руководствуетесь при выборе направления разработки новых препаратов?

Татьяна Смолянова: Наш холдинг был создан Госкорпорацией «Ростех» для обеспечения страны современными отечественными иммунобиологиче-

скими препаратами. Это важно для независимости страны и защиты граждан России. Мы разрабатываем собственные технологии, развиваем производственные мощности, выпускаем препараты по полному циклу – словом, обеспечиваем технологический суверенитет, о котором так много сегодня говорят. При выборе новых препаратов для исследования, конечно, ориентируемся и на потребности в замене импортных лекарств в определенных областях. В фокусе нашего внимания – вакцины, препараты крови и другие иммунобиологические лекарственные средства.

Наталья Кульджанова: *Кто разрабатывает ваши вакцины? Ваши собственные научные подразделения? Хватает ли компетенций?*

Татьяна Смолянова: Мы стараемся вести разработку своими силами, но сотрудничаем с профильными организациями и часто не по причине отсутствия компетенций, а из желания получить независимый результат или потому, что нам требуется определенное узкоспециализированное оборудование. Работаем с ведущими учреждениями – Центром им. Н. Ф. Гамалеи, НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева, Научным центром им. М. П. Чумакова и другими. Работа с ведущими профильными организациями помогает нам создавать качественные и востребованные продукты. Кстати, разработка ведется по полному циклу – от штаммов-продуцентов или молекул химических субстанций до регистрации готового препарата.

Наталья Кульджанова: *Какие существуют особенности разработки вакцин в сравнении с другими иммунобиологическими препаратами, например препаратами крови?*

Татьяна Смолянова: При разработке вакцин, как и других лекарств, важно учитывать несколько ключевых аспектов. Во-первых, необходимо глубоко изучить патогенез заболевания или механизм действия инфекции. Это включает тщательное изучение того, как развивается болезнь и как инфекция воздействует на организм.

Во-вторых, нужно знать нормативную базу, регулирующую разработку, производство и применение вакцин. Сюда входят законы, рекомендации и стандарты России, Евразийского экономического союза и Европы. При разработке препаратов мы традиционно ориентировались на требования фармакопей России, Европы и США, сейчас также добавили в работу статьи фармакопей ЕАЭС.

В-третьих, цель фармацевтической разработки – не просто создать лекарственную форму, но быть готовым к массовому выпуску препарата. Это требует выбора определенных технологий и иногда даже изменения состава лекарства в процессе разработки. Одно дело – получить небольшую партию в лаборатории, и совершенно другое – быть готовым выпустить препарат миллионами доз на производстве.

Если следовать этим принципам, разработка вакцин станет более эффективной.

Наталья Кульджанова: *Игорь Евгеньевич, ваша компания занимается исследованиями лекарственных препаратов, в том числе вакцин. Расскажите, исследования каких вакцин проводились в Центре Фармацевтической Аналитики в рамках сотрудничества с холдингом «Нацимбио»?*

Игорь Шохин: Наше сотрудничество с холдингом «Нацимбио» длится уже почти 10 лет. За это время мы исследовали множество препаратов, не только вакцин, но и других иммунобиологических средств.

Один из последних значимых проектов – это вакцина аАКДС-М. Мы проводили ее исследования в рамках первой – третьей фаз клинических исследований. Кроме того, мы работали с другими иммунобиологическими препаратами, такими как Антигеп-Нео®, «БиоГам», и «КОВИД-глобулин». Последний разрабатывался во время пандемии COVID-19.

Наталья Кульджанова: *Вы являетесь научно-исследовательской организацией и много лет занимаетесь исследованиями лекарственных препаратов. В чем особенности исследования вакцин?*

Игорь Шохин: Вакцины – сложные препараты, состоящие из нескольких компонентов. Например, в аАКДС-М их три: дифтерийный, столбнячный, коклюшный. Мы проводили исследования с помощью иммунных методов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием специальных тест-систем, разработанных холдингом «Нацимбио». В качестве примера нашей успешной коллаборации хочу отметить, что наши специалисты выезжали на площадку, где разрабатывалась как вакцина, так и тест-система, и проходили обучение. Далее в ходе процедуры трансфера аналитической методики специалисты холдинга также выезжали в ЦФА и проводили обучение сотрудников уже в нашем центре. Безусловно, эффективное взаимодействие – это залог успеха.

ЦФА проводит биоаналитические исследования в рамках различных фаз клинических испытаний. Это критически важный этап, требующий строгого соблюдения стандартов. В России и странах ЕАЭС эти стандарты закреплены в решениях Совета ЕЭК № 85 и № 89. Важно отметить, что в данном случае нельзя просто измерить иммуноглобулин в крови в обычной клинико-диагностической лаборатории. Необходимо провести полноценное многоэтапное исследование.

Первый этап – это трансфер аналитической методики в ЦФА, вслед за которым обязательным этапом следует ее валидация для применения в рамках клинических исследований. В процессе валидации методику тщательно проверяют и оформляют результаты в виде отчета. Этот отчет входит в регистрационное досье препарата.

После валидации идет аналитический этап, также сопровождающийся отчетом. Эти документы в дальнейшем проходят экспертизу в регуляторном органе.

Эксперты проверяют соответствие каждому пункту, указанному в решениях ЕЭК. Мы, со своей стороны, также активно взаимодействуем с регулятором, отвечая на все возникающие вопросы, помогая таким образом пройти регистрацию.

Наталья Кульджанова: *Исследования каких групп препаратов проводятся в вашем центре, помимо вакцин?*

Игорь Шохин: Помимо вакцин, ЦФА изучает и другие препараты, например иммуноглобулины. Хочу рассказать о трех из них: Антигеп-Нео®, «БиоГам» и «КОВИД-глобулин». Антигеп-Нео® – это иммуноглобулин против гепатита В. «БиоГам» – очищенный и высококонцентрированный препарат, первый отечественный иммуноглобулин человека нормальный в концентрации 10 %.

Разработка этих препаратов проходит те же этапы, что и разработка вакцины: разработку и валидацию методики, оформление отчетности и аналитические исследования. Для новых препаратов, включая иммуноглобулины, важно изучить их фармакокинетику: как быстро они попадают в кровоток, насколько долго действуют и как быстро выводятся. В нашем центре мы используем современные статистические методы для этих исследований.

Наталья Кульджанова: *Игорь Евгеньевич, вы уже ранее упомянули про сотрудничество с «Нацимбио» в период пандемии. Наверняка, вы столкнулись с рядом сложностей в проведении исследований. Коллеги, поделитесь, как это было?*

Татьяна Смолянова: Клиническое исследование – это сложный процесс, в котором взаимодействует большое количество участников: пациенты, получающие определенные препараты или вакцины, врачи, а также представители ряда структур, занимающихся организацией исследования, транспортировкой образцов, а также их анализом. «Нацимбио» в своих клинических исследованиях выступает заказчиком, однако для организации и проведения привлекает контрактно-исследовательские организации (CRO).

Поэтому, когда речь идет о сотрудничестве «Нацимбио» и исследовательской лаборатории в рамках клинических исследований, важно понимать, что непосредственного взаимодействия нет. Биологические образцы пациентов собирают по графику и отправляют в лабораторию для анализа. Образцы всегда заслеплены: лаборатория не знает, кому они принадлежат и откуда поступили. Независимый отчет поступает в общую базу, где данные обрабатывают с другими данными пациентов. Это позволяет получить статистический отчет для оценки эффективности препарата в рамках клинического исследования.

Решения ЕЭК устанавливают процедуры и валидацию для обеспечения качества данных. Но пандемия COVID-19 добавила сложностей. Нужно было быстро получать результаты, при этом соблюдая все процедуры. Например, при исследовании «КОВИД-гло-

булина» на базе клинического центра в Перми его работники отправляли образцы в Москву, а сотрудники ЦФА анализировали под Новый год буквально «под елочкой».

Пандемия вообще стала уникальной ситуацией. Она потребовала от всех участников процесса быстрых решений при строгом соблюдении регламентов.

Игорь Шохин: Пандемия коронавируса действительно стала для нас серьезным испытанием. Мы решили помочь врачам, создав препараты для борьбы с инфекцией. Гордимся, что многие препараты, вошедшие в дальнейшем в клинические рекомендации, такие как фавипиравир, молнупиравир, нирматрелвир-ритонавир и «КОВИД-глобулин», прошли испытания в нашем центре.

С началом пандемии мы перешли на ненормированный режим работы. Наши сотрудники работали без выходных, чтобы ускорить исследования. Стандартное биоаналитическое исследование занимает 2–3 месяца, но мы завершили его за 10 дней! Образцы поступали в лабораторию и анализировались в течение двух часов, потому что и методики, и приборы были готовы к работе.

Скорость выведения препаратов на этапе разработки и регистрации особенно важна. Мы обеспечили непрерывность процессов. Например, когда проводилось исследование «КОВИД-глобулина», образцы добровольцев последней группы скрининга выехали из Перми 29 декабря. Наша команда начала их анализировать 31 декабря, чтобы не сдвигать сроки.

Татьяна Смолянова: Иначе исследование пришлось бы повторить, а ПЦР-тесты пациентов стали бы недействительными.

Игорь Шохин: У нас не было другого выбора. Мы понимали, что нужно бороться с пандемией, и не могли позволить себе не выйти на работу 31 декабря поздно вечером. В том числе и благодаря этому препарат быстро вошел в арсенал врачей.

Татьяна Смолянова: Даже несмотря на то, что регистрация препарата шла по ускоренной процедуре, все исследования были проведены в полном объеме согласно требованиям ЕАЭС. Так как это был первый в мире подобный препарат, мы также не могли полагаться на опыт других. То же самое касается и проведения доклинических исследований.

Хочется отметить, клинические исследования только кажутся завершенными после набора пациентов, сбора биообразцов и завершения наблюдений. Но работа лаборатории по анализу образцов, например исследованиям фармакокинетики, требует еще нескольких месяцев. Конечно, мы всегда находим общий язык и оперативно получаем результаты, что позволяет соблюсти графики и не задерживать отчеты. Это важно не только в условиях пандемии.

Наталья Кульджанова: *Коллеги, насколько конкурентоспособны препараты отечественной разработки в сравнении с зарубежными, представленными на нашем рынке? Если выби-*

рать, к примеру, вакцину против гриппа, то какую вы бы выбрали для себя – отечественную или зарубежную?

Татьяна Смолянова: В нашей семье уже давно используют вакцину «Ультрикс® Квадри». Я изучала статью, вышедшую в 2020 году в журнале *Vaccines*, где проводился анализ состава ряда отечественных и иностранных вакцин. В ней анализировались основные антигены и примеси в вакцинах. Это исследование укрепило мою уверенность в качестве нашего препарата. Состав этой российской вакцины практически не отличается от зарубежных аналогов. В ней нет мажорных примесей, что говорит о высокой степени очистки и сохранении антигенов.

Друзья и знакомые меня часто спрашивают, чем лучше привиться от гриппа. Я обычно не даю советов в части какого-то конкретного препарата, так как считаю, что прививаться от гриппа нужно любым из доступных препаратов, но в целом отдаю предпочтение вакцинам производства нашего холдинга.

Игорь Шохин: Мы с семьей ежегодно прививаемся от гриппа отечественными вакцинами. Я всегда объясняю, что и дженерики, и биоаналоги в России и странах Евразийского экономического союза (ЕАЭС) разрабатываются и регистрируются в соответствии со строгими стандартами, основанными на международных документах, таких как ICH и EMA. То есть более чем на 90 % стандарты ЕАЭС унифицированы с европейскими.

Препараты, используемые нами, проходят полный объем регистрационных испытаний, как и в Ев-

ропе. Я уверен в их качестве, эффективности и безопасности.

Татьяна Смолянова: На конференции «Разработка и регистрация лекарственных средств» я выступала с докладом о регистрации вакцин против гриппа. Хочу отметить, что отечественные требования к регистрации намного строже, чем в Европе. Кроме общих гармонизированных стандартов, мы как производители проводим посерийный контроль перед вводом препаратов в гражданский оборот, что не всегда требуется в Европе.

Каждая серия наших вакцин проходит полный контроль на соответствие всех показателей спецификации на готовую лекарственную форму. В России спецификация гораздо более полная по показателям, чем в Европе. Таким образом, качество наших препаратов не только гарантировано, но и регулярно проверяется.

Наталья Кульджанова: *Коллеги, поделитесь планами вашего дальнейшего развития? Планируете ли совместные проекты в будущем?*

Татьяна Смолянова: Мы продолжим разрабатывать и исследовать новые иммунобиологические препараты, востребованные отечественным здравоохранением.

Игорь Шохин: Центр Фармацевтической Аналитики активно развивает компетенции в области био-препаратов. Мы следим за трендами и инвестируем в персонал, оборудование и обучение. Готовы проводить любые исследования в этой сфере.



Редакционная статья / Editorial article

УДК 615.014.22

Разработка и исследование мазей в годы Великой Отечественной войны

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 статье приведены результаты исследований отечественных ученых-провизоров по разработке и изучению новых мазевых основ и мазей в годы Великой Отечественной войны. Велась работа по поиску вспомогательных веществ для приготовления новых мазевых основ, позволяющих экономить животные и растительные жиры, по получению вазелина, церезина и других углеводородных носителей для компенсации возросшей потребности в этом традиционном носителе для мазей, по синтезу эмульгаторов, позволяющих готовить эмульсионные композиции различного типа, и по поиску заменителей лечебной нафталанской нефти. Благодаря совместной работе медицинских и фармацевтических вузов, отраслевых научно-исследовательских институтов, заводских лабораторий и научных подразделений некоторых аптекоуправлений уровень оказания медицинской помощи значительно возрос, что в итоге сократило сроки лечения раненых и больных и повысило долю бойцов, возвратившихся в строй.

Development and research of ointments in the years the Great Patriotic War

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 article presents the results of research conducted by Russian pharmacists on the development and research of new ointment bases and ointments during the Great Patriotic War. Work was carried out on the search for auxiliary substances for the preparation of new ointment bases that allow saving animal and vegetable fats, on the production of petroleum jelly, ceresin and other hydrocarbon carriers to compensate for the increased need for this traditional carrier for ointments, on the synthesis of emulsifiers that allow the preparation of emulsion compositions of various types and on the search for substitutes for therapeutic Naftalan oil. Thanks to the joint work of medical and pharmaceutical universities, branch research institutes, factory laboratories and scientific departments of some pharmacy departments, the level of medical care has increased significantly, which eventually shortened the treatment time for the wounded and sick and increased their proportion upon return to service.

В годы Великой Отечественной войны (ВОВ) наиболее часто встречаемой лекарственной формой, которую изучали и совершенствовали отечественные специалисты, являлась мазь. Причем в эти годы внимание к этой лекарственной форме многократно возросло. Так, если с 1938 по 1940 год в журнале «Фармация» нам встретились лишь три работы, посвященные разработке, усовершенствованию составов и технологий мазей, то с 1941 по 1945 год практически в каждом номере этого журнала публиковались статьи, в той или иной степени связанные с этой лекарственной формой. И объяснение этому очень простое. Мази применяются для лечения ран, а раны в годы ВОВ были основным видом повреждения бойцов Красной, а впоследствии Советской Армии.

Цель написания настоящего обзора состоит в том, чтобы проиллюстрировать состояние и уровень исследования мазей в СССР в годы ВОВ, а также показать вклад отечественных ученых-провизоров в оказание медицинской помощи и повышение доли выздоравливающих бойцов, возвращающихся на фронт после полного излечения.

Основным источником информации при написании работы был научно-практический журнал «Фармация», который начал выходить в издательстве Наркомздрава СССР «Медгиз» с июля 1938 г. (рисунок 1). В цели журнала «Фармация» входило обслуживание научно-практических и общественно-политических запросов широких кругов фармацевтических работников. В журнале планировалось размещать статьи научного характера, охватывающие все стороны

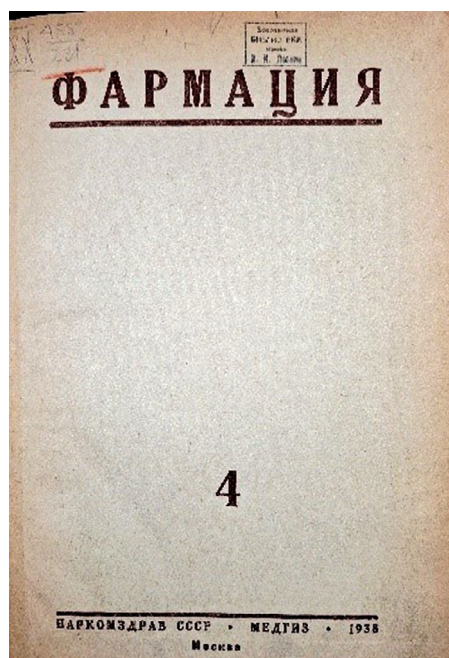


Рисунок 1. Титульный лист научно-практического журнала «Фармация» (1938 г.)

Figure 1. Title page of the scientific and practical journal "Pharmacy" (1938)

современного дела оказания лекарственной помощи: пути изыскания и использования лекарственного растительного сырья, направления развития производства новых препаратов, проверка их токсического и терапевтического действия, а также методы их химического и биологического контроля и стандартизации.

Особое внимание в журнале планировалось обращать на ознакомление фармацевтических работников с составом, свойствами и способами применения новых лекарственных средств, выпускаемых отечественной фармацевтической промышленностью. Основными авторами материалов, публикуемых в журнале, должны были стать сотрудники научно-исследовательских институтов, работники предприятий фармацевтической промышленности и смежных министерств, а также специалисты заводских экспериментальных и контрольно-аналитических лабораторий¹. Именно на долю этого журнала выпала непростая задача – освещать работу фармацевтического сообщества в тяжелые годы ВОВ.

Несмотря на то, что война началась летом 1941 г., военная тематика в журнале появилась лишь в первых номерах 1942 г. Связано это с тем, что основной материал для публикаций конца 1941 – начала 1942 г. был, вероятно, собран еще в предвоенные годы, а дополнять издание описанием трудностей, связанных с медицинским снабжением на фронте, было нецелесообразно.

¹ Статьи «От редакции». *Фармация*. 1938;1–2:1.

В первом номере журнала «Фармация» за 1942 г. выходит обзор, посвященный современному состоянию разработки, исследованию и производству мазей за рубежом. Он не касался темы ВОВ, но указывал направления, в которых следует вести наиболее актуальные исследования этой лекарственной формы. Обзор подготовила сотрудница ВНИХФИ им. С. Орджоникидзе (ОАО «ЦХЛС-ВНИХФИ») А. А. Цофина. В работе представлены литературные данные, иллюстрирующие результаты экспериментов по изучению проникающей способности лекарственных веществ через неповрежденную кожу, обсуждены проблемы влияния природы мазовой основы на резорбцию лекарств, рассмотрены пути усиления или торможения проницаемости кожи для лекарственных веществ из мазей. Для этого рекомендовано изменять физико-химические свойства последних путем введения в их состав либо ускорителей или замедлителей всасывания, либо иных компонентов, способных повлиять на этот процесс. Отдельно отмечено влияние эмульсионного и гидрофильного характера мазевых основ на проницаемость кожи для лекарственных веществ. Показано, что наличие жировой фазы и значительного количества воды в эмульсии дает возможность вводить в ее состав лекарственные вещества, растворимые как в воде, так и в масле. Эти вещества, находящиеся в водной или масляной фазах эмульсии, после аппликации на кожу постепенно поступают в организм. Представлены данные, свидетельствующие, что изменение в эмульсии соотношения воды и масла дает возможность регулировать скорость поступления лекарств в организм. При рассмотрении эмульсионного характера основ обсуждался вопрос и об эмульгаторах. Поскольку ланолин не является индивидуальным химическим соединением, становится актуальной задача поиска конкретных веществ, как тех, которые входят в состав ланолина, так и тех, которые встречаются в природе в чистом виде. В частности, имелся в виду эфир холестерина – метахолестерин, обладающий эмульгирующей способностью, равной ланолину. Эмульсии, полученные с помощью этого эмульгатора, отвечали требованиям, предъявляемым к мазям. Они не вызывали местного раздражения, относительно быстро всасывались и обладали достаточной физико-химической стабильностью. В обзоре приведены конкретные данные, показывающие влияние на высвобождение лекарственных веществ из мазовой основы таких факторов, как растворимость лекарственного вещества, возможность химического взаимодействия между лекарственным веществом и компонентами мазовой основы, включение в состав мазовой основы ускорителей всасывания (спирт, скипидар, эфирные масла, сапонины или желчные кислоты)².

² Цофина А. А. Влияние мазевых основ на резорбцию лекарственных веществ через кожу. *Фармация*. 1942;1–2: 15–20.

Учитывая тенденции, описанные в обзоре литературы, А. Л. Каталхерман (кафедра технологии лекарственных форм и галеновых препаратов Молотовского фармацевтического института) предложил состав эмульсионной мазевой основы, которая при добавлении в нее лекарственного вещества оказывала профилактический и лечебный эффект. Она высвобождала лекарственные вещества, предохраняла кожу от воздействия факторов внешней среды, быстро впитывалась, благодаря чему могла наноситься на значительные ее участки, легко и полностью смывалась водой и не оставляла жирных пятен. Будучи инертными, ее компоненты не вызывали раздражения, а мази, сделанные на ее основе, могли быть приготовлены в аптеке. В состав предлагаемой мазевой основы входили: турбинное масло (18 %), желатоза (10 %), вода (18 %), крахмал (15,75 %), цинка оксид (15,75 %) и глицериновая мазь (22,5 %). На этой основе готовили мази (ихтиол, бактерицид, нафталанская нефть, деготь и другие лекарственные вещества) и передавали их в стационар кожно-венерологической клиники Молотовского медицинского института для проверки. Согласно заключению клиницистов, мази по своему лечебному эффекту могут иметь применение в профилактике и терапии кожных болезней. По результатам совместных исследований фармацевтов и клиницистов предлагаемая мазевая основа рекомендована к введению в аптечный каталог, а ее состав утвержден Фармакологическим комитетом НКЗдрава СССР¹.

Представляет определенный интерес информация Фармакологического комитета (протокол № 14 от 21.11.1942) о составе, приготовлении и применении мази с полисульфидом натрия для лечения чесотки, предложенной проф. Л. Х. Нолле и доц. Н. С. Ведровым. Пропись мази:

раствора полисульфида натрия (30–70 %)	800 г;
мыла домашнего	50 г;
порошка алтея	30 г;
воды	100 г.

По отзывам фармацевтов, эта мазь легко готовится в условиях аптеки, хранится в течение 2–3 месяцев в стеклянных банках с притертой пробкой. Клиницисты же отмечают, что мазь можно применять как в стационарных, так и в домашних условиях. При правильном применении препарата чесотка вылечивается в течение 2–3 дней².

Е. Н. Кутумова проинформировала читателей журнала «Фармация» о некоторых работах сотрудников Центральной аптечной научно-исследовательской лаборатории ГАПУ Наркомздрава РСФСР (ЦАНИЛ), связанных с разработкой и внедрением прописей мазей

в период конца 1942 – начала 1943 года. Она сообщила, что работа лаборатории по мазевым основам велась по нескольким направлениям. В первую очередь рассматривалась проблема разработки состава медицинских мазей на эмульсионной основе типа «вода в масле». Для разрешения этой задачи требовалось получить эффективный эмульгатор, способный при небольших количествах минерального масла связать относительно большое количество воды и создать при этом стабильную основу, высвобождающую лекарственные вещества. Эта проблема была успешно разрешена Б. А. Клячкиной, О. Н. Соболевым и И. Б. Солоноуцем. Исследователями разработан простой метод изготовления эмульгатора, с использованием которого предложена рецептура и методика изготовления мазевой основы и мазей. Предлагаемая основа экономична, так как состоит в основном из воды (60–75 %), стабильна при хранении и позволяет предварительно готовить полуфабрикат, с помощью которого в условиях аптеки возможно готовить мазь. К приготовлению были рекомендованы серая ртутная, белая ртутная, висмутовая, цинковая, серная мази. Эти мази были предоставлены клиникам для испытаний. Второй проблемой, которую решали сотрудники ЦАНИЛ, была возможность приготовления эмульсии типа «масло в воде». Эта основа еще экономичнее, так как в ее состав вода входит в еще больших количествах. На этой основе были рекомендованы мази камфоры, скипидара, дегтя. Их образцы также были переданы в клинику для испытаний³.

Другой сотрудник ЦАНИЛ (Г. Смирнов) сообщает о результатах получения нового эмульгатора, позволяющего готовить эмульсионные мази. После ряда опытов в качестве эмульгатора была принята цинковая соль непредельных жирных кислот льняного масла (1 часть оксида цинка на 2 части льняного масла). При использовании этого эмульгатора получается нежная, пышная мазевая основа, которая легко наносится на кожу и быстро всасывается. Основными компонентами предлагаемой основы для мазей являются: рекомендованный эмульгатор (5 %), минеральное масло (до 16 %), вода (74 %) и иногда ланолин (до 5 %). На этой основе готовили ряд мазей (серная, нафталановая, Вилькинсона, ртутная и др.). К моменту опубликования данного сообщения эти мази уже прошли испытания в клинике и получили положительные отзывы. По мнению исследователя, внедрение в жизнь этого предложения позволит фармацевтической промышленности освободить тысячи тонн животных и растительных жиров и даст огромную экономию средств⁴.

¹ Каталхерман А. Л. Гидрофильная мазевая основа, быстро засыхающая на коже. *Фармация*. 1943;1:28–31.

² В фармакологическом комитете НКЗдрава СССР. *Фармация*. 1943;1:38–39.

³ Кутумова Е. Н. О некоторых работах Центральной аптечной научно-исследовательской лаборатории Главного аптекоуправления НКЗдрава РСФСР. *Фармация*. 1943;3:36–39.

⁴ Смирнов Г. Экономия жиров при изготовлении мазей. *Фармация*. 1943;5:11–12.

С целью замены жиров в приготовлении мазевых основ и мазей А. Г. Босин и А. Игнатьева рекомендуют использовать загуститель силикагель. Эти работы проведены в 1941 г. на базе фармако-технологического отдела Ленинградского научно-исследовательского фармацевтического института¹.

А. Б. Селисский с коллегами из дерматологического отдела Центрального кожно-венерологического института Наркомздрава СССР (ЦКВИ) предложили новый состав цинковой мази, приготовленной с использованием машиномасляной фракции нефти. По их мнению, эта фракция представляет ценный компонент для лечения ряда заболеваний кожи. Мазь имеет следующий состав: машинного масла 85 частей, жирных твердых расщепленных кислот 12 частей и цинковых белил 3 части. Показаниями для применения мази стали плохо гранулирующие и вяло заживающие язвы, околораневые воспалительные изменения кожи (экземы, дерматиты), ожоги второй и третьей степени. Установлено, что предлагаемая мазь обладает высокими лечебным эффектом: снижает сроки лечения, не раздражает кожу, устойчива при хранении. Таким образом, продемонстрировано, что машиномасляная фракция нефти, используемая в качестве компонента мазевой основы, способна заменить растительные и животные жиры и одновременно представлять собой важный вспомогательный ингредиент².

Профессор А. Б. Селисский для лечения дерматологических заболеваний предложил состав эмульсионной хвойно-автоловой пасты, состоящей из равных количеств машинного масла, белой глины и отвара хвойных игл (50 г хвойных игл кипятят 40 минут в 1 л воды, а затем полученный отвар фильтруют через двойной слой марли). Отвар хвойных игл применяется как средство, содержащее аскорбиновую кислоту и эфирное масло. В результате смешивания машинного масла и отвара хвойных игл получается эмульсия типа «вода в масле», но в процессе добавления белой глины происходит смена фаз с образованием эмульсии «масло в воде». Полученная паста устойчива в процессе хранения, имеет густоватую консистенцию, светло-коричневый цвет, изменяющийся в зависимости от содержания смол в машинном масле, и почти не имеет запаха. Паста может быть использована самостоятельно и как мазевая основа, в которую могут быть добавлены лекарственные субстанции в количестве до 10 %. Клиническое исследование хвойно-автоловой пасты показало ее эффективность при лечении хронической экземы, вызванной различными причинами, острой формы псориаза и авитаминозной язвы. Исследова-

тели убеждены, что она может быть применена в качестве дополнительного средства в комплексной терапии дерматологических заболеваний³.

Интересен опыт применения сухих концентратов для лечебных паст, предложенный проф. А. Б. Селисским. По его мнению, концентраты удобны для хранения, транспортировки, а также для использования, так как позволяют получать свежеприготовленные препараты в любой обстановке (перевязочные комнаты амбулаторий и больниц, санчасти воинских подразделений). Автором разработаны и предложены концентраты цинковой, серно-дегтярной, белой ртутной и ихтиоловой паст. Основными компонентами концентратов являются порошок алтейного корня, белая глина, минеральное масло и иногда глицерин. При добавлении к концентрату воды получают пасту эмульсионного типа, гомогенную композицию, легко наносимую на кожу и смываемую водой. На коже паста быстро высыхала, образуя пленку, иногда заменяющую повязку. Пасты испытывались при лечении себорейных экзем, дерматитов, эритразм, стептогенных импетиго и др. заболеваний. Авторы убеждены, что внедрение концентратов паст в практику увеличит арсенал наружных лекарственных средств и даст возможность получать свежеприготовленные гидрофильные водные и водно-глицериновые пасты. Они просты в приготовлении, а также удобны при хранении и транспортировке⁴.

Как видно из данных, представленных выше, при приготовлении мазевых основ и мазей нельзя было избежать использования дефицитного сырья (минеральные и растительные масла, животные жиры и др.). Кардинально решить эту проблему предложили сотрудники Ленинградского научно-исследовательского фармацевтического института А. М. Халецкий и Л. Н. Федорова. Исследователи предложили для приготовления мазевой основы использовать фитостерин, получаемый при гидролизе древесины хвойных пород. Методику получения фитостерина из древесины предложил заведующий кафедрой опытных лесохимических установок Лесотехнической академии Ф. Т. Солодкин. Метод получения этого продукта заключается в нагревании древесины в растворе едкого натрия при температуре 160 °С. В результате в качестве основного продукта получается мыло, а как побочный продукт – фитостерин. Авторы установили, что смесь фитостерина, полученного таким образом, в количестве 12–15 % с 88–85 % воды образует гомогенную массу, которая пригодна для получения мазевой основы и мазей. Основа стабильна в процессе хранения при комнатной температуре в течение 30 дней, а мази на этой основе (цинковая, белая ртут-

¹ Халецкий А. М. К тридцатилетию Ленинградского научно-исследовательского фармацевтического института. *Фармация*. 1943;6:31.

² Селисский А. Б. Машиномасляные фракции нефти – ценное сырье для лечебных мазей. *Фармация*. 1944;1:33–44.

³ Селисский А. Б. Хвойно-автоловая эмульсионная паста. *Фармация*. 1944;5:18–21.

⁴ Халецкий А. М., Федорова Л. Н. Фитостериновая основа для мазей. *Фармация*. 1945;2:18–21.

ная и ихтиоловая) удовлетворяют требованиям Государственной фармакопеи VII издания¹.

Доцент кафедры технологии лекарственных форм и галеновых препаратов Азербайджанского медицинского института Р. К. Алиев предложил состав ранозаживляющей мази, содержащей порошок листьев подорожника. Анализ показал, что это растительное сырье содержит, кроме глюкозидов, сапонинов, дубильных веществ и эфирных масел, витамины А, С и К. В состав мази, кроме одной части тонкоизмельченного порошка травы подорожника, входит 9 частей вазелина. Мазь оказалась эффективной при лечении труднозаживающих ран и язв, а также при гнойничковых заболеваниях².

Особого внимания заслуживают работы научно-исследовательских институтов и лабораторий по поиску новых фармацевтических субстанций, которые могли бы заменить нафталанскую нефть, показывающую высокую эффективность при лечении кожных заболеваний. Нафталанская нефть производится на Бакинском нефтеперерабатывающем заводе из нефти, полученной в особом месторождении – в области Нафталан (Азербайджанская ССР). Ее свойства хорошо были изучены в довоенные годы, и, согласно циркуляру НКЗдрава от 08.02.1935г. № 25/45, она была рекомендована к широкому применению в курортологии и дерматологии³. Однако во время войны потребность в этом лекарственном средстве резко возросла и перед научным сообществом встала задача поиска заменителей нафталанской нефти, обладающих аналогичными фармакологическими свойствами.

В 1941 г. в Восточной Бухаре в 35 км от ст. Каган на поверхности земли было обнаружено значительное количество нефти. Это послужило поводом для начала бурения нефтяных скважин. На глубине 106 м была обнаружена нефть, которая фонтанировала вместе с газами и водой. Месторождение этой нефти было названо «Карайз» (по-узбекски «черный»). Изучение ее состава и физико-химических свойств показало близость ее группового состава к нафталанской нефти, что, в свою очередь, послужило поводом для ее дальнейшего клинического изучения. Испытания нефти «Карайз» на раздражающие свойства в отношении здоровой и экзематозно измененной кожи установили, что эта нефть не обладает раздражающими свойствами. Клинические испытания нативной нефти «Карайз» и препаратов, приготовленных на ее основе, показали, что одним из основных ее лечебных свойств является рассасывающее действие в отношении инфильтратов. Это свойство

было особенно выражено при лечении нейродермитов. Противозудное действие было выражено слабее. Хороший эффект показан при лечении хронических экзем, в особенности микробных ее форм. При применении препаратов из этой нефти для лечения язвенных процессов пиоидного характера отмечено быстрое очищение язв от некротической ткани, активное разрастание грануляционной ткани и наступление рубцевания. Установлено также, что нефть умеренно раздражает ткани, что способствует отделению гноя. При использовании чистой нефти для лечения фурункулеза врачи единодушно отмечали отсутствие мацерации кожи. Компрессы из нефти эффективны при терапии чешуйчатого лишая в острой фазе. Таким образом, сотрудниками ЦКВИ предложена новая лечебная нефть среднеазиатского происхождения, обладающая высокими противовоспалительными свойствами. Она содействует процессам эпителизации и грануляции кожи, показана для лечения вяло протекающих язв, микробных экзем и фурункулитов⁴.

Об опыте применения нефтяного битума, полученного на Ташкентском асфальтовом заводе (г. Термез, Узбекская ССР) из нефти месторождения Учкызыл, написал А. Б. Селицкий. В 1942 г. битумные мази с содержанием последнего в количестве от 5 до 10 % применялись в кожной клинике ЦКВИ при хронических микробных экземах, нейродермитах, хронических язвах голени, связанных с пиогенной инфекцией, а также при вульгарных и стрептококковых импетиго. Эти мази не вызывали раздражения и давали хороший лечебный эффект. Получив положительный результат от применения битумных мазей, исследователи пошли дальше и предложили в качестве новой субстанции применять экстракт, полученный путем кипячения битума со спиртом. После удаления спирта исследователи получили смолу, которую назвали битумом и применили в концентрации 1–2 % в мазях на вазелине для лечения стрепто-стафилококковых поражений кожи, эрозии и язв. Во всех случаях был получен хороший терапевтический эффект. Мази оказывали противовоспалительное действие и обладали эпителизирующими и гранулирующими свойствами. Таким образом, благодаря исследованиям отечественных фармацевтов и дерматологов нефтяные битумы рекомендованы в качестве новых лекарственных субстанций для лечения кожных заболеваний⁵.

Интерес представляет исследовательская работа сотрудников экспериментальной лаборатории Химфармзавода № 9 (бывший завод общества «Блюменталь») Н. В. Прокофьева и И. Б. Солоноуц. Они

¹ Халецкий А. М., Федорова Л. Н. Фитостериновая основа для мазей. *Фармация*. 1945;2:18–21.

² Алиев Р. К. Ранозаживляющий препарат из листьев подорожника большого (*Plantago major* L.). *Фармация*. 1945;2:28–29.

³ О нафталане. Циркуляр НКЗдрава от 08.02.1935 № 25/45. *Советская фармация*. 1935;5. С. 38–40.

⁴ Селицкий А. Б., Беньянович Е. Б. Новая лечебная нефть караиз. *Фармация*. 1944;3:24–27.

⁵ Селицкий А. Б. Нефтяной битум – серно-смолистый лечебный препарат для местной терапии. *Фармация*. 1943;6:33–34.

обратили внимание на нефть, которая широко применялась в медицинской практике, и предложили использовать ее в качестве составной части для некоторых видов мазей. К сожалению авторы не указывают, из какого месторождения была получена нефть, которую они использовали в работе. Основным критерием ее использования была доступность. Вначале они предложили пасту, в которой нефть загущали глиной, тальком, костяной мукой и другими сыпучими ингредиентами. Следующими препаратами стали нафта-серная и нафта-цинковая мази. Образцы этих мазей были переданы в клинику ЦКВИ и в другие дерматологические клиники. Исследования показали, что нафта-серная мазь вылечивает чесотку в течение 3–6 дней и оказывает положительное действие при лечении гнойничковой сыпи. Она не раздражает кожу и легко в нее втирается. Изготовление и выпуск этой мази были разрешены Фармакологическим комитетом Ученого медицинского совета НКЗдрава СССР (протокол от 25.03.1944). Нафта-цинковая мазь хорошо показала себя при лечении постранных кожных осложнений. Следующим шагом в разработке новых мазевых композиций стал предложенный ими состав эмульсионной мази, приготовленной на прямогонной нефти (остаток после прямой перегонки нефти и отгона из нее легких фракций). Используя омыленную смесь канифоли и оксида цинка, исследователи получили эмульгатор, хорошо связывающий нефть и воду с образованием очень стойкой эмульсии. На полученной эмульсии были приготовлены мази с серой и оксидом цинка, которые также хорошо показали себя в клинике¹.

Во время войны вследствие недостатка вазелина ощущалась острая нужда в основах для мазей. Производству искусственного вазелина и различных углеводородных основ препятствовал недостаток парафина и минеральных масел. Поэтому актуальной становилась проблема использования для медицинских целей некоторых отходов нефтяной промышленности – отходов от ее перегонки, осадков и нефтяных отстоев, в которых концентрируются ее парафиновые фракции.

Надо напомнить, что появлению вазелина в России мы обязаны Д. И. Менделееву, много лет трудившемуся над изучением нефтяного дела в России. Д. И. Менделеев экспериментально показал, что из русской (бакинской) нефти можно приготовить вазелин. На основании своих многочисленных опытов он пришел к заключению, что 100 частей тяжелых нефтяных остатков дают 4–5 % хорошего вазелина. После сообщения Дмитрия Ивановича о своих работах над русским вазелином Русскому химическому обществу в 1881 г. и было положено начало выработке отечественными нефтепромышленниками русско-

го вазелина. Вскоре после этого русский вазелин появился в продаже, а составители 4-го издания Российской фармакопеи усмотрели в новом средстве прекрасную, непортящуюся и не изменяющуюся с течением времени основу для составления мазей и занесли его в список препаратов Фармакопеи².

Одну из первых работ, посвященных применению нефтяных отходов в качестве сырья для получения парафина, озокерита, церезина и вазелина, опубликовали в 1944 г. Я. А. Фиалков и Л. М. Сольц – сотрудники научно-исследовательской и контрольно-аналитической лаборатории Башкирского аптечного управления. Сырьем для получения важных углеводородов послужили отходы Ишимбаевского промысла: парафиновые пробки и амбарная грязь. Ишимбаевское месторождение известно с петровских времен (1729–1756), но с 1932 г. начато его промышленное освоение³. Парафиновая пробка образуется в виде плотного осадка на внутренних поверхностях нефтяных труб (в скважинах), который время от времени нужно удалять из них путем продувания острым паром. Амбарная грязь представляет собой тот же парафиновый слой на дне нефтехранилищ (амбаров), образующийся при длительном хранении нефти. При очередных чистках стенок емкостей она удаляется и некоторое время хранится в «ямах», где еще больше уплотняется. Исследователи провели необходимые работы по выделению и очистке парафиновых фракций из этих продуктов. Анализы показали, что отсутствие бензиновых фракций, небольшое содержание жидких углеводородов, а также значительное содержание парафина являются благоприятными факторами при использовании этих отходов для получения вазелина, озокерита и церезина – компонентов, применяемых для приготовления мазей. Предложенный авторами метод получения вазелина из отходов ишимбаевской нефти показал, что выход вазелина (в лабораторных условиях) из парафиновых пробок равен 30–40 %, а из амбарной грязи – 25–30 %. Авторы убеждены, что при переходе от лабораторной технологии к промышленной (заводской) выход вазелина может быть увеличен⁴.

Для окончательного выяснения вопроса о возможном использовании нефтяных отходов Ишимбаевского месторождения в медицине (дерматологии) Я. А. Фиалков и Л. М. Сольц передали ряд образцов на кафедру фармакологии Башкирского медицинско-

² Стаценко Я. Д. О русском вазелине. *Фармацевтический вестник*. 1900;21:376–377.

³ Зайнетдинов Э. А. Инициаторы создания нефтяной промышленности в Республике Башкортостан. *Геология. Известия Отделения наук о Земле и природных ресурсов*. 1924;1:78–91.

⁴ Фиалков Я. А., Сольц Л. М. Применение отходов ишимбаевской нефти в качестве основы для мазей и для получения вазелина. Сообщение 2. *Фармация*. 1944;2:21–23.

¹ Прокофьев Н. В., Солоуноуц И. Б. Препараты из нефти. *Фармация*. 1944;5:29–32.

го института для экспериментального изучения их безвредности и в дерматологическую клинику того же института для клинического исследования. В результате проведенных экспериментов установлено, что полученные образцы не оказывают негативного влияния на кожу экспериментальных животных и в виде мази (смесь вазелина и отхода в количестве 10–20 %) способствуют более быстрому заживлению ран. Мази, приготовленные на нефтяных отходах (цинковая 10 %, риваноловая 2 %, ихтиоловая 10 %, Вилькинсона), легко втирались и оказывали благоприятное воздействие на кожу, что стимулировало терапевтический эффект. Вопрос о применении мазей, приготовленных на ишимбаевских нефтяных отходах, обсуждался на заседании Уфимского дерматовенерологического общества (04.09.1942, докладчик доц. В. И. Майорский). В результате отходы ишимбаевской нефти допущены в качестве замены нафталановой нефти и как мазевая основа Фармакологическим комитетом НКЗдрава СССР (протокол № 15 от 23.10.1943)¹.

С целью экономии вазелина и растительных жиров А. Л. Каталхерман предложил новую основу для мазей с добавлением жира морских животных (ворвань). В частности, проведя широкую экспериментальную работу, он установил, что лучшей мазевой основой является смесь следующего состава: парафина 1,5 части, воска 0,5 части, китового жира, прозрачного или мутного (не отделенного от твердых триглицеридов), 5 частей. Эта основа имеет относительно высокую температуру плавления, но по другим показателям удовлетворяет требованиям Фармакопеи. На этой основе были приготовлены следующие мази: желтой окиси ртути 2 %, амидохлорной ртути, диахильная, серная, цинковая. Последние три мази сохраняли свои первоначальные свойства на протяжении месяца. Мази с желтой окисью ртути и амидохлорной ртутью изменяли свой цвет, что свидетельствовало об их нестабильности. Несмотря на это, автор рекомендует эту основу для использования в аптечной практике².

С этой же целью Г. Я. Коган предложил шире использовать мазевые основы, полученные из soapstocka – отхода маслозаводов, выпускающих пищевое растительное масло – хлопковое, подсолнечное, льняное, кунжутное и др. После отжима или экстракции семян сначала получается сырое растительное масло, содержащее ряд примесей. Дальнейшая переработка масла приводит к образованию мыла, которое вместе с частично эмульгированным маслом, белками, слизью, жирными кислотами и глицерином переходит в soapstock. К числу достоинств мазей на основе soapstocka автор относит прекрасный клинический эффект и легкую смываемость водой. Что касается

недостатка, то он заключается в том, что эта основа быстро портится, потому что в ней содержатся белковые вещества и слизи. Однако если soapstock подвергнуть полному гидролизу, то получается мазевая основа, обладающая длительным сроком хранения. Учитывая полученные данные по использованию рекомендованной основы, автор делает оптимистичное заключение, утверждая, что эти основы заслуживают внимания и требуют дальнейшего изучения³.

Особого внимания заслуживает предварительное сообщение Е. Н. Кутумовой, А. Б. Селисского и З. Т. Синициной. Мы считаем, что это сообщение открывает новый период в развитии отечественных эмульгаторов, необходимых для получения эмульсионных композиций различного типа. На примере получения защитных мазей авторы разбирают их составы и способы получения первых отечественных эмульгаторов. Так, в 1941 г. А. Б. Селисский предложил защитную мазь, состоящую из 3 частей окиси цинка, 14 частей стеарина и 83 частей растительного масла. Эта мазь апробирована и рекомендована к применению Фармакологическим комитетом Ученого медицинского совета НКЗдрава СССР. Несмотря на удовлетворительные защитные свойства этой мази, ее однофазный характер не позволял в полной мере защитить кожу рук от отрицательного воздействия нефтепродуктов (керосин, бензин, смазочные масла и др.) и химических веществ (кислоты и щелочи). Для повышения защитных свойств мазей было решено разработать эмульсионный состав и способ получения нового эмульгатора. В результате проведенных опытов был предложен эмульгатор ЦАНИИ № 1 – продукт термической обработки льняного масла с окисью цинка, применявшийся при изготовлении медицинских мазей. Этот эмульгатор создавал эмульсии второго рода (в/м), однако эти композиции не обладали необходимой стабильностью. Дальнейшие работы проводились с эмульгатором ЦАНИИ № 2 – продуктом, полученным путем термической обработки смеси предварительно уплотненного подсолнечного масла и окиси цинка. Уплотненное подсолнечное масло получали путем длительного (25–30 ч) нагревания масла на масляной бане при температуре 150–180 °С. В результате получали уплотненную густую массу темно-желтого цвета. Для получения эмульгатора ЦАНИИ № 2 брали 100 частей уплотненного подсолнечного масла, 10 частей оксида цинка и в присутствии воды нагревали до полного омыления жира. В результате получали однородный высокоэффективный эмульгатор. Для оценки эмульгирующей способности нового эмульгатора авторами была разработана методика определения этой важной характеристики. Полученный эмульгатор был применен при приготовлении защитной мази нового состава: 7,5 частей эмульгатора ЦАНИИ № 2, 22 части подсолнечного масла,

¹ Фиалков Я. А., Сольц Л. М. Применение отходов ишимбаевской нефти в качестве основы для мазей и для получения вазелина. Сообщение 1. *Фармация*. 1944;1:9–19.

² Каталхерман А. Л. Основа для мазей. *Фармация*. 1944;3:22–24.

³ Каган Г. Я. Soapstockовые основы для мазей. *Фармация*. 1944;4:37–39.

50 частей воды и 0,5 части воска. Последний компонент придавал мази более плотную консистенцию. Полученная мазь имела кремовый цвет и сметанообразную консистенцию и, несмотря на грубую дисперсность, была стабильна при хранении. Для установления эффективности мази были проведены ее испытания в производственных условиях на заводах и фабриках. Испытания показали хорошее защитное действие мази. Особенный эффект отмечался у сотрудников гальванических цехов: в результате применения мази число заболеваний кожи либо резко сократилось, либо не отмечались вообще. Таким образом, использование эмульгатора ЦАНИИ № 2 позволяет готовить консистентную эмульсию, испытание которой в производственных условиях показало ее высокие защитные свойства при вредном воздействии углеводородных и кислотно-основных ингредиентов¹.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как можно видеть, ВОВ явилась важным фактором, послужившим толчком к разработке новых мазевых основ. Несмотря на тяжелейшее положение на фронте и в тылу, отечественные ученые-фармацевты активно вели поиски новых возможностей в фармацевтической технологии. В ход шли, как правило, отходы нефтяных, деревоперерабатывающих и рыбных производств, остатки от производства растительного масла, а также растительные и минеральные компоненты.

Этой работой занимались не только ведущие научно-исследовательские фармацевтические институты и кафедры технологии галеновых препаратов фармацевтических институтов, но и заводские и отраслевые лаборатории аптекоуправлений. Активно помогали им в этой работе клинические кафедры региональных медицинских институтов.

Очевидно, что отечественные исследователи решали наиболее насущные проблемы, связанные с разработкой мазей, среди которых можно отметить:

- работы по поиску вспомогательных веществ для приготовления новых мазевых основ, позволяющих экономить животные и растительные жиры;
- эксперименты по получению вазелина, церезина и других углеводородных носителей для компенсации возросшей потребности в этом традиционном носителе для мазей;
- исследования по синтезу эмульгаторов, позволяющих готовить эмульсионные композиции различного типа;
- действия по поиску заменителей лечебной нафталанской нефти.

Нельзя не отметить совместную и плодотворную работу фармацевтов и дерматологов – сотрудников

ЦКВИ, кожно-венерологических клиник Молотовского, Азербайджанского, Башкирского медицинских институтов в области разработки и клинической апробации новых мазевых основ и лечебных мазей на их основе. Особенно активно работал в области разработки новых основ Александр Борисович Селисский, который с 1931 по 1949 год заведовал клиническим отделом Центрального кожно-венерологического института (г. Москва). Он сам, а также сотрудники возглавляемого им клинического подразделения института проводили многочисленные эксперименты по проверке эффективности новых композиций, предлагаемых фармацевтами.

Можно сказать, что в годы войны в СССР отмечен переход от углеводородных носителей, занимавших основную часть мазевых основ в практике аптек, к эмульсионным композициям различного характера. Начались работы по осмысленному внедрению эмульсионных мазей. Важна была не только экономия жиров и масел, на первое место стала выходить клиническая эффективность и биологическая доступность субстанций. В этот период начались экспериментальные работы по получению эмульгаторов для производства эмульсионных композиций.

В это время отмечено тесное сотрудничество между научно-исследовательскими институтами, заводскими лабораториями, медицинскими институтами, дерматовенерологическими клиниками с одной стороны и Фармакологическим комитетом Ученого медицинского совета НКЗдрава СССР с другой. При получении положительных результатов в процессе проверки эффективности новых композиций члены Ученого совета оперативно рассматривали поданные предложения и, как правило, рекомендовали их к внедрению.

Видно, что в научных подразделениях велись поиски новых основ для мазей, однако фактически все клинические исследования проводились на ограниченном ассортименте мазей: серной, нафталановой, ихтиоловой, ртутной, диахильной. Понятно, что список субстанций, из которых можно было сделать мази, был очень ограничен. Новые субстанции – сульфаниламиды, антибиотики, гормоны и витамины – были еще далеки от внимания отечественных фармацевтов.

На основании вышеизложенного становится отчетливо виден вклад отечественных провизоров в работу военных медицинских подразделений по оказанию медицинской помощи раненым. Благодаря совместной работе медицинских и фармацевтических вузов, отраслевых научно-исследовательских институтов, заводских лабораторий и научных подразделений некоторых аптекоуправлений уровень оказания медицинской помощи значительно возрос, что в итоге сократило сроки лечения раненых и больных и повысило долю бойцов, возвратившихся в строй.

¹ Кутумова Е. Н., Селисский А. Б., Сеницына З. Т. Новый тип защитной мази. *Фармация*. 1945;5:18–22.

Рекламная статья / Sponsored article

Постколоночная дериватизация в фармацевтическом анализе



Н. А. Новожилова, А. В. Севко

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке Sevko & Co

Постколоночная дериватизация в жидкостной хроматографии применяется для анализа низких концентраций соединений, не содержащих хромофорных или флуорофорных групп. В фармацевтическом анализе эта техника занимает особенную нишу и применяется для анализа аминокислот в белковых и пептидных препаратах в соответствии с ГФ РФ, EP, USP, определения полиэфирных монокарбоксильных ионофорных антибиотиков (монензина, наразина, салиномицина, семдурамицина, мадурамицина и т. д.) и др. Метод характеризуется высокой повторяемостью вследствие отсутствия влияния матрицы на результаты анализа и стойкости получаемых дериватов, полной автоматизацией процесса, а также быстрой и простой одностадийной реакцией дериватизации без образования побочных продуктов. Компания Sevko & Co уже более 12 лет предлагает единственное на территории России решение – модуль постколоночной дериватизации APM-1000H(T), который совместим и эксплуатируется с любыми жидкостными хроматографами. Оснащение модуля не только химическим, но и фотохимическим реактором расширяет круг его применений. На базе модуля постколоночной дериватизации компания разработала комплексное решение для аминокислотного анализа – аминокислотный анализатор АКА-1000. Этот хроматограф состоит из стандартных модулей серии ВЭЖХ «Скороход» и может быть легко модифицирован для решения любых аналитических задач, требующих постколоночной дериватизации. Решение включает все необходимые реактивы и ионообменные колонки собственного производства для анализа аминокислот. Анализатор может быть использован и для привычных анализов по механизму обращено-фазовой или нормально-фазовой хроматографии. Уникальная возможность создания второго полностью независимого аналитического канала на базе автодозатора из серии «Скороход» исключает всякий риск перекрестного загрязнения между разноплановыми анализами. Анализатор производится на собственных мощностях компании по полному циклу без использования западных компонентов и является единственной отечественной разработкой такого рода.

Post-column derivatization in pharmaceutical analysis

Natalia A. Novozhilova, Alexander V. Sevko

The authors prepared the article with the financial support of Sevko & Co

Post-column derivatization in HPLC is used to analyze low concentration of compounds that do not contain chromophore or fluorophore groups. In pharmaceutical analysis, this technique occupies a special niche and is used for the analysis of amino acids in protein and peptide drugs in accordance with SP RF, EP, USP as well as for determination of polyether monocarboxyl ionophore antibiotics (monensin, narasin, salinomycin, semduramicin, maduramicin, etc.) and others. The method is characterized by high repeatability due to the absence of matrix influence on the results of analysis and stability of the obtained derivatives, full automation of the process, as well as a fast and simple one-step derivatization reaction without the formation of by-products. Over than 12 years, «Sevko & Co» company has been offering the unique solution for Russian market – the ARM-1000H(T) post-column derivatization module, which is compatible and can be used with any HPLCs. The module can be equipped not only with a chemical but also with a photochemical reactor, expanding the range of its applications. The company has developed a turn-key solution for amino acid analysis – the AAA-1000 amino acid analyzer as a consequence and a result of continuous research into peculiarities of post-column derivatization technique. This chromatograph consists of standard modules of the «Skorohod» HPLC series and can be easily modified to solve any analytical problem requiring post-column derivatization. The solution includes all the necessary reagents and ion exchange columns of own production for amino acid analysis. The analyzer can also be used for conventional analyses using reversed-phase or normal-phase chromatography. The unique possibility of creating a second completely independent analytical channel based on the autosampler from the "Skorohod" series eliminates any risk of cross-contamination between different analyses. The analyzer is manufactured at the «Sevko and Co» own facilities in a full cycle without the use of Western components and is the only domestic product of this kind.

Качественный и количественный состав аминокислот в белковых, пептидных и других фармацевтических препаратах позволяет установить их подлинность. Кроме того, аминокислотный анализ может быть использован в качестве дополнительного инструмента при анализе структуры белка и пептида, а также для оценки стратегий фрагментации в пеп-

тидном картировании и для обнаружения атипичных аминокислот, которые могут присутствовать в белке или пептиде. Помимо этого, аминокислотный анализ полезен при поиске родственных примесей в активных фармацевтических субстанциях (АФС), например, свободных аминокислот или интермедиатов.

Поскольку аминокислоты являются нехромофорными соединениями, то для количественного определения низких концентраций этих компонентов методом ВЭЖХ необходимо использовать методы дериватизации с образованием флуоресцирующих или поглощающих УФ-излучение производных, либо высокочувствительное масс-спектрометрическое детектирование, которое, однако, является на порядок более дорогим методом по сравнению с ВЭЖХ, а также более требовательным с точки зрения квалификации химика-аналитика. Высокая чувствительность метода является неременным условием при определении аминокислот в пептидных гормонах, их метаболитах и фрагментах, а также в биологических и клинических образцах. Альтернативой методам ВЭЖХ может выступать капиллярный электрофорез, однако, с проигрышем в чувствительности определения и повторяемости получаемых результатов.

Серия **жидкостных хроматографов «Скороход»** предлагает функционал как предколоночной дериватизации при помощи автодозатора, так и постколоночной дериватизации при помощи высокотемпературного реактора. Однако, сочетая обе возможности в своей линейке, для анализа аминокислот **мы традиционно предлагаем и рекомендуем** именно постколоночный метод с дериватизацией нингидрином, соответствующий Российской, Европейской и Американской фармакопеям: ОФС.1.2.1.0025.18, ФС.3.1.0108.22 ГФ РФ, Ph. Eur. 2.2.56, USP <1052> Amino Acid Determination (рисунок 1).

Полная автоматизация метода позволяет использовать его в поточных анализах без потери времени на ручные операции по подготовке пробы, как, например, при проведении предколоночной дериватизации при помощи фенилизотиоцианата либо же на

саму реакцию (до 50 мин), как, например, при использовании дансилхлорида в качестве дериватизирующего агента.

Кроме того, при дериватизации **после** разделения чистых аминокислот по ионообменному механизму результат не зависит ни от матрицы, ни от концентрации гидролизованного белка, чего нельзя сказать о методе предколоночной дериватизации с дальнейшим анализом производных аминокислот по обращено-фазовому механизму. Образование побочных дериватов, конкурирующие реакции, ингибирование основной реакции приводят к сниженной повторяемости результатов анализа в последнем случае, тогда как **при постколоночной дериватизации влияние матрицы отсутствует вообще** вследствие того, что ее компоненты не удерживаются на сорбенте, не влияют на разделение аминокислот и реакцию дериватизации. Аналогичное негативное влияние на повторяемость результатов анализа имеет использование ортофталевого альдегида в качестве предколоночного реагента. Дело в том, что получаемые производные, особенно в случае сильно удерживаемых аминокислот (триптофана, лизина и др.), неустойчивы, что делает невозможным получение стабильных количественных результатов анализа. Кроме того, быстрая деградация ортофталевого реагента вынуждает готовить его каждый день заново, что крайне неудобно при поточных анализах.

Необходимость модификации как первичных, так и вторичных аминокислот также играет немалую роль при выборе модифицирующего агента. Так, например, при использовании ортофталевого альдегида и 2-меркаптоэтанола в качестве предколоночных реактивов в реакцию вступают только первичные аминокислоты.

И, наконец, **доступность реактивов** для проведения реакции дериватизации ставит окончательную точку в выборе оптимального дериватизирующего агента и способа дериватизации. Предколоночная дериватизация с использованием 6-аминохиолин-N-гидроксисукцинимидил карбамата (AQC) хотя и показывает хорошие результаты по разрешению производных аминокислот и чувствительности метода, находясь на одном уровне по точности и повторяемости результатов с постколоночной дериватизацией нингидрином, однако, из-за трудной доступности модификатора на территории России не может всерьез конкурировать с упомянутым решением.

Компания Sevko & Co уже более 12 лет предлагает комплексное решение по анализу свободных и связанных аминокислот. Модуль постколоночной дериватизации АРМ-1000Н(Т) представляет из себя стандартный модуль из серии «Скороход», в который интегрированы термостат колонок, насос для подачи нингидринового реагента и высокотемпературный реактор с регулируемой температурой и катушкой-капилляром длиной до 30 м (в зависимости от применения) для проведения реакции деривати-



Рисунок 1. Аминокислотный анализатор АКА-1000 из серии «Скороход»

Figure 1. Amino acid analyzer AAA-1000 from the Skorohod series

зации. Этот модуль был выпущен в продажу в 2013 г. и явился предтечей создания полноценного аминокислотного анализатора АКА-1000.

Отметим, что модули постколоночной дериватизации производства Sevko & Co установлены по всей России не только с хроматографами «Скороход», но и более 50 штук – совместно с хроматографами марок Shimadzu, LicArt 62, Agilent, Knauer. Блок полностью автономен и может быть сочленен с любой ВЭЖХ-системой. Это решение универсально и является единственным доступным на территории России. Управление модулем осуществляется с большого встроенного сенсорного экрана или из ПО Мультитром.

Опционально модуль постколоночной дериватизации АРМ-1000Н может быть оснащен фотохимическим реактором. В качестве дериватирующего агента в данном случае используется УФ-излучение (254 или 365 нм). Этот способ дериватизации не требует использования химикатов, дополнительного насоса для подачи реагента, не происходит разбавления образца. Кроме того, отпадает необходимость заботиться о стойкости дериватирующего агента. Однако, как и в любом методе, существуют свои ограничения и дополнительные факторы, которые нужно учитывать, чтобы реакция прошла эффективно: рН среды, присутствие буферов, ион-парных реагентов, кислорода, состав подвижной фазы, длина волны и интенсивность излучения, время экспозиции – все это может влиять на кинетику реакции в зависимости от ее типа. В фармацевтическом анализе фотохимическая постколоночная дериватизация имеет довольно широкий круг применений: определение конъюгированных и неконъюгированных эстрогенов и их примесей в сырье и лекарственных формах с флуориметрическим детектированием; анализ лекарственных форм, содержащих анальгетики и родственные соединения (ацетилсалициловая кислота, парацетамол, пропифеназон, кофеин, хлорфенирамин) на диодной матрице, спектрофотометрическое определение производных барбитуратов, образующихся в результате реакции деалкилирования, анализ фенотиазинов и демоксепамов с флуориметрическим детектированием и т. д.

Ниже приведена 3D-модель модуля постколоночной дериватизации АРМ-1000Н(Т), а также его основные характеристики. Автоматическая промывка реакционного капилляра и реактора после каждой инъекции предотвращает его закупорку. Защита от перегрева и мониторинг давления в режиме реального времени позволяют проводить реакцию при высоких температурах. Модуль может быть сконфигурирован как химический или фотохимический реактор, либо сочетать в себе обе возможности в рамках единой платформы АРМ без увеличения габаритных размеров, оставаясь максимально компактным, как и все модули из серии «Скороход» (рисунки 2, 3, таблица 1).

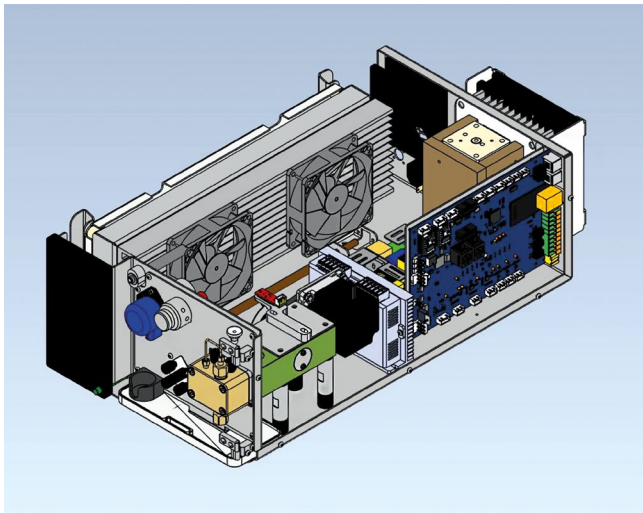


Рисунок 2. Модуль постколоночной дериватизации АРМ-1000НТ (вид справа)

Figure 2. Post-column derivatization module ARM-1000HT (right-side view)

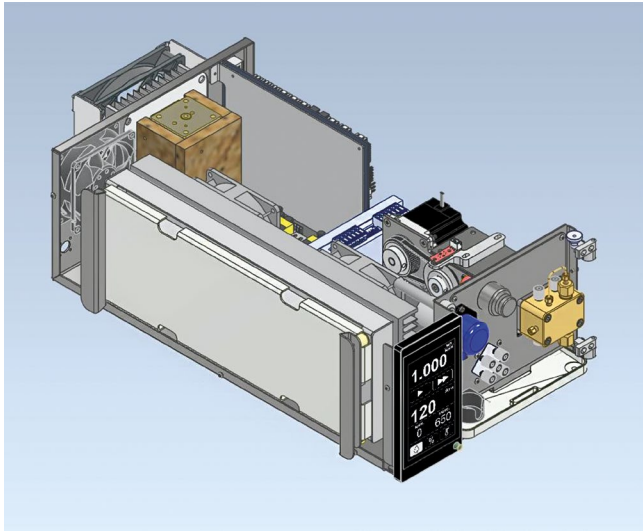


Рисунок 3. Модуль постколоночной дериватизации АРМ-1000НТ (вид слева)

Figure 3. Post-column derivatization module ARM-1000HT (left-side view)

Таблица 1. Технические характеристики модулей постколоночной дериватизации АРМ-1000Н и АРМ-1000НТ

Table 1. Specifications of the post-column derivatization modules ARM-1000H and ARM-1000HT

	АРМ-1000Н ARM-1000H	АРМ-1000НТ ARM-1000HT
Совместимость Compatibility	С любой ВЭЖХ-системой Compatible with any HPLC	
Интегрированный реакционный капилляр Integrated reaction capillary	16 м для дериватизации нингидрином 16 m for ninhydrin derivatization	

	APM-1000H APM-1000H	APM-1000HT APM-1000HT
Диапазон поддерживаемой температуры реактора Integrated reaction capillary	50–150 °C	
Шаг температуры Step	1 °C	
Активное охлаждение Active cooling	Есть Yes	
Защита от перегрева Overheating protection		
Автоматическая промывка Automatic flushing		
Мониторинг давления Pressure monitoring		
Интегрированный термостат колонок Integrated column oven	Нет No	Есть Yes
Интегрированный дозирующий насос Integrated reagent dosing pump	Есть Yes	
Тип Type	Последовательный плунжерный Dual plunger in-series design	
Исполнение Materials coming into contact	Инертное (ПЭЭК) Inert (PEEK)	
Головка Head	Микроголовка Microhead	
Диапазон скорости потока Flow rate range	0,001–4 мл/мин 0.001–4 ml/min	
Клапан Valve	Двухкомпонентный на стороне низкого давления Two-component LPGE unit	
Управление Control	ПО Мультихром или встроенный сенсорный экран Chrom & Spec CDS or built-in touch screen	
Габаритные размеры (Ш × В × Г) Dimensions (W × H × D)	260 × 160 × 460 мм 260 × 160 × 460 mm	
✓ Любая другая длина капилляра в соответствии с аналитической задачей		
✓ Any other capillary length according to the analytical task		
✓ Аналитическая головка: 0,001–10 мл/мин		
✓ Analytical head: 0.001–10 ml/min		
✓ Четырехкомпонентный клапан на стороне низкого давления		
✓ Four-component LPGE unit		
✓ Фотохимический реактор (λ = 254 или 365 нм). Устанавливается в модуль вместо дозирующего насоса и/или термостата колонок		
✓ Photochemical reactor (λ = 254 or 365 nm). Can be installed in the PCD module instead of the dosing pump and/or column oven		

Отметим, что так же как и аминокислотные анализаторы с предколоночной дериватизацией, аминокислотные анализаторы с постколоночной дериватизацией **возможно** использовать и для других «стандартных» ВЭЖХ-анализов ввиду того, что систе-

мы – модульные и могут быть гибко настроены под разные аналитические задачи. В обоих случаях **это решение видится неидеальным по нескольким причинам**: использование буферных растворов требует тщательной отмывки системы при переходе на альтернативные методики и обратно, что при большом количестве проб будет отнимать время, однако, конечно, можно работать «партиями»; остатки хромофорных или флуорофорных реагентов-меток могут загрязнять систему и проявляться в виде паразитных пиков на хроматограммах, вступать в реакции с матрицей или аналитом в смежных анализах. При этом нужно учитывать, что при предколоночной дериватизации реагент-метка проходит через весь жидкостной тракт хроматографа от автодозатора до детектора, подвергая риску загрязнения всю систему; при постколоночной дериватизации реагент поступает только в детектор. Конечно, при аккуратной работе химика-аналитика в обоих случаях анализы можно комбинировать, однако, необходимо иметь ввиду и взвешивать риски, а также затрачиваемое время.

Для купирования описанных рисков и продуктивной работы лабораторий серия ВЭЖХ «Скороход» предлагает **уникальное решение – двухканальную полностью автоматизированную систему с единым автодозатором** и возможностью одновременного ввода проб в 2 независимых аналитических линии (рисунок 4). Конфигурация предполагает установку второго дозирующего крана в штатное отверстие автодозатора. При этом на каждом канале можно использовать свои градиентные режимы, отличные хроматографические условия, а также разные детекторы. Аналитические линии даже могут иметь различное исполнение: инертное из ПЭЭК (35 МПа) – для анализа аминокислот по ионообменному механизму и из нержавеющей стали (65 МПа) для работы в рамках обращено-фазовой или нормально-фазовой быстрой хроматографии с колонками зернением вплоть до 1,7 мкм в зависимости от их геометрии и используемых элюентов. Такое решение не только полностью автоматизировано и лишено описанных выше недостатков по ручной трансформации систем для аминокислотного анализа в ВЭЖХ-системы широкого применения, но и позволяет в 2 раза сократить время анализов и сэкономить бюджет на приобретение двух отдельных хроматографов. На данный момент, аналогичные решения на российском рынке отсутствуют.

Интеграция модуля постколоночной дериватизации APM-1000H(T) с другими модулями из серии «Скороход» представляет из себя комплексное готовое решение для анализа аминокислот – аминокислотный **анализатор АКА-1000**. Как и вся продукция компании Sevko & Co, **анализатор производится на собственных мощностях компании без использования западных компонентов** в Пушкинском районе Подмосковья **по полному циклу и является единственной отечественной разработкой такого рода**.

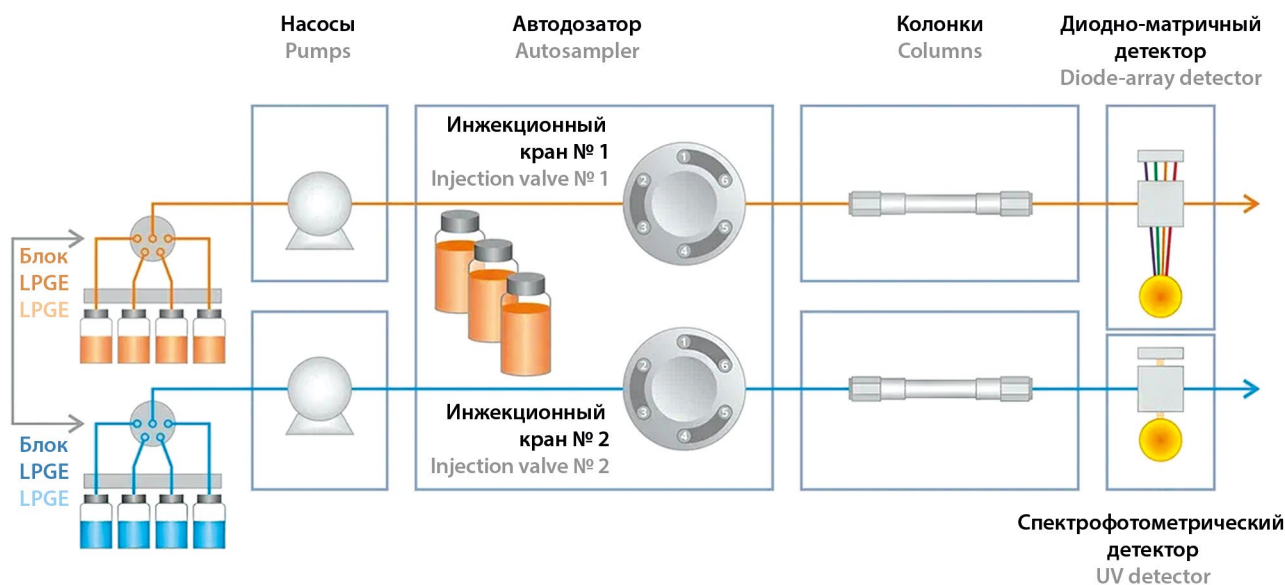


Рисунок 4. Двухканальная ВЭЖХ-система «Скорород» с единым автодозатором

Figure 4. Dual-injection HPLC system "Skorohod" with a single autosampler

Все детали и механизмы системы, соприкасающиеся с подвижной фазой и пробой, выполнены из **инертных материалов** (ПЭЭК, ПТФЭ, ФЭП, сапфир, керамика, синтетический рубин), что позволяет использовать высокосолевые буферы в качестве подвижной фазы.

Для подачи реагента и элюента используются беспульсационные короткоходовые насосы из серии «Скорород» (рисунок 5). Благодаря высокой частоте и малому ходу (8 мкл) плунжеров пульсации системы отсутствуют уже на физическом уровне в отличие от традиционных длинноходовых насосов. Для постколоночной дериватизации это является

критичным требованием, так как позволяет избежать уширения пиков и потери эффективности разделения вследствие неравномерной подачи реагента, увеличения шума, и как следствие, ухудшения пределов детектирования, а также способствует поддержанию концентрации дериватизирующего агента в течение реакции на одном уровне, без скачков и нежелательного разбавления. Все это критично для получения точных и повторяемых результатов количественного определения аминокислот.

Лоток для бутылей с системой подачи инертного газа (рисунок 6) снабжен регулятором давления, а бутылки — специальными крышками с цилиндриче-

SEVCO

ПРОИЗВОДИМ, А НЕ СОБИРАЕМ



ЛУЧШЕЕ ДЛЯ СВОИХ

SKOROHOD



Рисунок 5. Модуль постколоночной дериватизации и насос для подачи элюента

Figure 5. Post-column derivatization module and solvent delivery pump



Рисунок 6. Лоток для бутылей с системой подачи инертного газа

Figure 6. Bottle tray with inert gas supply system

скими кранами, которые позволяют поддерживать давление газа в системе. Дериватизирующие реагенты, а также буферы, как и все жидкостные линии системы, находятся под подушкой инертного газа (N₂), что позволяет избежать окислительной деструкции и загрязнения реагентов.

Интегрированный термостат колонок (рисунок 7) позволяет поддерживать высокие температуры (до 99 °C), необходимые для анализа аминокислот, с высокой точностью (± 0.5 °C) и стабильностью (± 0.1 °C), а возможность создания градиентных температурных режимов уменьшает время анализа и улучшает разделение.

Уникальный для российского рынка автодозатор прямого дозирования пробы из иглы (split-loop) (рисунок 8), о котором мы подробно рассказывали в прошлом выпуске журнала (том 14, № 2. 2025), обеспечивает нулевой кросс-перенос благодаря непрерывной промывке всасывающей линии внутри подвижной фазой, проточному дизайну узла ввода пробы, а также отсутствию трансферной линии между инъекционным портом и дозирующим краном, которая не вносит вклад в накопление потенциальных загрязнений. Шаговый двигатель с разрешени-



Рисунок 7. Интегрированный термостат колонок

Figure 7. Integrated column oven



Рисунок 8. Автодозатор прямого дозирования пробы из иглы («split-loop»)

Figure 8. Direct injection autosampler ("split-loop")

ем 0,08 мкл на 1 шаг обеспечивает точное и повторяемое дозирование во всем диапазоне (0,1–100 мкл) с шагом 0,01 мкл и дискретностью всего 0,005 мкл.

Классическая конфигурация анализатора снабжена спектрофотометрическим детектором с двумя фиксированными длинами волн (440 и 570 нм), на котором анализируются окрашенные производные аминокислот после реакции с нингидрином в автоматизированном модуле АРМ-1000Н(Т).

Нингидрин является лучшим выбором для постколоночной дериватизации аминокислот, так как удовлетворяет всем требованиям, применяемым к дериватизирующему реагенту:

- возможность полной автоматизации анализа;
- стабильность реагента и получаемых производных;
- селективность реакции;

- быстрота реакции, простой одностадийный синтез;
- реакция как с первичными, так и со вторичными АК;
- доступность реагента в России;
- возможность использования в качестве детектора дешевого УФ-детектора.

Альтернативой может служить ортофталевый альдегид, однако, нужно иметь ввиду, что сам по себе, без дополнительного реагента и еще одной стадии синтеза он будет реагировать только с первичными аминокислотами. Кроме того, предварительная стадия окисления значительно снижает выигрыш в чувствительности метода при определении первичных аминокислот, а конфигурация анализатора предполагает использование более дорогого флуориметрического детектора. Тем не менее, такой метод может быть использован для получения более низких пределов обнаружения в некоторых случаях.

В обеих конфигурациях аминокислотного анализатора используются светодиодные детекторы, имеющие ряд серьезных эксплуатационных преимуществ. Поскольку диоды имеют специфичную длину волны, то не требуется ни монохроматора, ни фильтров для его работы, за счет чего себестоимость изделия резко снижается. При этом, чувствительность у этих детекторов даже выше, чем у ламповых, так как светодиоды обладают более высокой стабильностью излучения, чем лампы широкого спектра, а также более высокой светоотдачей. Такие детекторы не требуют периодического ТО, так как диоды являются фактически вечными источниками излучения и служат в течение всего срока жизни аминокислотного анализатора (10 и более лет). В отличие от ламп диоды не требуют прогрева перед применением, экономя время химика-аналитика.

В комплект анализатора аминокислот АКА-1000 входят **все необходимые реактивы на 500 анализов, приготовленные в лаборатории компании Sevko & Co, а также колонки собственного производства** (рисунок 9):

- Буфер А1 – Na⁺/Li⁺ система.
- Буфер В1 – Na⁺/Li⁺ система.
- Буфер С1 – только Li⁺ система.
- Раствор для регенерации.
- Раствор для разбавления образцов.
- Нингидриновый реагент.
- Стандартная смесь аминокислот для построения калибровки.
- Аналитическая колонка с сульфированной ионообменной смолой на основе полистирола, сшитого дивинилбензолом (10 % сшивка) в Na⁺ или Li⁺ форме, 150 × 4,6 мм, 7 мкм. Колонка в натриевой форме стандартно применяется при анализе гидролизатов белков в фармпрепаратах. Колонку в литиевой форме обычно применяют при проведении анализа в сложных матрицах: биологических жидкостях, экстрактах из растений, либо при



Рисунок 9. Реактивы и колонки для аминокислотного анализатора АКА-1000 производства Sevko & Co

Figure 9. Reagents and columns for the AAA-1000 amino acid analyzer manufactured by Sevko & Co

анализе широкого набора свободных аминокислот в БАД.

- Фильтр-ловушка для аммиака.

При поставке анализатора АКА-1000 Производитель не только проводит монтажные и пусконаладочные работы, а также инструктаж персонала, но и обязательно демонстрирует определение аминокислот на объектах конечного пользователя. Гарантия на аминокислотный анализатор АКА-1000 составляет 2 года, как и на всю серию ВЭЖХ «Скороход».

Помимо классического аминокислотного анализа анализаторы АКА-1000 могут применяться для анализа биогенных аминов. В ветеринарной фармакологии АКА-1000 успешно решает задачи по определению полиэфирных монокарбоксильных ионофорных антибиотиков (монензина, наразина, салиномицина, семдурамицина, мадурамицина и т. д.). Эти антибиотики являются кокцидиостатиками и применяются в лечебных кормах и жидких добавках для профилактики кокцидиоза у кур, индеек, цесарок, цыплят-бройлеров. Причем для разных видов птицы разрешены разные наименования антибиотиков. Поэтому важно специфически идентифицировать и количественно определять каждый ионофор в лечебных кормах, а также контролировать уровень их примесей в нелечебных кормах. В этом случае в качестве дериватизирующего агента используется ванилин в присутствии серной кислоты, а полученные производные определяются на спектрофотометрическом детекторе при 520 нм. Ниже приведена хроматограмма, полученная на аминокислотном анализаторе АКА-1000 на одном из подмосковных предприятий ветеринарно-фармацевтического профиля (рисунок 10).

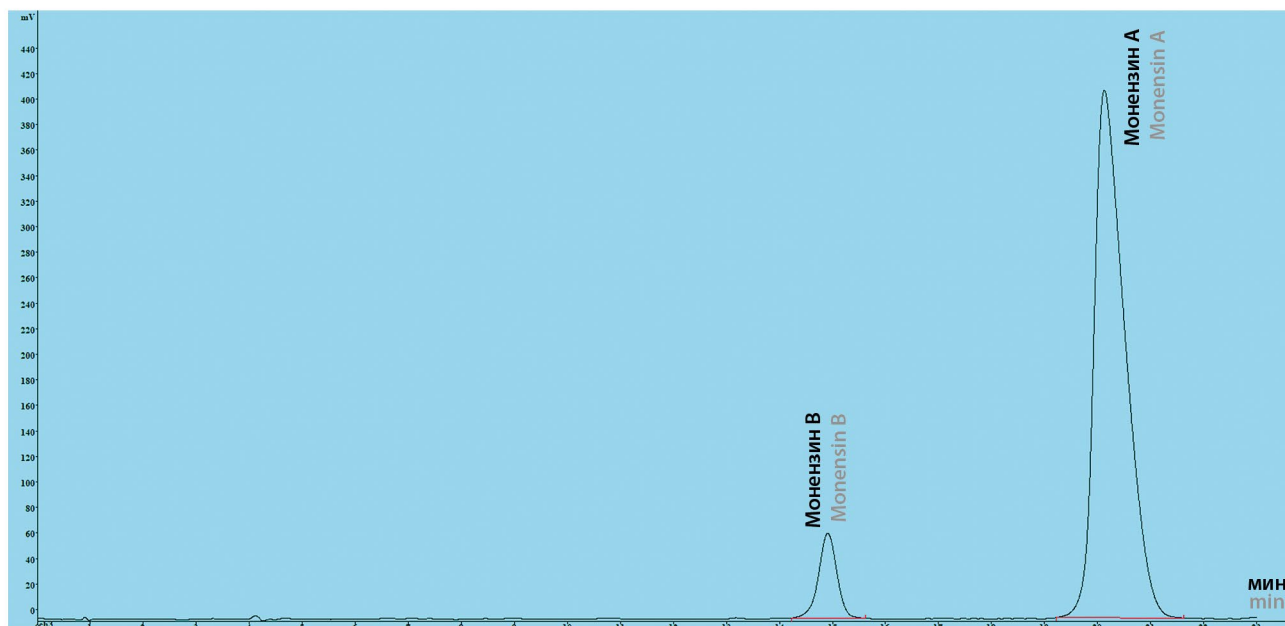


Рисунок 10. Хроматограмма монензина, полученная на модификации аминокислотного анализатора АКА-1000: скорость потока подвижной фазы – 0,85 мл/мин; скорость потока дериватизирующего реагента – 0,9 мл/мин; $\lambda = 520$ нм; $V = 5$ мкл; $T_{\text{колонок}} = 25^\circ\text{C}$; $T_{\text{реактора}} = 98^\circ\text{C}$

Figure 10. Chromatogram of monensin obtained on a modification of the AAA-1000 amino acid analyzer: mobile phase flow rate – 0.85 ml/min; derivatizing reagent flow rate – 0.9 ml/min; $\lambda = 520$ nm; $V = 5$ μl ; $T_{\text{column}} = 25^\circ\text{C}$; $T_{\text{reator}} = 98^\circ\text{C}$

Также в ГФ РФ впервые вводится статья по определению гадодиамида гидрата – препарата на основе гадолиния для МРТ-исследований кровеносных сосудов. Здесь в качестве постколоночного реагента выступает арсеназо III в присутствии азотной кислоты и мочевины. Детектирование происходит на спектрофотометрическом детекторе при 658 нм. АКА-1000 не содержит металлических частей и полностью пригоден для использования даже с такими сложными коррозионно-активными реагентами, упомянутыми в двух последних приложениях.

Аминокислотный анализатор АКА-1000 компании Sevko и Со является полностью автоматизированным и единственным доступным на российском рынке готовым комплексным решением для анализа аминокислот в соответствии с ГФ РФ, ЕФ и АФ. Система полностью инертна и включает набор реактивов на 500 анализов, а также ионообменные колонки от производителя анализатора.

АКА-1000 является модульным жидкостным хроматографом из серии «Скорострел» и может быть использован как для других специализированных применений с постколоночной дериватизацией: анализа биогенных аминов, полиэфирных монокарбоксильных ионофорных антибиотиков, контраста для МРТ, так и для стандартных фармацевтических анализов методами обращено- и нормально-фазовой хроматографии по определению АФС и родственных примесей. Возможность создания двухканальной системы позволяет избежать рисков перекрестного загрязнения между разными типами анализов и в 2 раза сократить затрачиваемое на них время.

Модуль постколоночной дериватизации АРМ-1000Н(Т) является не только единственным доступным на российском рынке, но и вот уже более 12 лет используется совместно с хроматографами разных марок: Shimadzu, LicArt 62, Agilent, Knauer. При этом модуль предлагает не только классическую химическую дериватизацию, но и фотохимическую дериватизацию в рамках единого компактного решения.

11-12 СЕНТЯБРЯ 2025 г.

ОТЕЛЬ «СОКОЛЁНА»

г. Ярославль, ул. Институтская, 5/17



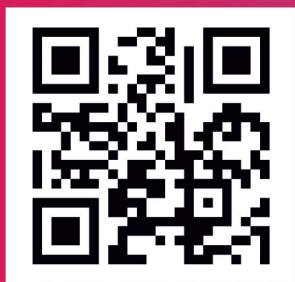
PharmaForum

Ярославский фармацевтический форум

Открытая площадка для обмена опытом
представителей фарм индустрии

ТЕМЫ ФОРУМА

- Отечественный научный потенциал как основа для разработки и исследования инновационных лекарственных препаратов
- Биоаналоги: Иммуноферментный анализ (ИФА) - иммуногенность и ФК
- Государственное регулирование и контроль качества производства и проведения клинических исследований
- Фармацевтический рынок ЕЭАС: проблематика, точки роста, новые вызовы.
- Инновации в клинических исследованиях лекарственных препаратов.
- Стратегии регистрации различных групп лекарственных препаратов в ЕАЭС



<https://yarpharmforum.ru/>

yar_conf@axct.ru

+7 (910) 975-67-77



Сириус
Научно-технологический
университет





Разработка и изучение растительной композиции для комплексной терапии гриппа А

А. Али Альшами¹, А. В. Панов¹, С. А. Кедик¹, Э. А. Амиргулова¹, Е. Н. Ветрова²,
Е. А. Доровских³, Т. Ю. Ковалева³✉

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет» (ПТУ МИРЭА). 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 78

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава РФ). 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ Контактное лицо: Ковалева Татьяна Юрьевна. E-mail: tatyana_kovaleva_75@inbox.ru

ORCID: А. Али Альшами – <https://orcid.org/0009-0007-6894-7507>;
А. В. Панов – <https://orcid.org/0000-0002-1603-143X>;
С. А. Кедик – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>;
Э. А. Амиргулова – <https://orcid.org/0009-0005-7938-3079>;
Е. Н. Ветрова – <https://orcid.org/0000-0003-1902-5278>;
Е. А. Доровских – <https://orcid.org/0000-0002-2741-1796>;
Т. Ю. Ковалева – <https://orcid.org/0000-0002-5961-9030>.

Статья поступила: 24.01.2025

Статья принята в печать: 23.06.2025

Статья опубликована: 27.06.2025

Резюме

Введение. Грипп типа А является социально значимым инфекционным заболеванием. Вариабельность вируса, мутации и реассортация затрудняют вакцинопрофилактику, требуется разработка новых лекарственных препаратов для специфической терапии, так как к имеющимся появилась устойчивость. Противовирусной активностью против вируса гриппа типа А обладает ряд растительных экстрактов, исследования в этой области актуальны. Также актуальна разработка лекарственного растительного сбора, как обладающего специфической противовирусной активностью, так и воздействующего на симптомокомплекс, сопровождающий данное заболевание.

Цель. Разработать лекарственный растительный сбор для специфического и симптоматического лечения гриппа типа А.

Материалы и методы. Рассмотрены 14 фармакопейных видов лекарственного растительного сырья и 3 растительные композиции на их основе. Исследования биологически активных веществ в сырье проводились по методикам Государственной фармакопеи РФ XV издания. Определение противовирусной активности проводили на культуре линии клеток почки собаки (MDCK) с использованием реакции гемагглютинации.

Результаты и обсуждение. Изучено количественное содержание основных групп БАВ (полисахариды, дубильные вещества, флавоноиды и аскорбиновая кислота) в 3 вариантах растительных композиций (сборы №№ 1, 2 и 3) и отварах на их основе. Установлен вариант растительной композиции с максимальным содержанием БАВ. Показана противовирусная активность против вируса гриппа А двух растительных композиций.

Заключение. Предложен состав лекарственного растительного сбора, перспективного для комплексной терапии гриппа, доказано его противовирусное действие против вируса гриппа типа А.

Ключевые слова: вирус гриппа А, полисахариды, флавоноиды, аскорбиновая кислота, дубильные вещества, противовирусное действие, реакция гемагглютинации

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

Вклад авторов. А. Али Альшами, Е. А. Доровских, Т. Ю. Ковалева провели количественное определение содержания БАВ в сборах и отварах. А. Али Альшами, Э. А. Амиргулова и Е. Н. Ветрова определили токсичность и противовирусную активность экстрактов. Т. Ю. Ковалева, А. В. Панов и С. А. Кедик провели статистическую обработку и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Али Альшами А., Панов А. В., Кедик С. А., Амиргилова Э. А., Ветрова Е. Н., Доровских Е. А., Ковалева Т. Ю. Разработка и изучение растительной композиции для комплексной терапии гриппа А. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):39–58. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2022>

The development and study of herbal composition for complex therapy of influenza A

Anas Ali Alshami¹, Aleksey V. Panov¹, Stanislav A. Kedik¹, Elza A. Amirgulova¹, Elizaveta N. Vetrova², Ekaterina A. Dorovskikh³, Tatyana Yu. Kovaleva³✉

¹ MIREA – Russian Technological University. 78, prospekt Vernadskogo, Moscow, 119571, Russia

² N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology. 18, Gamaleyi str., Moscow, 123098, Russia

³ I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Tatyana Yu. Kovaleva. **E-mail:** tatyana_kovaleva_75@inbox.ru

ORCID: Anas Ali Alshami – <https://orcid.org/0009-0007-6894-7507>;

Aleksey V. Panov – <https://orcid.org/0000-0002-1603-143X>;

Stanislav A. Kedik – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>;

Elza A. Amirgulova – <https://orcid.org/0009-0005-7938-3079>;

Elizaveta N. Vetrova – <https://orcid.org/0000-0003-1902-5278>;

Ekaterina A. Dorovskikh – <https://orcid.org/0000-0002-2741-1796>;

Tatyana Yu. Kovaleva – <https://orcid.org/0000-0002-5961-9030>.

Received: 24.01.2025

Accepted: 23.06.2025

Published: 27.06.2025

Abstract

Introduction. Influenza type A is a socially significant infectious disease. Viral variability, mutations and reassortment make vaccination difficult. New drugs for specific therapy need to be developed because resistance to the existing drugs has appeared. A number of plant extracts have antiviral activity against the influenza type A virus, research is relevant in this area. The development of a species is also relevant, which has both specific antiviral activity and affects the symptom complex accompanying this disease.

Aim. To develop a medicinal herbal collection for specific and symptomatic treatment of influenza type A.

Materials and methods. There were considered 14 pharmacopoeial types of medicinal plant raw materials and 3 herbal compositions based on them. The studies of biologically active substances in raw materials were carried out according to the methods of the State Pharmacopoeia of Russian Federation, 15th edition. Determination of antiviral activity was carried out on Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) culture using the hemagglutination reaction.

Results and discussion. There were studied the quantitative content of the main groups of biologically active substances (polysaccharides, tannins, flavonoids and ascorbic acid) in 3 variants of herbal compositions (collection No. 1, 2 and 3) and decoctions based on them. The variant of the herbal composition with the maximum content of biologically active substances was established. Antiviral activity against the influenza A virus of two herbal compositions was demonstrated.

Conclusion. The composition of the medicinal herbal collection is proposed, which is promising for complex therapy of influenza. The antiviral effect against the influenza virus type A has been proven.

Keywords: influenza A virus, polysaccharides, flavonoids, ascorbic acid, tannins, antiviral effect, hemagglutination reaction

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. Anas Ali Alshami, Ekaterina A. Dorovskikh, Tatyana Yu. Kovaleva conducted a quantitative determination of biologically active substances content in the species and decoctions. Anas Ali Alshami, Elza A. Amirgulova and Elizaveta N. Vetrova determined the toxicity and antiviral activity of the extracts. Tatyana Yu. Kovaleva, Aleksey V. Panov and Stanislav A. Kedik conducted statistical processing and interpretation of the results. All authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Ali Alshami A., Panov A. V., Kedik S. A., Amirgulova E. A., Vetrova E. N., Dorovskikh E. A., Kovaleva T. Yu. The development and study of herbal composition for complex therapy of influenza A. *Drug development & registration*. 2025;14(3):39–58. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2022>

ВВЕДЕНИЕ

Грипп типа А является самым распространенным инфекционным заболеванием человека, что свидетельствует о высокой социальной значимости этого заболевания. Влияние пандемий гриппа известно из истории 20 века, когда были описаны три крупные пандемии гриппа: испанский грипп H1N1 (1918), азиатский грипп H2N2 (1957) и гонконгский грипп H3N2 (1968). Испанский грипп считается крупнейшим в истории, число жертв оценивалось в 50 миллионов. В XXI веке были зарегистрированы две эпидемии птичьего и свиного гриппа. В 2003 году высоковирулентные штаммы вируса гриппа птиц H5N1 и H7N7 вызвали летальные случаи гриппа среди жителей Южной Азии. В 2009 свиной грипп (H1N1). По оценкам ВОЗ, в 2009 году случилось 18 449 смертей от вируса гриппа [1]. Недавно появились новые подтипы, такие как H7N7 и H7N2, H9N2, H7N9 [2–4]. Согласно данным ВОЗ, ежегодно регистрируется около 1 миллиарда случаев сезонного гриппа, в том числе 3–5 миллионов случаев тяжелой формы заболевания, а каждый год от респираторных патологий, вызванных вирусами гриппа, умирает от 290 000 до 650 000 человек¹.

Вирус гриппа – это оболочечный вирус, принадлежащий к семейству *Orthomyxoviridae*, роду *Alphainfluenzavirus* (гриппа А) [5]. Широкое распространение и высокий пандемический потенциал вируса гриппа А обусловлен его структурно-функциональными особенностями. Выделяют 2 основные особенности: (1) высокая частота ошибок вирусной РНК-полимеразы при репликации обеспечивает высокую генетическую вариабельность вируса гриппа (так называемый антигенный дрейф), (2) сегментированный геном вируса гриппа способствует реассортации (антигенный шифт). Данные особенности обеспечивают высокую адаптивную способность вируса гриппа А к разным хозяевам, а также феномен возникновения устойчивости вируса к применяемым противовирусным препаратам, в том числе вакцин против гриппа А. Поэтому поиск этиотропных комбинированных противовирусных препаратов остается актуальным на сегодняшний день. Грипп относится к одной из немногих вирусных инфекций, для которых применяют специфическую противовирусную терапию [6–9].

Лечение гриппа основано на применении: 1) терапевтических препаратов прямого действия – ингибиторов нейраминидазы (занамивира, озельтамивира фосфата); ранее также использовались амантадин и римантадин, направленные на трансмембранную область белка М2 вируса гриппа, однако у вирусов гриппа к ним уже сформировалась устойчивость; 2) индук-

торов интерферонов (арбидол, кагоцел, циклоферон и др.)² [10–12].

Несмотря на доступность этих препаратов, грипп продолжает наносить ущерб здоровью и благополучию человека, поскольку имеющиеся лекарственные препараты не обладают сильной противовирусной активностью против всех штаммов вируса гриппа; кроме того, часто появляются новые резистентные штаммы или возвращаются старые вирулентные штаммы [13, 14].

Поиск и разработка противовирусных препаратов против гриппа продолжается, несколько препаратов в настоящее время находятся на поздних стадиях клинических исследований, большинство из них отличаются по механизму действия от применяемых на практике препаратов [9].

Таким образом, актуальной задачей является поиск новых средств для лечения гриппа. Как показали отечественные и зарубежные исследования, растительные источники являются перспективными с этой точки зрения. У многих растительных экстрактов и индивидуальных биологически активных веществ, выделенных из растительного сырья, уже имеется доказанное противовирусное действие в отношении разнообразных вирусов, вызывающих болезни человека.

Например, установлена активность препаратов из плодов калины обыкновенной для профилактики и терапии инфекций вируса простого герпеса (ВПГ) [15]. Также изучалось противогерпетическое действие *in vivo* касталагина, соединения эллаготанина, полученного из дуба черешчатого. Было обнаружено, что касталагин оказывает мощное ингибирующее действие *in vitro* против вируса простого герпеса 1 и 2 типа [16]. Также исследования показали, что экстракты и индивидуальные соединения (татанан А, акориновая кислота, акорон, акорадин, акоронен, каламендиол и др., всего изучено 24 соединения) из корневищ аира обыкновенного могут бороться с различными вирусами: вирусом денге [17, 18], вирусом SARS-CoV-2 [19], вирусом простого герпеса (ВПГ), вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом гепатита В (ВГВ), что было доказано несколькими исследователями [20]. Тритерпеновые сапонины солодки уральской обладают хорошей ингибирующей активностью в отношении и энтеровируса 71 (EV71), и вируса Коксаки А16 (CVA16) [21, 22], и вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) [23, 24]. Эфирное масло травы тысячелистника обыкновенного эффективно против вируса SARS-CoV-2 и вируса болезни Ньюкасла [25, 26]. Была показана эффективность экстракта хвоща полевого против вирусов гриппа А (H1N1) [27].

¹ Грипп (сезонный). ВОЗ. Доступно по: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)). Ссылка активна на 12.01.2025.

² Грипп у взрослых. Доступно по: <https://diseases.medelement.com/disease/%D0%B3%D1%80%D0%B8%D0%BF%D0%BF-%D1%83-%D0%B2%D0%B7%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D1%8B%D1%85-%D0%BA%D0%BF-%D1%80%D1%84-2022/17526?ysclid=m5sfjvnelt564640007>. Ссылка активна на 12.01.2025.

Некоторые индивидуальные фенольные соединения – коричная кислота, кофейная кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота, *п*-кумаровая кислота, выделенные из листьев подорожника большого, – и водно-спиртовой и водный экстракты листьев подорожника большого показали ингибирующее действие на вирус простого герпеса 1 типа и аденовирусы человека (HAdV3, HAdV5 и HAdV7) [28–30]. Результаты некоторых исследований также показывают, что экстракты бессмертника песчаного обладают противовирусным действием как против вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1), так и против вируса парагриппа-3 (ПГ-3) [31]. Установлено, что молекула тимола, одного из основных компонентов эфирного масла тимьяна ползучего и душицы обыкновенной, обладает высокой биологической активностью против вируса – возбудителя COVID-19 [32]. Жидкий экстракт корней элеутерококка колючего также подавлял продуктивную репликацию риновируса человека (RV), респираторно-синцитиального вируса (PCV) и вируса гриппа А [33]. Сообщается, что крапива двудомная проявляет противовирусную активность в отношении ряда вирусов, включая вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус иммунодефицита кошек (ВИК) и ротавирус [34, 35]. Эфирное масло травы душицы обыкновенной оказывало ингибирующее действие на вирус желтой лихорадки, норовирус, мышинный норовирус и птичий корона-вирус (AvCov) [36–39]. Водные и водно-спиртовые экстракты из травы душицы обыкновенной обладают значительной противовирусной активностью против вируса артериита лошадей (ВАЛ) и вируса чумы собак (ВЧС) [40]. Комплекс эллаготанинов очищенного экстракта из соплодий ольхи серой обладает значи-

тельной анти-ВИЧ-активностью, эффективно подавляя репродукцию ВИЧ *in vitro* [41]. Плоды шиповника коричневого оказывают общеукрепляющее, тонизирующее (стимулируют основной обмен веществ) и противовоспалительное (усиливают фагоцитарную активность лейкоцитов) действие [42]. Поэтому их добавляют в запатентованные растительные противовирусные препараты [43, 44].

В мировой медицинской практике идет поиск видов лекарственных растений, комбинаций лекарственного растительного сырья для профилактики и лечения вируса гриппа, купирования сопутствующих симптомов, укрепления иммунитета и смягчения неблагоприятных побочных эффектов, связанных с токсичностью отдельных, принимаемых одновременно препаратов [45–48].

Лекарственные растительные сборы являются удобной формой применения, обладают целым рядом положительных свойств, главное из которых – комплексное воздействие на патогенез заболевания. На основе данных научной литературы нами были составлены 3 растительные композиции, характеризующиеся комплексным воздействием на организм больного гриппом и обладающие противовоспалительным, иммуномодулирующим, отхаркивающим и др. действием. Кроме того, некоторые компоненты обладают доказанным противовирусным действием на вирус гриппа А. В таблице 1 представлены виды лекарственного растительного сырья и их доказанная фармакологическая активность, актуальная для комплексного лечения гриппа А.

Актуальной задачей является изучение противовирусного действия на вирус гриппа А разработанных растительных комбинаций.

Таблица 1. Состав и фармакологическая активность компонентов растительных композиций

Table 1. Composition and pharmacological activity of herbal compositions components

Лекарственное растительное сырье Medicinal plant materials	Фармакологическое действие, актуальное в терапии гриппа А и предупреждении его осложнений Pharmacological action relevant in the treatment of influenza A and prevention of its complications	Литература References	Сбор № 1 Collection No. 1	Сбор № 2 Collection No. 2	Сбор № 3 Collection No. 3
Шиповника плоды Rose hips	Поливитаминное, желчегонное, иммуномодулирующее Multivitamin, choleretic, immunomodulatory	[50]	✓	✓	✓
Калины обыкновенной плоды Guelder-rose fruits	Противовирусное, антисептическое, иммуномодулирующее Antiviral, antiseptic, immunomodulatory	[51]	✓	✓	✓
Дуба кора Oak bark	Антисептическое, иммуномодулирующее Antiseptic, immunomodulatory	[52]	✓	✓	✓
Аира обыкновенного корневища Sweet flag rhizomes	Противовоспалительное, иммуномодулирующее Anti-inflammatory, immunomodulatory	[53]	✓	✓	✓

Окончание таблицы 1

Лекарственное растительное сырье Medicinal plant materials	Фармакологическое действие, актуальное в терапии гриппа А и предупреждении его осложнений Pharmacological action relevant in the treatment of influenza A and prevention of its complications	Литература References	Сбор № 1 Collection No. 1	Сбор № 2 Collection No. 2	Сбор № 3 Collection No. 3
Солодки корни Licorice roots	Противовоспалительное, отхаркивающее, иммуномодулирующее. Противовирусное против вируса гриппа А (H1N1) и (H5N1) Anti-inflammatory, expectorant, immunomodulatory. Antiviral against influenza A (H1N1) and (H5N1) virus	[23, 24, 54–56]	✓	✓	✓
Тысячелистника обыкновенного трава Common yarrow herb	Кровоостанавливающее. Противовирусное против вируса гриппа А (H3N2) и (H5N1) Hemostatic. Antiviral against influenza A (H3N2) and (H5N1) virus	[57, 58]	✓		
Хвоща полевого трава Field horsetail herb	Укрепляющее легочную ткань. Противовирусное против вируса гриппа А (H1N1) Strengthening lung tissue. Antiviral against influenza A (H1N1) virus	[27, 59]	✓	✓	✓
Подорожника большого листья Common plantain leaves	Противовоспалительное, отхаркивающее, кровоостанавливающее. Противовирусное против вируса гриппа А (H3N2) и (H5N1) Anti-inflammatory, expectorant, hemostatic. Antiviral against influenza A (H3N2) and (H5N1) virus	[58, 60, 61]	✓	✓	✓
Бессмертника песчаного цветки Yellow everlasting flowers	Желчегонное. Противовирусное против вируса парагриппа-3 (PI-3) = параинфлюэнца-3 Choleretic. Antiviral against parainfluenza virus-3 (PI-3) = parainfluenza-3	[31, 62]	✓	✓	✓
Тимьяна ползучего трава Creeping thyme herb	Отхаркивающее, антисептическое, противовоспалительное Expectorant, antiseptic, anti-inflammatory	[63]	✓		
Элеутерококка колючего корневища и корни Eleutherococcus senticosus rhizomes and roots	Адаптогенное, иммуномодулирующее. Противовирусное против вируса гриппа А (H1N1) Adaptogenic, immunomodulatory. Antiviral against influenza A virus (H1N1)	[33, 64]	✓	✓	✓
Крапивы двудомной листья Stinging nettle leaves	Укрепляющее легочную ткань, кровоостанавливающее Strengthening lung tissue, hemostatic	[65]		✓	✓
Душицы обыкновенной трава Oregano herb	Отхаркивающее, антисептическое, противовоспалительное. Противовирусное против вируса гриппа А (H1N1, H5N1 и H3N2) Expectorant, antiseptic, anti-inflammatory. Antiviral against influenza A virus (H1N1, H5N1 and H3N2)	[66–68]			✓
Ольхи соплодия Alder fruits	Антисептическое, иммуномодулирующее Antiseptic, immunomodulatory	[69]	✓	✓	✓

МАТЕРИАЛЫ

1. Объектами исследования служили 3 растительные композиции из 14 фармакопейных видов лекарственного растительного сырья (сборы №№ 1, 2 и 3) (таблица 1), составленные в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0020 «Сборы». Все сырье было приобретено в аптечной сети и соответствовало требованиям Государственной фармакопеи РФ XV издания (ГФ РФ XV) [49].

2. Штамм вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) получен из Государственной коллекции вирусов Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации. Вирус представлял собой аллантоисную жидкость куриных эмбрионов.

3. Для выполнения исследования использовали линию клеток почек собаки Madine-Darby Canine Kidney (MDCK). Линия клеток получена из Государственной коллекции клеточных культур ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (подразделение Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского).

4. Для культивирования клеток в эксперименте использовали питательную среду DMEM с глутамином и содержанием глюкозы 4,5 г/л (НПП «ПанЭко», Россия). Среда представляет собой прозрачную жидкость красноватого цвета, без опалесценции и осадка, содержащую антибиотики (100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина).

МЕТОДЫ

1. Определение содержания суммы флавоноидов проводили спектрофотометрически после реакции комплексообразования с раствором хлорида алюминия на приборе Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Визуализация результатов проводилась с помощью программного обеспечения UV-Vis scan.

2. Определение содержания дубильных веществ в пересчете на танин проводили перманганатометрическим титрованием по методике ОФС.1.5.3.0008 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах растительного происхождения».

3. Определение содержания аскорбиновой кислоты проводили титрованием водного извлечения 2,6-дихлорфенолиндофенолом натрия.

4. Определение содержания полисахаридов проводили гравиметрически после осаждения 95%-м этанолом из водного раствора.

5. Приготовление отвара. Отвар готовили по методике ОФС.1.4.1.0018 «Настои и отвары», соотношение сырья и экстрагента 1:10, с учетом коэффициента водопоглощения.

6. Пассивирование клеточной культуры. Удаление образовавшегося монослоя клеток со дна культурального флакона (НПП «ПанЭко», Россия) осуществляли ферментативным способом при помощи трипсина. Из матраса для выращивания культур слили среду и один раз промыли 1 мл раствора трипсина-версена (ООО «БиолоТ», Россия), предварительно нагретым до 37 °С. Далее клетки инкубировали в минимальном объеме раствора трипсина-версена в течение 10 мин при 37 °С. После инкубации встряхивали флакон до тех пор, пока клеточный монослой не перешел в состояние суспензии.

Затем проводили посев полученной суспензии в новую посуду (культуральный флакон, 96-луночный планшет) с добавлением свежей порции питательной среды DMEM (НПП «ПанЭко», Россия). Для обеспечения роста клеток в среду также добавляли 10%-ю телячью эмбриональную сыворотку (ТЭС) (HyClone, Thermo Fisher Scientific, США), антибиотики (100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина) и L-глутамин [70]. Рассеянную культуру клеток культивировали при 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂ до формирования конфлюэнтного монослоя.

7. Микроскопия клеточного монослоя. Визуальный контроль монослоя клеток проводили при помощи инвертированного микроскопа (Nikon Eclipse TS100), используя объективы 10х, 40х, 60х. Микроскопический анализ применяли для оценки состояния культуры, выявления цитопатического действия (ЦПД) и проверки на отсутствие контаминантов (бактерий и грибов) [71].

8. Анализ токсичности препаратов. Токсичность исследуемых растительных препаратов проверяли на культуре клеток MDCK. Для каждого рассматриваемых водных образцов готовили серию двукратных разведений в среде DMEM. Из лунок 96-луночного планшета (АО «Фирма Медполимер», Россия) со сформированным клеточным монослоем предварительно отбирали питательную среду, затем вносили приготовленные заранее разведения. В лунки, предназначенные для контроля (не менее 4 лунок), вносили по 100 мкл соответствующей среды для культивирования. Затем клетки инкубировали в течение 72 ч при 37 °С и 5%-го CO₂. Жизнеспособность клеток в присутствии исследуемых препаратов определяли по активности митохондриальных дегидрогеназ, способных восстанавливать желтый МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) (Sigma, Германия) в фиолетовые кристаллы формазана [72].

Спустя 72 ч инкубации клетки производили замену среды DMEM и вносили по 10 мкл стерильного раствора МТТ (концентрацией 5 мг/мл), разведенных в 1 мл среды для культивирования, и инкубировали при 37 °С и 5%-го CO₂ в течение 2 ч. По истечении данного времени из каждой лунки отбирали среду и добавляли по 100 мкл ДМСО. Смесь тщательно ресуспендировали до растворения кристаллов формазана. Затем проводили измерение оптической плот-

ности при длине волны 595 нм на планшетном спектрофотометре АИФР-01 УНИПЛАН (ЗАО «ПИКОН», Россия).

Значения концентраций, при которых оптическая плотность клеток в присутствии препаратов в 2 раза меньше оптической плотности контроля клеток без исследуемых водных препаратов, принимали за 50%-ю цитотоксическую концентрацию (CC_{50}). Разведения, вызывающие 50 % и менее гибели популяции клеток в сравнении с контролем, являются значимыми и рассматриваются в дальнейших опытах [73]. В результатах учитывали среднее значение 3 измерений $\pm$ стандартное отклонение.

9. Заражение клеток. В опыт брали 96-луночный планшет с 3-дневным монослоем клеток. Перед заражением вирусом гриппа А производили замену культуральной среды DMEM средой, содержащей 1 мкг/мл трипсина (Sigma-Aldrich, США). Затем вносили по 10 мкл аллантоисной жидкости, содержащей вирус, к клеткам, содержащим 100 мкл среды с трипсином, и титровали до 5 лунки включительно, производя 10-кратные разведения. На каждое разведение вируса брали не менее 4 лунок. Схематично эту процедуру можно представить следующим образом:

Исходный вирус $\rightarrow 10^{-1} \rightarrow 10^{-2} \rightarrow 10^{-3} \rightarrow 10^{-4} \rightarrow 10^{-5}$.

Контакт клеток с вирусом проводили в течение 2 ч при 37 °С в CO_2 -инкубаторе. Для культивирования вируса гриппа А использовали метод наращивания вируса в куриных эмбрионах. Множественность инфицирования клеточных культур в опытах составила 0,1–0,0001 TCID₅₀/клетка.

После проявления вирусной инфекции (24 ч при 37 °С для вируса гриппа) осуществляли мониторинг наличия цитопатического действия вируса (ЦПД) и определяли инфекционный титр вируса в опыте (в присутствии препаратов) и контроле (без препаратов, только вирус) по методу Рида и Менча. Инфекционный титр вируса выражали в цитопатогенной дозе, вызывающей гибель 50 % клеток монослоя (TCID₅₀) [75–78].

10. Реакция гемагглютинации. Активность вируса гриппа А устанавливали методом РГА. В основе реакции лежит способность некоторых вирусов агглютинировать (связывать) эритроциты при помощи поверхностных белков гемагглютининов.

Реакцию гемагглютинации ставили следующим образом: в лунки 96-луночного планшета добавляли 25 мкл раствора PBS, далее переносили по 25 мкл пробы образцов (пункт 9) и проводили титрование. После чего вносили равное количество 2%-й суспензии человеческих эритроцитов. Результаты реакции учитывали через 30–40 мин при температуре +4 °С. За титр вируса принимали величину, обратную разведению вирусной суспензии, при котором наблюдалась выраженная агглютинация эритроцитов [77, 78].

10.1. Приготовление фосфатно-буферного раствора. Фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS) готовили следующим образом: фосфатно-буферную таблетку (Sigma Chemical Co, Великобритания) добавляли в колбу с дистиллированной водой (200 мл). Колбу тщательно перемешивали до полного растворения фосфатной таблетки. В итоге получали раствор с концентрацией 0,01 М (pH $7,2 \pm 0,2$), который затем стерилизовали и хранили при температуре +40 °С.

10.2. Приготовление 2%-й суспензии человеческих эритроцитов. Для приготовления 2%-й суспензии человеческих эритроцитов в работе использовали цельную кровь 0 (I) группы, взятую в вакуумную пробирку с антикоагулянтом ЭДТА (Greiner Bio-One GmbH, Австрия), и проводили следующие действия: 2 мл осадка человеческих эритроцитов доводили раствором PBS (0,01М) до 10 мл, перемешивали 1–2 мин и центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения 1000 об/мин. Отмывку эритроцитов проводили 3 раза и далее суспензию использовали в реакции гемагглютинации (пункт 10).

11. Изучение противовирусной активности исследуемых растительных препаратов. Для определения противовирусной активности растительных препаратов исследуемые образцы в рабочей концентрации 12,5 мг/мл вносили спустя 2 ч после этапа заражения клеток (пункт 9). После инкубации растительных препаратов с зараженными клетками определяли инфекционный титр вируса.

Способность исследуемых водных образцов оказывать противовирусный эффект определяли по снижению титра вируса в зараженных клетках. Детекцию вируса гриппа А осуществляли методом РГА (пункт 10).

В качестве критерия противовирусной активности образцов используется разница между титрами вируса в контрольной и опытных группах $\Delta \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$, измеряемая в логарифмах.

В вирусологических исследованиях принято считать удовлетворительным противовирусный эффект при действии лекарственных средств, если:

$$\Delta \lg \text{TCID}_{50} \geq 2,0. \quad (1)$$

Противовирусный эффект исследуемых образцов *in vitro* оценивали по показателям 1, 3.

Снижение уровня накопления вируса под воздействием образца:

$$\Delta \lg \text{TCID}_{50} = A_k - A_o. \quad (2)$$

Индекс защиты, или коэффициент ингибирования (КИ), в процентах:

$$\text{КИ} = \frac{A_k - A_o}{A_k} \cdot 100 \%, \quad (3)$$

где A_k – контрольные значения ($\lg \text{TCID}_{50}$); A_o – опытные значения ($\lg \text{TCID}_{50}$).

При подавлении инфекционного титра вируса и $KI = 50 \%$, что означает защиту 50% клеток от действия вируса, данный препарат может использоваться для дальнейших доклинических исследований на животных. Концентрация, обеспечивающая $KI = 95\text{--}100 \%$, гарантирует полную защиту клеток культуры от воздействия вируса и может быть применена для изучения *in vivo* [79].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание биологически активных соединений в трех вариантах растительной композиции

Определение содержания биологически активных соединения (флавоноидов, полисахаридов, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты) в растительных композициях проводилось по методикам ГФ РФ XV, представленным выше.

Были получены спектры поглощения комплекса с хлоридом алюминия (рисунки 1 и 2). Поскольку максимумы поглощения были близки к максимуму комплекса рутина с хлоридом алюминия, то пересчет вели на рутин.

Получаемые результаты содержания БАС в трех растительных композициях представлены в таблице 2 и на рисунке 3.

Согласно полученным данным, среднее содержание флавоноидов, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты в сборе № 3 является наибольшим значением показателей по сравнению со сбором № 1 и сбором № 2. Это связано с тем, что он содержит траву душицы с относительно высоким количеством флавоноидов, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты. Но содержание полисахаридов в сборе № 2 выше, чем в сборе № 1 и сборе № 3. Это связано с тем, что он содержит листья крапивы, в которых содержание полисахаридов относительно высоко.

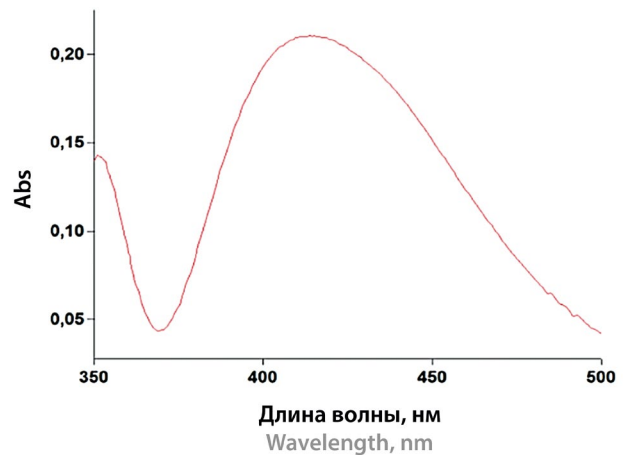


Рисунок 1. Спектр поглощения комплекса рутина с хлоридом алюминия

Figure 1. Absorption spectrum of the rutin complex with aluminum chloride

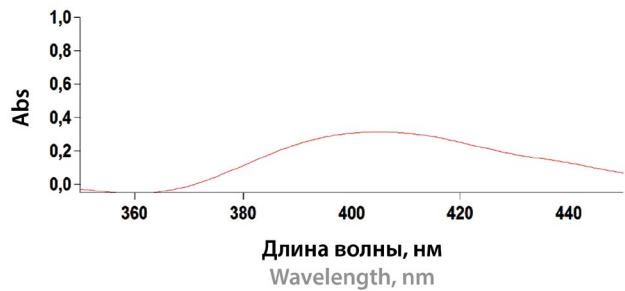


Рисунок 2. Спектр поглощения комплекса флавоноидов водно-спиртового извлечения (70%-й спирт)

Figure 2. Absorption spectrum of the flavonoid complex of hydroalcoholic extract (70 % alcohol)

Таблица 2. Содержание биологически активных веществ в растительных композициях (при $P = 0,95$, $t(95,4) = 2,78$)

Table 2. Content of biologically active substances in plant compositions ($P = 0.95$, $t(95.4) = 2.78$)

Биологически активные вещества Biologically active substances	Содержание, % Content, %		
	Сбор № 1 Collection No. 1	Сбор № 2 Collection No. 2	Сбор № 3 Collection No. 3
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин Total flavonoids in terms of rutin	$0,559 \pm 0,024$	$0,545 \pm 0,014$	$0,625 \pm 0,021$
Дубильные вещества в пересчете на танин Total tannins in terms of tannin	$3,27 \pm 0,16$	$3,33 \pm 0,10$	$3,65 \pm 0,12$
Полисахариды Polysaccharides	$4,02 \pm 0,15$	$6,11 \pm 0,30$	$5,99 \pm 0,22$
Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	$0,089 \pm 0,005$	$0,097 \pm 0,002$	$0,106 \pm 0,006$

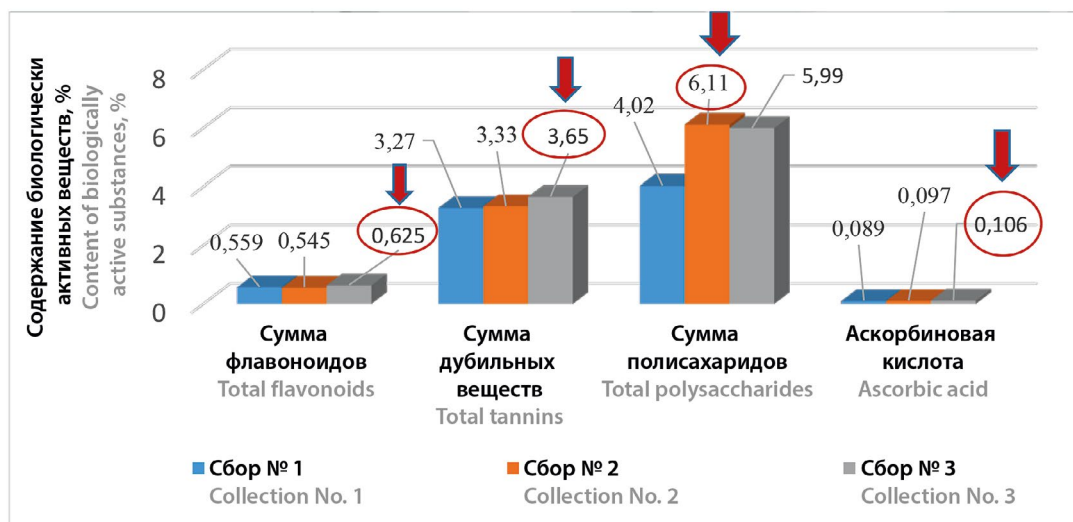


Рисунок 3. Содержание биологически активных веществ в растительных композициях

Figure 3. Content of biologically active substances in plant compositions

Содержание биологически активных веществ в отварах растительной композиции

Полученные водные извлечения оценивали по количественному содержанию дубильных веществ в пересчете на танин, суммы флавоноидов в пересчете на рутин, полисахаридов и аскорбиновой кислоты.

Определение содержания биологически активных соединений в отварах растительных композиций проводилось по методикам ГФ РФ XV, описанным выше.

Результаты определения биологически активных веществ представлены в таблице 3 и на рисунке 4.

На рисунке 4 представлены результаты, полученные при анализе отваров трех вариантов растительных композиций по всем исследованным показателям. Видно, что наибольшее содержание анализируемых веществ, за исключением флавоноидов, определено в отваре сбора № 3. Больше содержание флавоноидов в отваре первой растительной композиции, вероятно, обусловлено их качественным составом, преобладанием растворимых в воде.

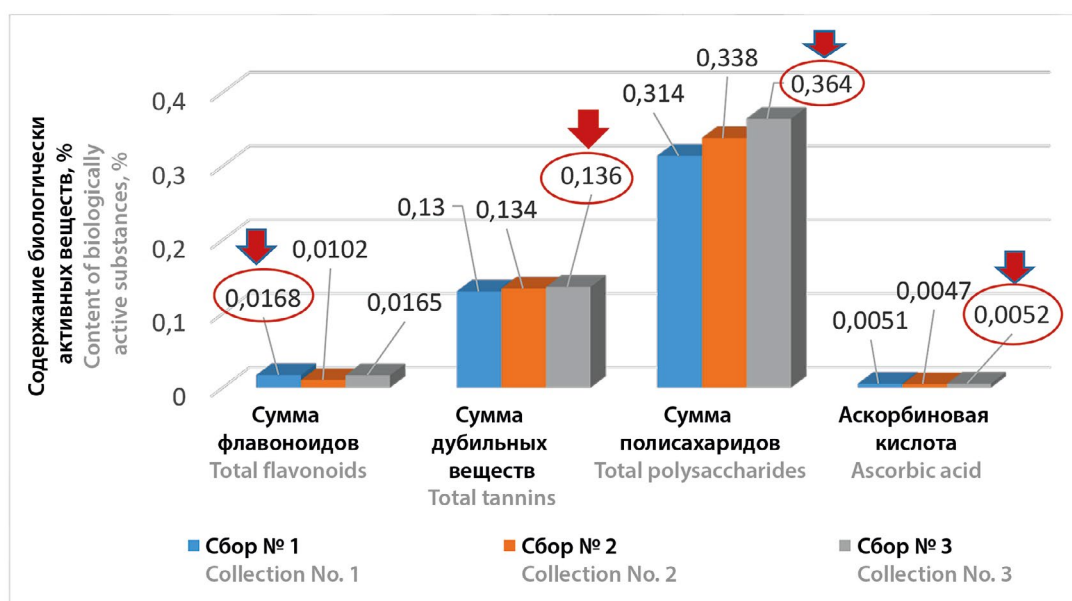


Рисунок 4. Содержание биологически активных веществ в отварах растительных композиций

Figure 4. Content of biologically active substances in decoctions of herbal compositions

Таблица 3. Содержание биологически активных веществ в отварах растительных композиций (при $P = 0,95$, $t(95,4) = 2,78$)

Table 3. Content of biologically active substances in decoctions of herbal compositions ($P = 0.95$, $t(95.4) = 2.78$)

Биологически активные вещества Biologically active substances	Содержание, % Content, %		
	Сбор № 1 Collection No. 1	Сбор № 2 Collection No. 2	Сбор № 3 Collection No. 3
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин Total flavonoids in terms of rutin	0,0168 ± 0,0008	0,0102 ± 0,0005	0,0165 ± 0,0006
Дубильные вещества в пересчете на танин Total tannins in terms of tannin	0,130 ± 0,007	0,134 ± 0,007	0,136 ± 0,004
Полисахариды Polysaccharides	0,314 ± 0,009	0,338 ± 0,009	0,364 ± 0,016
Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	0,0051 ± 0,0004	0,0047 ± 0,0002	0,0052 ± 0,0004

Оценка цитотоксичности
исследуемых растительных препаратов
на клеточной линии MDCK

Анализ цитотоксичности растительных препаратов в концентрациях 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 мг/мл проводили при помощи МТТ-теста и микроскопии клеточной культуры.

В культуре клеток MDCK исследуемые растительные препараты по результатам МТТ-теста показали

некие цитотоксические действия при больших концентрациях: от 100 мг/мл до 50 мг/мл (гибель клеток более 50 %). При концентрации растительных препаратов 25 мг/мл и ниже наблюдалось увеличение процента жизнеспособности клеток. По полученным данным рассчитывали процент жизнеспособности клеток в сравнении с контролем, результаты представлены в таблице 4 и на рисунке 5, показания оптической плотности приведены в таблице 5.

Таблица 4. Исследование цитотоксичности растительных препаратов в различных концентрациях на культуре клеток MDCK

Table 4. The study of cytotoxicity of herbal drugs in different concentrations on MDCK

Концентрация, мг/мл Concentration, mg/ml	Процент жизнеспособности, % Viability percentage, %			Контроль клеток Cell control
	Сбор № 1 Collection No. 1	Сбор № 2 Collection No. 2	Сбор № 3 Collection No. 3	
100	26,0 ± 6,9	25,0 ± 7,4	26,3 ± 4,6	100
50	47,9 ± 10,0	35,9 ± 4,8	42,0 ± 16,7	
25	66,9 ± 6,2	54,1 ± 7,1	63,2 ± 8,2	
12,5	75,3 ± 1,00	70,9 ± 10,1	77,4 ± 3,1	
6,25	84,6 ± 8,2	80,7 ± 7,8	87,5 ± 2,3	
3,125	91,9 ± 4,5	95,6 ± 3,0	93,6 ± 3,7	

Таблица 5. Исследование цитотоксичности растительных препаратов в различных концентрациях на культуре клеток MDCK

Table 5. The study of cytotoxicity of herbal drugs in different concentrations on MDCK

Концентрация, мг/мл Concentration, mg/ml	Оптическая плотность Optical Density			Контроль клеток Cell control
	Сбор № 1 Collection No. 1	Сбор № 2 Collection No. 2	Сбор № 3 Collection No. 3	
100	0,262 ± 0,069	0,252 ± 0,074	0,265 ± 0,047	1,008
50	0,483 ± 0,101	0,362 ± 0,048	0,424 ± 0,168	
25	0,675 ± 0,062	0,545 ± 0,071	0,637 ± 0,082	
12,5	0,759 ± 0,010	0,715 ± 0,102	0,780 ± 0,030	
6,25	0,853 ± 0,083	0,813 ± 0,079	0,882 ± 0,023	
3,125	0,926 ± 0,045	0,967 ± 0,031	0,943 ± 0,037	

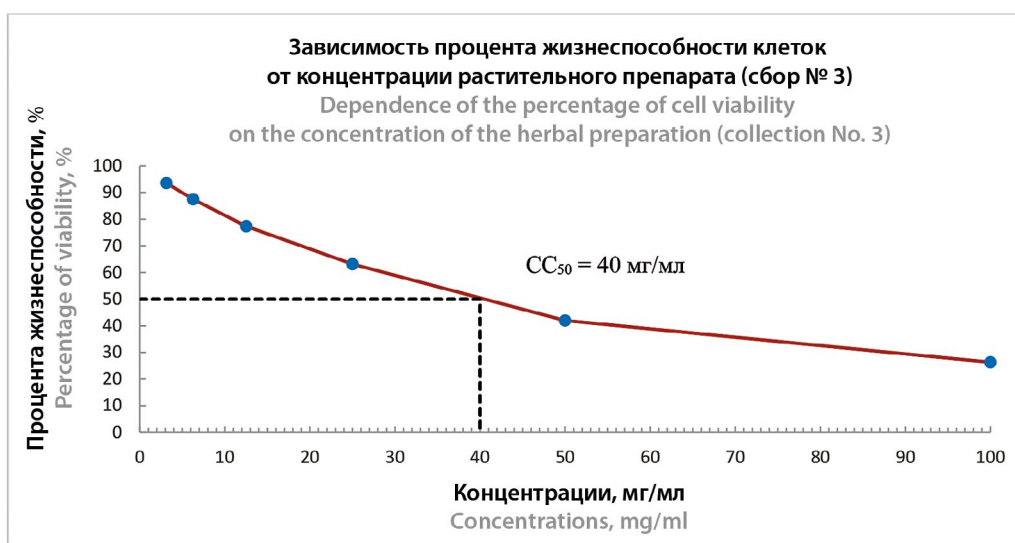
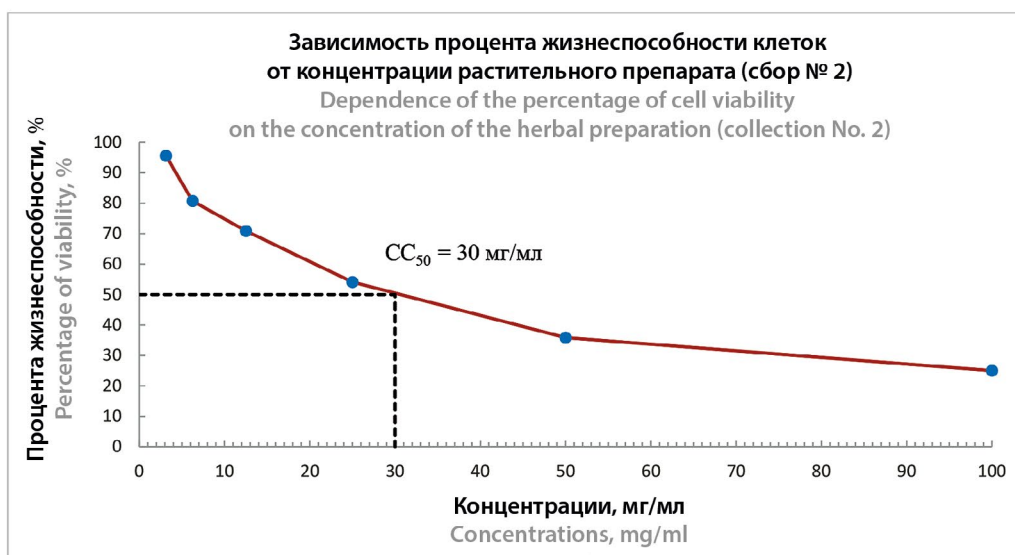
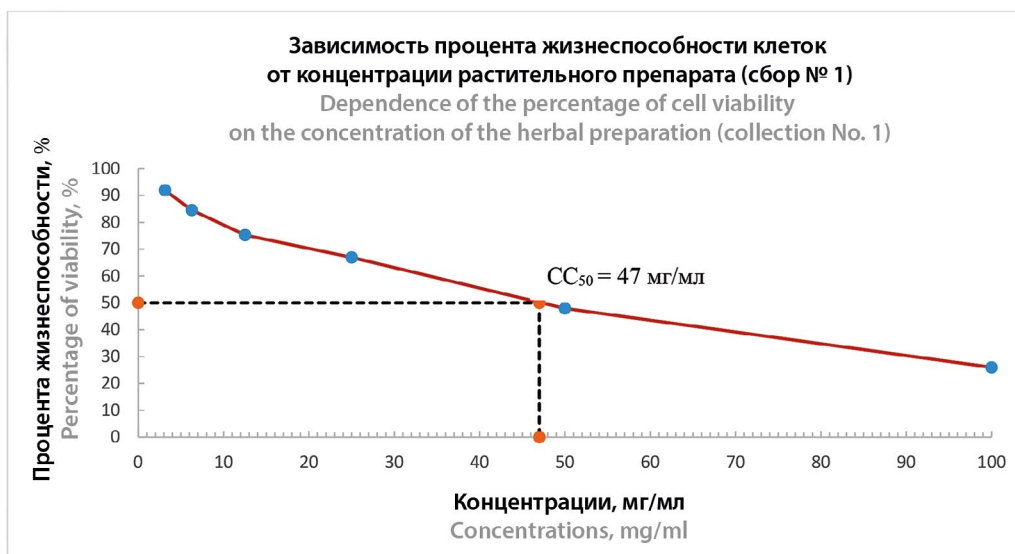


Рисунок 5. Кривые нахождения цитотоксических концентраций растительных препаратов по методу МТТ-теста
Figure 5. Courbe for finding cytotoxic concentrations of herbal drugs using the MTT test method

Таблица 6. Концентрация CC_{50} исследуемых растительных препаратов для клеточной культуры MDCK

Table 6. CC_{50} concentration of the studied herbal drugs for MDCK cell culture

Исследуемые препараты Investigational drugs	График Schedule	R^2	CC_{50} , мг/мл CC_{50} , mg/ml
Сбор № 1 Collection No. 1	$y = 91,7e^{-0,013x}$	0,997	47
Сбор № 2 Collection No. 2	$y = -20,78 \ln(x) + 120,06$	0,994	30
Сбор № 3 Collection No. 3	$y = -20,08 \ln(x) + 122,68$	0,967	40

Для исследуемых препаратов были рассчитаны цитотоксические концентрации CC_{50} , которые находились в пределах от 50 мг/мл до 25 мг/мл.

Концентрации CC_{50} рассчитывали, используя математическую модель для разведений каждого водного образца (таблица 6). Соотношение цитотоксических концентраций представлено в таблице 6.

Сбор № 2 имеет наименьшую концентрацию CC_{50} и, соответственно, большую токсичность среди рассматриваемых водных образцов. Предположительно, большая токсичность сбора № 2 в сравнении с остальными водными извлечениями при исследовании в культуре клеток MDCK связана с преобладанием листьев крапивы двудомной, содержащей комплекс активных веществ: дубильные вещества, фитонциды и сапонины, способные легче проникать через клеточную мембрану. Сбор № 1 не содержит листьев крапивы двудомной и обладает меньшей токсичностью из всех исследуемых образцов. Сбор № 3 включает траву душицы, которая, вероятно, может уменьшить воздействие крапивы на клетки MDCK.

Также жизнеспособность клеточной линии MDCK была оценена методом световой микроскопии. Ниже представлены микроскопические наблюдения для сбора № 2 (рисунок 6). Сбор № 1 и сбор № 3 продемонстрировали сходные результаты. Высокие концентрации препаратов оказывали сильное воздействие на клетки, вызывая морфологические изменения в сравнении с контрольными клетками. Эти изменения включали: пикноз клеточного ядра, изменение формы клеток – контрольные клетки (к.к) имеют полигональную форму, а при концентрации 100 мг/мл становятся более набухшими и сморщенными, теряют межклеточный контакт. При концентрациях 50 и 25 мг/мл наблюдается полигональная форма клеток, однако клеточный контакт также нарушен. При воздействии препарата в концентрации 12,5 мг/мл клетки растут вплотную друг к другу и сохраняют полигональную форму. Следовательно, выбор данной концентрации в качестве рабочей концентрации препаратов оказался целесообразным при последующих опытах.

Таким образом, результаты, полученные при микроскопической оценке морфологии клеток, полностью коррелируют с показаниями МТТ-теста.

Оценка противовирусных свойств исследуемых растительных препаратов

Для оценки противовирусных свойств исследуемые препараты в концентрации 12,5 мг/мл, являющейся нетоксической для клеточной линии MDCK, инкубировали с вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) после заражения клеток через 2 ч с инфекционным титром 5,0 lg TCID₅₀, после чего оценивали падение инфекционного титра вируса по формулам (1) и (3).

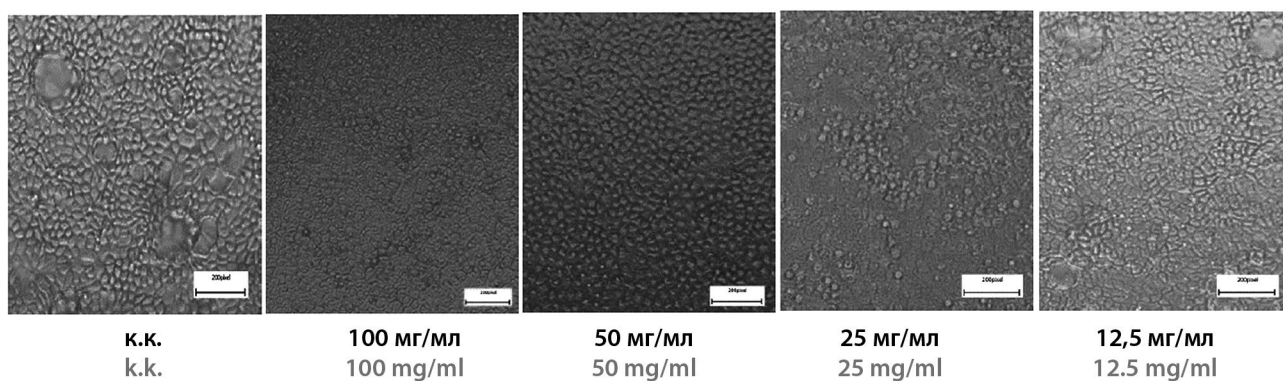
Сборы № 2 и № 3 проявили способность подавлять цитопатическое действие вируса гриппа А в культуре клеток MDCK на 30 % (КИ = 30 %), сбор № 1 – на 10 % (КИ = 10 %) при концентрации 12,5 мг/мл (таблица 7).

Таблица 7. Противовирусная активность исследуемых растительных препаратов в культуре клеток MDCK

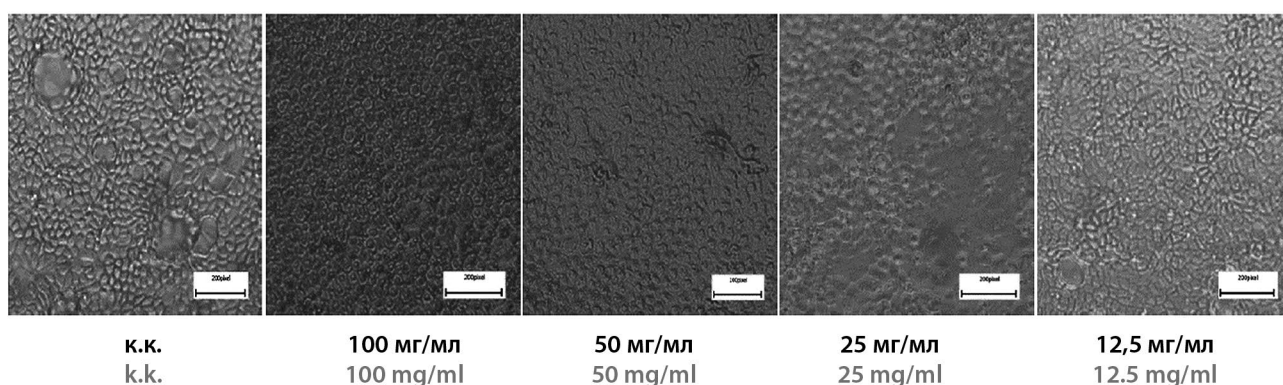
Table 7. Antiviral activity of the studied herbal drugs in MDCK cell culture

Исследуемые препараты Investigational drugs	Концентрация препаратов, мг/мл Concentration of drugs, mg/ml	Инфекционный титр вируса lg TCID ₅₀ Infectious titer of the virus lg TCID ₅₀	Подавление инфекционного титра Δlg TCID ₅₀ Suppression of infectious titer Δlg TCID ₅₀	КИ, % CI, %
Сбор № 1 Collection No. 1	12,5	4,5	0,5	10,0
Сбор № 2 Collection No. 2	12,5	3,5	1,5	30,0
Сбор № 3 Collection No. 3	12,5	3,5	1,5	30,0
Контроль вируса Virus control		5	–	–

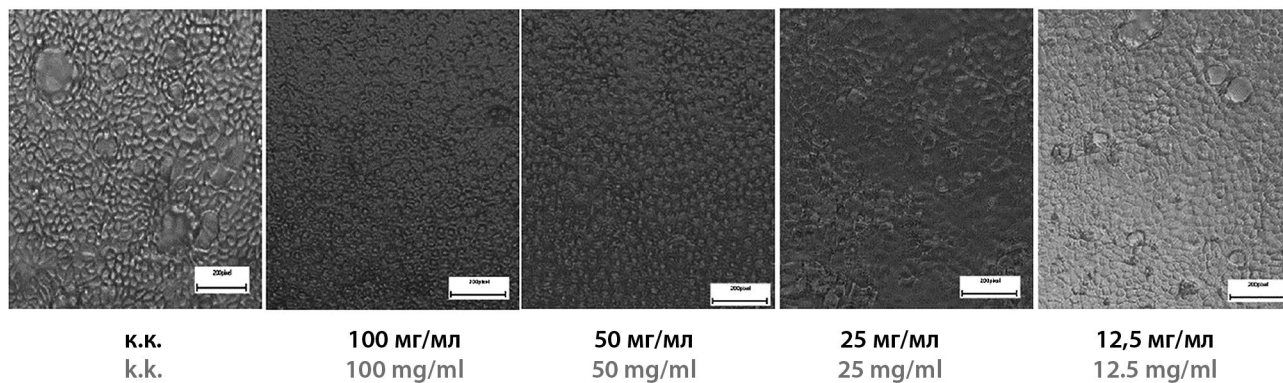
Соответственно, препараты с преобладанием листьев крапивы двудомной обладали большей биологической активностью на клеточную линию MDCK. Рассматриваемые препараты представляют собой отвары, подвергающиеся более термодлительному нагреванию, что может повлиять на проявление био-



Сбор № 1
Collection No. 1



Сбор № 2
Collection No. 2



Сбор № 3
Collection No. 3

Рисунок 6. Клетки MDCK в присутствии растительных препаратов спустя 72 часа инкубации

Figure 6. MDCK cells in the presence of plant drugs after 72 hours of incubation

логических свойств сбора № 1, многие активные соединения, содержащиеся в травах тимьяна ползучего и тысячелистника обыкновенного, улетучиваются ввиду такой обработки препарата. В связи с этим возможен более щадящий способ извлечения компонентов, например настаивание. Для увеличе-

ния эффективности действия препаратов необходимо также более детальное изучение лекарственных растений, применяемых во всех исследуемых препаратах, и исключение тех, которые могут уменьшить биологическое действие активных соединений растений.

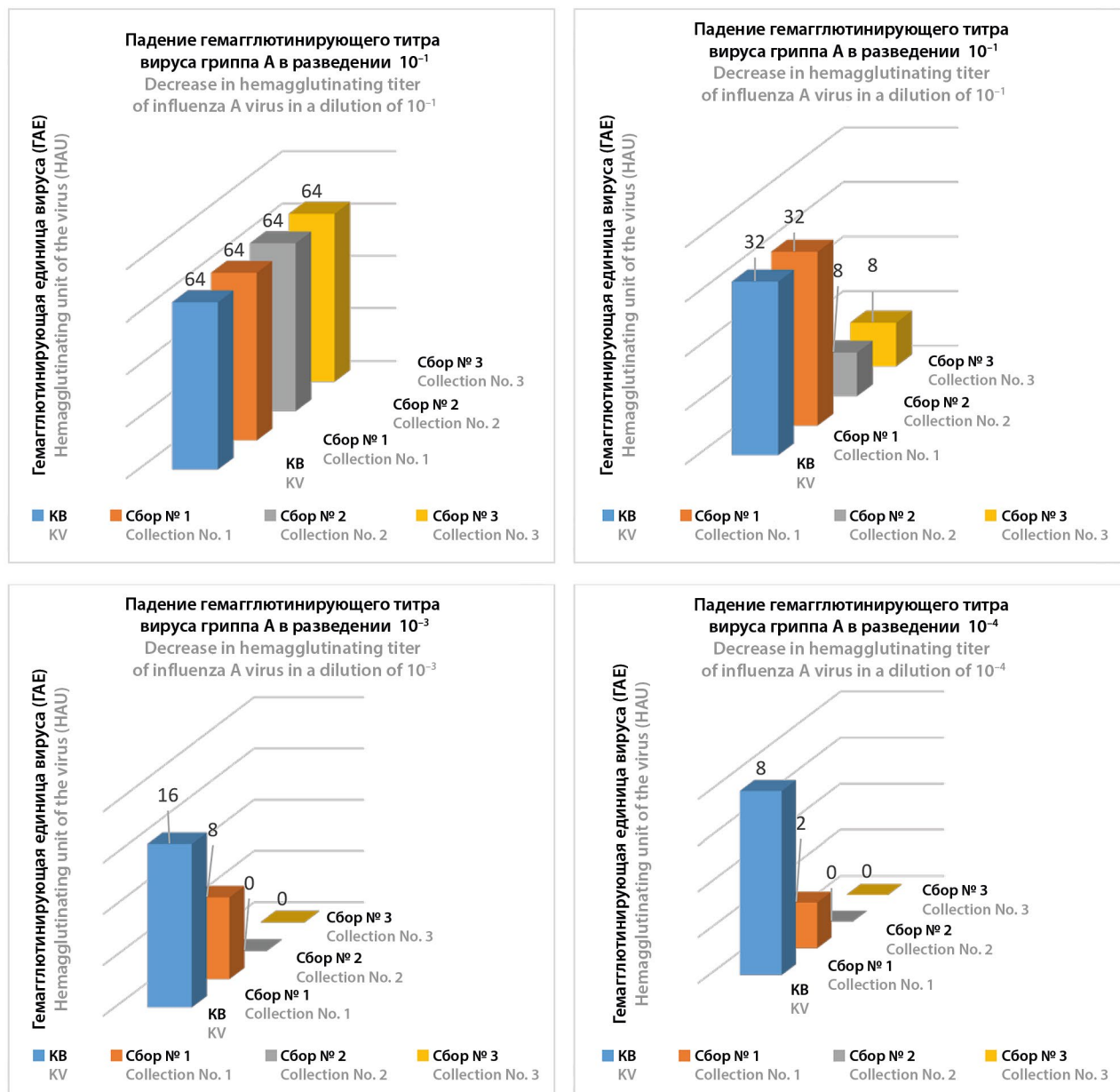


Рисунок 7. Сравнение гемагглютинирующих титров вируса гриппа А в присутствии исследуемых растительных препаратов

Figure 7. Comparison of hemagglutinating titers of influenza A virus in the presence of the studied herbal drugs

Активность вируса гриппа А в присутствии исследуемых препаратов также определяли с помощью реакции гемагглютинации. Показания гемагглютинирующих титров вируса представлены на рисунке 7.

В самом низком разведении (10^{-1}) гемагглютинирующий титр вируса составил 64 ГАЕ, снижения активности вируса препаратами не наблюдалось. В разведении 10^{-2} титр исходного вируса составил 32 ГАЕ, наблюдалось ингибирование действия вируса гриппа А растительными препаратами (сборы № 2 и 3), гемагглютинирующие титры составили 8 ГАЕ. Гемагглютинирующая активность вируса гриппа А была полностью подавлена водными препа-

ратами (сборы № 2 и 3) при исходных титрах контрольного вируса 16 и 8 ГАЕ в разведениях 10^{-3} и 10^{-4} соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа данных научной литературы предложены составы трех растительных композиций, включающих 14 фармакопейных видов лекарственного растительного сырья (плоды шиповника, плоды калины обыкновенной, кора дуба, корневища аира обыкновенного, корни солодки, трава тысячелистника обыкновенного, трава хвоща полевого,

листья подорожника большого, цветки бессмертника песчаного, трава тимьяна ползучего, корневища и корни элеутерококка колючего, листья крапивы двудомной, трава душицы обыкновенной, соплодия ольхи серой), для комплексной терапии гриппа. Проведено сравнительное изучение данных композиций и их отваров по содержанию флавоноидов, дубильных веществ, полисахаридов и аскорбиновой кислоты. Установлено, что составы №№ 2 и 3 и их отвары содержат больше данных БАВ. Изучено противовирусное действие против вируса гриппа типа А отваров трех разработанных составов. Установлено наличие противовирусного действия, при этом оно коррелирует с процентным содержанием БАВ в отварах. Хотя определенные соединения этих растений (дубильные вещества, флавоноиды), по данным литературы, могут обуславливать это действие, вполне вероятно, что терапевтический эффект является результатом их синергического действия, которое может быть дополнено уже не специфическим противовирусным действием, а противовоспалительным, иммуномодулирующим и прочим влиянием на макроорганизм полисахаридов и аскорбиновой кислоты. Несмотря на слабые противовирусные свойства растительного препарата, он будет эффективен в комплексной терапии вируса гриппа А.

ЛИТЕРАТУРА

- Chernyshova A.I., Zhirnov O.P. Two Phylogenetic Cohorts of the Nucleocapsid Protein NP and Their Correlation with the Host Range of Influenza A Viruses. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2024;516:93–97. DOI: 10.1134/S1607672924700789.
- Krejcová L., Michalek P., Hynek D., Adam V., Kizek R. Structure of influenza viruses, connected with influenza life cycle. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2015;2(1):13–19.
- Lina B. History of influenza pandemics. In: Raoult D., Drancourt M., editors. *Paleomicrobiology. Past Human Infections*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2008. P. 199–211. DOI: 10.1007/978-3-540-75855-6_12.
- Wu Z.-Q., Zhang Y., Zhao N., Yu Z., Pan H., Chan T.-C., Zhang Z.-R., Liu S.-L. Comparative Epidemiology of Human Fatal Infections with Novel, High (H5N6 and H5N1) and Low (H7N9 and H9N2) Pathogenicity Avian Influenza A Viruses. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017;14(3):263. DOI: 10.3390/ijerph14030263.
- Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Alfenas-Zerbini P., Dempsey D.M., Dutilh B.E., García M.L., Hendrickson R.C., Junglen S., Krupovic M., Kuhn J.H., Lambert A.J., Łobocka M., Oksanen H.M., Orton R.J., Robertson D.L., Rubino L., Sabanadzovic S., Simmonds P., Smith D.B., Suzuki N., Van Doorslaer K., Vandamme A.-M., Varsani A., Zerbini F.M. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Archives of Virology*. 2022;167(11):2429–2440. DOI: 10.1007/s00705-022-05516-5.
- Saunders-Hastings P., Krewski D. Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens*. 2016;5(4):66. DOI: 10.3390/pathogens5040066.
- Treanor J.J. Influenza viruses. In: Kaslow R.A., Stanberry L.R., Powers A.M., editors. *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*. New York: Springer US; 2023. P. 1–57.
- Woźniak-Kosek A., Kempieńska-Mirośławska B., Hoser G. Detection of the influenza virus yesterday and now. *Acta Biochimica Polonica*. 2014;61(3):465–470.
- Васин А. В. Новые подходы к разработке средств диагностики и химиотерапии гриппа с использованием геномных и постгеномных технологий. Дис. ... док. биол. наук. Санкт-Петербург; 2018. 38 с. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/novye-podkhody-k-razrabotke-sredstv-diagnostics-i-khimioterapii-grippa-s-ispolzovaniem-genom-i-postgenomnykh-tehnologiy>. Ссылка активна на 12.01.2025.
- Mehrbod P., Abdalla M.A., Njoya E.M., Ahmed A.S., Foutouhi F., Farahmand B., Gado D.A., Tabatabaian M., Fasanmi O.G., Eloff J.N., McGaw L.J., Fasina F.O. South African medicinal plant extracts active against influenza A virus. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018;18(1):112. DOI: 10.1186/s12906-018-2184-y.
- Mousa H.A.-L. Prevention and Treatment of Influenza, Influenza-Like Illness, and Common Cold by Herbal, Complementary, and Natural Therapies. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2017;22(1):166–174. DOI: 10.1177/2156587216641831.
- Kim Y., Narayanan S., Chang K.-O. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Research*. 2010;88(2):227–235. DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.08.016.
- Oriola A.O., Oyedele A.O. Essential Oils and Their Compounds as Potential Anti-Influenza Agents. *Molecules*. 2022;27(22):7797. DOI: 10.3390/molecules27227797.
- Takashita E. Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2021;11(5):a038687. DOI: 10.1101/cshperspect.a038687.
- Lipkowski A., Litwińska B. The use of viburnum opulus or its tissues or products thereof for the prevention or treatment of herpes virus infections. Patent № WO2012091589A1. 05.07.2012. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2012091589A1/da>. Accessed: 12.01.2025.
- Stoyanova A., Popatanasov A., Rashev V., Tancheva L., Quideau S., Galabov A.S. Effect of castalagin against HSV-1 infection in newborn mice. *Natural Product Research*. 2023;37(24):4156–4161. DOI: 10.1080/14786419.2023.2173191.
- Yao X., Ling Y., Guo S., Wu W., He S., Zhang Q., Zou M., Nandakumar K.S., Chen X., Liu S. Tatanan A from the *Acorus calamus* L. root inhibited dengue virus proliferation and infections. *Phytomedicine*. 2018;42:258–267. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.03.018.
- Tribudi Y.A., Agustini A.T., Setyaningtyas D.E., Gusmalawati D. Bioactive Compound Profile and Biological Modeling Reveals the Potential Role of Purified Methanolic Extract of Sweet Flag (*Acorus calamus* L.) in Inhibiting the Dengue Virus (DENV) NS3 Protease-Helicase. *Indonesian Journal of Chemistry*. 2022;22(2):331–341. DOI: 10.22146/ijc.68317.
- Huang Y., Li Z., Ma Y., Wu Q., Kong J., Zhao L., Li S., Li J. Screening for Active Compounds of *Acorus calamus* against SARS-CoV-2 Viral Protease and Mecha-

- nism Prediction. *Pharmaceuticals*. 2024;17(3):325. DOI: 10.3390/ph17030325.
20. Joshi S. V., Gupta S., Tripathi K., Mishra S., Kumar S. Antiviral plants of India. Cuttack: APRF Publisher; 2024.
21. Wang J., Chen X., Wang W., Zhang Y., Yang Z., Jin Y., Ge H. M., Li E., Yang G. Glycyrrhizic acid as the antiviral component of Glycyrrhiza uralensis Fisch. against coxsackievirus A16 and enterovirus 71 of hand foot and mouth disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;147(1):114–121. DOI: 10.1016/j.jep.2013.02.017.
22. Kuo K.-K., Chang J.-S., Wang K.-C., Chiang L.-C. Water extract of Glycyrrhiza uralensis inhibited enterovirus 71 in a human foreskin fibroblast cell line. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2009;37(2):383–394. DOI: 10.1142/S0192415X09006904.
23. Song W., Si L., Ji S., Wang H., Fang X.-M., Yu L.-Y., Li R.-Y., Liang L.-N., Zhou D., Ye M. Ursaponins M-Y, antiviral triterpenoid saponins from the roots of Glycyrrhiza uralensis. *Journal of Natural Products*. 2014;77(7):1632–1643. DOI: 10.1021/np500253m.
24. Li Z., Dong M., Chen Z., Zhang C., Jiang J., Liu M., Cui Q. Combining virus-based affinity ultrafiltration method with serum pharmacokinetics to identify the antiviral pharmacodynamic substances in licorice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2025;338(Part 1):118978. DOI: 10.1016/j.jep.2024.118978.
25. Angourani H. R., Zare A., Moghadam M. M., Ramazani A., Mastinu A. Investigation on the Essential Oils of the Achillea Species: From Chemical Analysis to the In Silico Uptake against SARS-CoV-2 Main Protease. *Life*. 2023;13(2):378. DOI: 10.3390/life13020378.
26. Rezatofighi S. E., Seydabadi A., Seyyed Nejad S. M. Evaluating the Efficacy of Achillea millefolium and Thymus vulgaris Extracts Against Newcastle Disease Virus in Ovo. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014;7(2):e9016. DOI: 10.5812/jjm.9016.
27. Moradi M.-T., Karimi A., Lorigooini Z., Pourgheysari B., Alidadi S., Hashemi L. In vitro anti influenza virus activity, antioxidant potential and total phenolic content of twelve Iranian medicinal plants. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2017;21(4):843–851. DOI: 10.12991/mpj.2017.10.
28. Chiang L.-C., Chiang W., Chang M.-Y., Ng L.-T., Lin C.-C. Antiviral activity of Plantago major extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research*. 2002;55(1):53–62. DOI: 10.1016/S0166-3542(02)00007-4.
29. Chiang L.-C., Chiang W., Chang M.-Y., Lin C.-C. In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of Plantago major and Plantago asiatica. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2003;31(2):225–234. DOI: 10.1142/S0192415X03000874.
30. Povnitsa O., Bilyavska L., Pankivska Yu., Likhanov A., Dorovskiy A., Lysenko V., Lokshin M., Zahorodnia S. In vitro Antiviral Activity of Leaf Extracts Plantago major, Plantago lanceolata, Rubus idaeus. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2022;1(1):49–62. DOI: 10.15407/microbiolj84.01.044.
31. Kutluk I., Aslan M., Orhan I. E., Özçelik B. Antibacterial, antifungal and antiviral bioactivities of selected Helichrysum species. *South African Journal of Botany*. 2018;119:252–257. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.09.009.
32. Kaya S., Erkan S., Karakaş D. Investigation of the Effect of Main Components of Wild Thyme on Covid-19 by Computational Methods. *Cumhuriyet Science Journal*. 2023;44(4):665–670. DOI: 10.17776/csj.1328641.
33. Glatthaar-Saalmüller B., Sacher F., Esperester A. Antiviral activity of an extract derived from roots of Eleutherococcus senticosus. *Antiviral Research*. 2001;50(3):223–228. DOI: 10.1016/S0166-3542(01)00143-7.
34. Knipping K., Garssen J., van't Land B. An evaluation of the inhibitory effects against rotavirus infection of edible plant extracts. *Virology Journal*. 2012;9:137. DOI: 10.1186/1743-422X-9-137.
35. Uncini Manganelli R. E., Zaccaro L., Tomei P. E. Antiviral activity in vitro of Urtica dioica L., Parietaria diffusa M. et K. and Sambucus nigra L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;98(3):323–327. DOI: 10.1016/j.jep.2005.01.021.
36. Meneses Lopez R., Ocazonez R. E., Martinez J. R., Stashenko E. E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2009;8:8. DOI: 10.1186/1476-0711-8-8.
37. Gilling D. H., Kitajima M., Torrey J. R., Bright K. R. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology*. 2014;116(5):1149–1163. DOI: 10.1111/jam.12453.
38. Sánchez G., Aznar R. Evaluation of Natural Compounds of Plant Origin for Inactivation of Enteric Viruses. *Food and Environmental Virology*. 2015;7:183–187. DOI: 10.1007/s12560-015-9181-9.
39. Okino C. H., Melito G. R., de Almeida Astolfo M. E., Da Mata Martins M. E., Junior S. B., Ferreira M. D. Antiviral Effect of Different Essential Oils on Avian Coronavirus. *Avian Diseases*. 2024;68(3):254–258. DOI: 10.1637/aviandiseases-D-24-00015.
40. Blank D. E., de Oliveira Hübner S., Alves G. H., Lima Cardoso C. A., Freitag R. A., Cleff M. B. Chemical composition and antiviral effect of extracts of Origanum vulgare. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2019;10(7):188–196. DOI: 10.4236/abb.2019.107014.
41. Trokhymchuk T. Yu., Shalamay A. S., Zavelevich M. P., Palchykovska L. G., Vasylenko O. V., Rybalko S. L., Starosyl D. B., Diadiun S. T. Anti-HIV activity of ellagitannins from alder tree fruits. *Biopolymers and Cell*. 2018;34(3):218–228. DOI: 10.7124/bc.00097C.
42. Гончарова О. В. Фитотерапия в профилактике ОРВИ у детей. *Практика педиатра*. 2011;5:39–43.
43. Плетнёв В. В. Капли Плетнева, обладающие противовирусным и иммуномодулирующим эффектами. Патент РФ на изобретение № RU2553308C1. 10.06.2015. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2553308C1/ru>. Ссылка активна на 12.01.2025.
44. Печеневский А. В., Печеневский А. А., Косенко Н. В., Северцев В. А. Сбор лекарственных растений, обладающий противовирусным, противомикробным и иммуномодулирующим действиями. Патент РФ на изобретение № RU2160596C1. 20.12.2000. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2160596C1/ru>. Ссылка активна на 12.01.2025.
45. Chon H. Medicinal herbs and plant extracts for influenza: Bioactivity, mechanism of anti-influenza effects, and modulation of immune responses. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2012;38:305–323. DOI: 10.1016/B978-0-444-59530-0.00011-3.
46. Adetunji C. O., Ajayi O. O., Akram M., Olaniyan O. T., Chishti M. A., Abel I., Olaniyan S., Adetunji J. B., Olaniyan M., Awotunde S. O. Medicinal plants used in the treatment

- of influenza A virus infections. In: Dua K., Nammi S., Chang D., Kumar Chellappan D., Gupta G., Collet T., editors. *Medicinal Plants for Lung Diseases. A Pharmacological and Immunological Perspective*. New York: Springer; 2021. P. 417–435.
47. Kim S., Kim Y., Kim J. W., Hwang Y. B., Kim S. H., Jang Y. H. Antiviral Activity of Plant-derived Natural Products against Influenza Viruses. *Journal of Life Science*. 2022;32(5):375–390.
48. Boora S., Khan A., Soniya K., Yadav S., Kaushik S., Kumar R., Chhikara S., Kaushik S. Antiviral potential of medicinal plants against influenza viruses: A systematic review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2023;16(3):1503–1513. DOI: 10.52711/0974-360X.2023.00247.
49. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2023. 3576 с.
50. Сергунова Е. В., Сорокина А. А. Изучение фенольных соединений плодов и лекарственных форм шиповника методом ВЭЖХ. *Фармация*. 2012;5:11–13.
51. Sharifi-Rad J., Quispe C., Vergara C. V., Kitic D., Kostic M., Armstrong L., Khan Shinwari Z., Talha Khalil A., Brdar-Jokanović M., Ljevenačić-Mašić B., Varoni E. M., Iriti M., Leyva-Gómez G., Herrera-Bravo J., Salazar L. A., Cho W. C. Genus *Viburnum*: Therapeutic Potentialities and Agro-Food-Pharma Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:3095514. DOI: 10.1155/2021/3095514.
52. Ștefănescu R., Ciurea C. N., Mare A. D., Man A., Nisca A., Nicolescu A., Mocan A., Babotă M., Coman N.-A., Tanase C. Quercus Robur Older Bark—A Source of Polyphenolic Extracts with Biological Activities. *Applied Sciences*. 2022;12(22):11738. DOI: 10.3390/app122211738.
53. Yadav D., Srivastava S., Tripathi Y. B. Acorus calamus: A review. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*. 2019;6(4):62–67. DOI: 10.26438/ijrsrbs/v6i4.6267.
54. Yang Y.-N., Liu Y.-Y., Feng Z.-M., Jiang J.-S., Zhang P.-C. Seven new flavonoid glycosides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* and their biological activities. *Carbohydrate Research*. 2019;485:107820. DOI: 10.1016/j.carres.2019.107820.
55. He R., Ma T.-T., Gong M.-X., Xie K.-L., Wang Z.-M., Li J. The correlation between pharmacological activity and contents of eight constituents of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Heliyon*. 2023;9(3):e14570. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14570.
56. Saifulazmi N. F., Rohani E. R., Harun S., Bunawan H., Hamezah H. S., Nor Muhammad N. A., Azizan K. A., Ahmed Q. U., Fakurazi S., Mediani A., Sarian M. N. A Review with Updated Perspectives on the Antiviral Potentials of Traditional Medicinal Plants and Their Prospects in Antiviral Therapy. *Life*. 2022;12(8):1287. DOI: 10.3390/life12081287.
57. Лекарственное растительное сырье. М.: Издательство стандартов; 1980. 296 с.
58. Лобанова И. Е., Филиппова Е. И., Высочина Г. И., Мазуркова Н. А. Противовирусные свойства дикорастущих и культивируемых растений юго-западной Сибири. *Растительный мир азиатской России*; 2016;2(22):64–72.
59. Ботиров Э. Х., Боначева В. М., Коломиец Н. Э. Химический состав и биологическая активность метаболитов растений рода *Equisetum* L. *Химия растительного сырья*. 2021;1:5–26. DOI: 10.14258/jcprm.2021017760.
60. Kizi K. S. A. Pharmacological Properties of *Plantago Major* L. and Its Active Constituents. *International Journal of Medical Science and Public Health Research*. 2022;3(4):9–12. DOI: 10.37547/ijmsphr/Volume03Issue04-03.
61. Adom M. B., Taher M., Mutalabisin M. F., Amri M. S., Abdul Kudos M. B., Wan Sulaiman M. W. A., Sengupta P., Susanti D. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;96:348–360. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.152.
62. Куркин В. А. Основы фитотерапии. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава»; 2009. 963 с.
63. Гайева А. У., Степанова Э. Ф. Лекарственные препараты отхаркивающего действия. Роль растительных источников в терапии кашля: изученность, ассортимент, востребованность. *Астраханский медицинский журнал*. 2018;13(4):23–31. DOI: 10.17021/2018.13.4.23.31.
64. Jia A., Zhang Y., Gao H., Zhang Z., Zhang Y., Wang Z., Zhang J., Deng B., Qiu Z., Fu C. A review of *Acanthopanax senticosus* (Rupr and Maxim.) harms: From ethnopharmacological use to modern application. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;268:113586. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113586.
65. Bhusal K. K., Magar S. K., Thapa R., Lamsal A., Bhandari S., Maharjan R., Shrestha S., Shrestha J. Nutritional and pharmacological importance of stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A review. *Heliyon*. 2022;8(6):e09717. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09717.
66. Sharifi-Rad M., Berkay Yilmaz Y., Antika G., Salehi B., Turner T. B., Kulandaisamy Venil C., Das G., Patra J. K., Karazhan N., Akram M., Iqbal M., Imran M., Sen S., Acharya K., Dey A., Sharifi-Rad J. Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the genus *Origanum*. *Phytotherapy Research*. 2021;35(1):95–121. DOI: 10.1002/ptr.6785.
67. Protsenko M. A., Mazurkova N. A., Filippova E. I., Kukushkina T. A., Lobanova I. E., Pshenichkina Y. A., Vysochina G. I. Anti-Influenza Activity of Extracts from Plants of the Lamiaceae Family. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2022;48(7):1534–1541. DOI: 10.1134/S1068162022070238.
68. Sargin S. A. Potential anti-influenza effective plants used in Turkish folk medicine: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;265:113319. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113319.
69. Dahija S., Čakar J., Vidic D., Maksimović M., Parić A. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Alnus incana* (L.) Moench and *Alnus viridis* (Chaix) DC. extracts. *Natural Product Research*. 2014;28(24):2317–2320. DOI: 10.1080/14786419.2014.931390.
70. Ильичева Т. Н., Нетесов С. В., Гуреев В. Н. Практикум по микробиологии «Вирусы гриппа». Новосибирск: Новосибирский национальный исследовательский государственный университет; 2012. 86 с.
71. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2010. 691 с.
72. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1–2):55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
73. Reed L. J., Muench H. A simple method of Estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493–497. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
74. Davies H. W., Appleyard G., Cunningham P., Pereira M. S. The use of a continuous cell line for the isolation of influenza viruses. *Bulletin of the World Health Organization*. 1978;56(6):991–993.
75. Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blödorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*. 1975;68(2):426–439. DOI: 10.1016/0042-6822(75)90284-6.

76. Суханова С. М., Путручук Е. М., Генералов А. А. Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(2):106–113. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-2-106-113.
77. McAuley J. L., Gilbertson B. P., Trifkovic S., Brown L. E., McKimm-Breschkin J. L. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:39. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00039.
78. Здродовского П. Ф., Соколова М. И., ред. Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней. М.: Медицина; 1965. 591с.
79. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ. М.: Изд-во Медицина, Изд-во Шико; 2005. 826 с.

REFERENCES

1. Chernyshova A. I., Zhirnov O. P. Two Phylogenetic Cohorts of the Nucleocapsid Protein NP and Their Correlation with the Host Range of Influenza A Viruses. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2024;516:93–97. DOI: 10.1134/S1607672924700789.
2. Krejcová L., Michalek P., Hynek D., Adam V., Kizek R. Structure of influenza viruses, connected with influenza life cycle. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2015;2(1):13–19.
3. Lina B. History of influenza pandemics. In: Raoult D., Drancourt M., editors. *Paleomicrobiology. Past Human Infections*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2008. P. 199–211. DOI: 10.1007/978-3-540-75855-6_12.
4. Wu Z.-Q., Zhang Y., Zhao N., Yu Z., Pan H., Chan T.-C., Zhang Z.-R., Liu S.-L. Comparative Epidemiology of Human Fatal Infections with Novel, High (H5N6 and H5N1) and Low (H7N9 and H9N2) Pathogenicity Avian Influenza A Viruses. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017;14(3):263. DOI: 10.3390/ijerph14030263.
5. Walker P. J., Siddell S. G., Lefkowitz E. J., Mushegian A. R., Adriaenssens E. M., Alfenas-Zerbini P., Dempsey D. M., Dutilh B. E., García M. L., Hendrickson R. C., Junglen S., Krupovic M., Kuhn J. H., Lambert A. J., Łobocka M., Oksanen H. M., Orton R. J., Robertson D. L., Rubino L., Sabanadzovic S., Simmonds P., Smith D. B., Suzuki N., Van Doorslaer K., Vandamme A.-M., Varsani A., Zerbini F. M. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Archives of Virology*. 2022;167(11):2429–2440. DOI: 10.1007/s00705-022-05516-5.
6. Saunders-Hastings P., Krewski D. Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens*. 2016;5(4):66. DOI: 10.3390/pathogens5040066.
7. Treanor J. J. Influenza viruses. In: Kaslow R. A., Stanberry L. R., Powers A. M., editors. *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*. New York: Springer US; 2023. P. 1–57.
8. Woźniak-Kosek A., Kempieńska-Mirośławska B., Hoser G. Detection of the influenza virus yesterday and now. *Acta Biochimica Polonica*. 2014;61(3):465–470.
9. Vasin A. V. New approaches to the development of diagnostics and chemotherapy for influenza using genomic and postgenomic technologies. [Dissertation.] St. Petersburg; 2018. 38 p. Available at: <https://www.dissercat.com/content/novye-podkhody-k-razrabotke-sredstv-diagnostiki-i-khimioterapii-grippa-s-ispolzovaniem-genom>. Accessed: 12.01.2025. (In Russ.)
10. Mehrbod P., Abdalla M. A., Njoya E. M., Ahmed A. S., Foutouhi F., Farahmand B., Gado D. A., Tabatabaian M., Fasanmi O. G., Eloff J. N., McGaw L. J., Fasina F. O. South African medicinal plant extracts active against influenza A virus. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018;18(1):112. DOI: 10.1186/s12906-018-2184-y.
11. Mousa H. A.-L. Prevention and Treatment of Influenza, Influenza-Like Illness, and Common Cold by Herbal, Complementary, and Natural Therapies. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2017;22(1):166–174. DOI: 10.1177/2156587216641831.
12. Kim Y., Narayanan S., Chang K.-O. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Research*. 2010;88(2):227–235. DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.08.016.
13. Oriola A. O., Oyedele A. O. Essential Oils and Their Compounds as Potential Anti-Influenza Agents. *Molecules*. 2022;27(22):7797. DOI: 10.3390/molecules27227797.
14. Takashita E. Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2021;11(5):a038687. DOI: 10.1101/cshperspect.a038687.
15. Lipkowski A., Litwińska B. The use of viburnum opulus or its tissues or products thereof for the prevention or treatment of herpes virus infections. Patent № WO2012091589A1. 05.07.2012. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2012091589A1/da>. Accessed: 12.01.2025.
16. Stoyanova A., Popatanasov A., Rashev V., Tancheva L., Quideau S., Galabov A. S. Effect of castalagin against HSV-1 infection in newborn mice. *Natural Product Research*. 2023;37(24):4156–4161. DOI: 10.1080/14786419.2023.2173191.
17. Yao X., Ling Y., Guo S., Wu W., He S., Zhang Q., Zou M., Nandakumar K. S., Chen X., Liu S. Tatanan A from the *Acorus calamus* L. root inhibited dengue virus proliferation and infections. *Phytomedicine*. 2018;42:258–267. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.03.018.
18. Tribudi Y. A., Agustin A. T., Setyaningtyas D. E., Gusmalawati D. Bioactive Compound Profile and Biological Modeling Reveals the Potential Role of Purified Methanolic Extract of Sweet Flag (*Acorus calamus* L.) in Inhibiting the Dengue Virus (DENV) NS3 Protease-Helicase. *Indonesian Journal of Chemistry*. 2022;22(2):331–341. DOI: 10.22146/ijc.68317.
19. Huang Y., Li Z., Ma Y., Wu Q., Kong J., Zhao L., Li S., Li J. Screening for Active Compounds of *Acorus calamus* against SARS-CoV-2 Viral Protease and Mechanism Prediction. *Pharmaceuticals*. 2024;17(3):325. DOI: 10.3390/ph17030325.
20. Joshi S. V., Gupta S., Tripathi K., Mishra S., Kumar S. Antiviral plants of India. Cuttack: APRF Publisher; 2024.
21. Wang J., Chen X., Wang W., Zhang Y., Yang Z., Jin Y., Ge H. M., Li E., Yang G. Glycyrrhizic acid as the antiviral component of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. against coxsackievirus A16 and enterovirus 71 of hand foot and mouth disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;147(1):114–121. DOI: 10.1016/j.jep.2013.02.017.
22. Kuo K.-K., Chang J.-S., Wang K.-C., Chiang L.-C. Water extract of *Glycyrrhiza uralensis* inhibited enterovirus 71 in a human foreskin fibroblast cell line. *The American*

- Journal of Chinese Medicine*. 2009;37(2):383–394. DOI: 10.1142/S0192415X09006904.
23. Song W., Si L., Ji S., Wang H., Fang X.-M., Yu L.-Y., Li R.-Y., Liang L.-N., Zhou D., Ye M. Ursaponins M-Y, antiviral triterpenoid saponins from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Journal of Natural Products*. 2014;77(7):1632–1643. DOI: 10.1021/np500253m.
24. Li Z., Dong M., Chen Z., Zhang C., Jiang J., Liu M., Cui Q. Combining virus-based affinity ultrafiltration method with serum pharmacokinetics to identify the antiviral pharmacodynamic substances in licorice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2025;338(Part 1):118978. DOI: 10.1016/j.jep.2024.118978.
25. Angourani H.R., Zare A., Moghadam M.M., Ramazani A., Mastinu A. Investigation on the Essential Oils of the Achillea Species: From Chemical Analysis to the In Silico Uptake against SARS-CoV-2 Main Protease. *Life*. 2023;13(2):378. DOI: 10.3390/life13020378.
26. Rezaatofghi S.E., Seydabadi A., Seyyed Nejad S.M. Evaluating the Efficacy of Achillea millefolium and Thymus vulgaris Extracts Against Newcastle Disease Virus in Ovo. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014;7(2):e9016. DOI: 10.5812/jjm.9016.
27. Moradi M.-T., Karimi A., Lorigooini Z., Pourghesari B., Alidadi S., Hashemi L. In vitro anti influenza virus activity, antioxidant potential and total phenolic content of twelve Iranian medicinal plants. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2017;21(4):843–851. DOI: 10.12991/mpj.2017.10.
28. Chiang L.C., Chiang W., Chang M.Y., Ng L.T., Lin C.C. Antiviral activity of Plantago major extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research*. 2002;55(1):53–62. DOI: 10.1016/S0166-3542(02)00007-4.
29. Chiang L.-C., Chiang W., Chang M.-Y., Lin C.-C. In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiatica*. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2003;31(2):225–234. DOI: 10.1142/S0192415X03000874.
30. Povnitsa O., Bilyavska L., Pankivska Yu., Likhanov A., Dorovskiy A., Lysenko V., Lokshin M., Zahorodnia S. In vitro Antiviral Activity of Leaf Extracts Plantago major, Plantago lanceolata, Rubus idaeus. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2022;1(1):49–62. DOI: 10.15407/microbiolj84.01.044.
31. Kutluk I., Aslan M., Orhan I.E., Özçelik B. Antibacterial, antifungal and antiviral bioactivities of selected Helichrysum species. *South African Journal of Botany*. 2018;119:252–257. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.09.009.
32. Kaya S., Erkan S., Karakaş D. Investigation of the Effect of Main Components of Wild Thyme on Covid-19 by Computational Methods. *Cumhuriyet Science Journal*. 2023;44(4):665–670. DOI: 10.17776/csj.1328641.
33. Glatthaar-Saalmüller B., Sacher F., Esperester A. Antiviral activity of an extract derived from roots of Eleutherococcus senticosus. *Antiviral Research*. 2001;50(3):223–228. DOI: 10.1016/S0166-3542(01)00143-7.
34. Knipping K., Garssen J., van't Land B. An evaluation of the inhibitory effects against rotavirus infection of edible plant extracts. *Virology Journal*. 2012;9:137. DOI: 10.1186/1743-422X-9-137.
35. Uncini Manganelli R.E., Zaccaro L., Tomei P.E. Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;98(3):323–327. DOI: 10.1016/j.jep.2005.01.021.
36. Meneses Lopez R., Ocazonez R.E., Martinez J.R., Stashenko E.E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2009;8:8. DOI: 10.1186/1476-0711-8-8.
37. Gilling D.H., Kitajima M., Torrey J.R., Bright K.R. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology*. 2014;116(5):1149–1163. DOI: 10.1111/jam.12453.
38. Sánchez G., Aznar R. Evaluation of Natural Compounds of Plant Origin for Inactivation of Enteric Viruses. *Food and Environmental Virology*. 2015;7:183–187. DOI: 10.1007/s12560-015-9181-9.
39. Okino C.H., Melito G.R., de Almeida Astolfo M.E., Da Mata Martins M.E., Junior S.B., Ferreira M.D. Antiviral Effect of Different Essential Oils on Avian Coronavirus. *Avian Diseases*. 2024;68(3):254–258. DOI: 10.1637/aviandiseases-D-24-00015.
40. Blank D.E., de Oliveira Hübner S., Alves G.H., Lima Cardoso C.A., Freitag R.A., Cleff M.B. Chemical composition and antiviral effect of extracts of *Origanum vulgare*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2019;10(7):188–196. DOI: 10.4236/abb.2019.107014.
41. Trokhymchuk T.Yu., Shalamay A.S., Zavelevich M.P., Palchykovska L.G., Vasylenko O.V., Rybalko S.L., Starosyl D.B., Diadiun S.T. Anti-HIV activity of ellagitannins from alder tree fruits. *Biopolymers and Cell*. 2018;34(3):218–228. DOI: 10.7124/bc.00097C.
42. Goncharova O.V. Phytotherapy in the prevention of acute respiratory infections in children. *Pediatrician's Practice*. 2011;5:39–43. (In Russ.)
43. Pletnev V.V. Pletnev's drops with antiviral and immunomodulatory effects. Patent RUS № RU2553308C1. 10.06.2015. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2553308C1/ru>. Accessed: 12.01.2025. (In Russ.)
44. Pechenevskiy A.V., Pechenevskiy A.A., Kosenko N.V., Severtsev V.A. A collection of medicinal plants with antiviral, antimicrobial and immunomodulatory effects. Patent RUS № RU2160596C1. 20.12.2000. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2160596C1/ru>. Accessed: 12.01.2025. (In Russ.)
45. Chon H. Medicinal herbs and plant extracts for influenza: Bioactivity, mechanism of anti-influenza effects, and modulation of immune responses. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2012;38:305–323. DOI: 10.1016/B978-0-444-59530-0.00011-3.
46. Adetunji C.O., Ajayi O.O., Akram M., Olaniyan O.T., Chishti M.A., Abel I., Olaniyan S., Adetunji J.B., Olaniyan M., Awotunde S.O. Medicinal plants used in the treatment of influenza A virus infections. In: Dua K., Nammi S., Chang D., Kumar Chellappan D., Gupta G., Collet T., editors. *Medicinal Plants for Lung Diseases. A Pharmacological and Immunological Perspective*. New York: Springer; 2021. P. 417–435.
47. Kim S., Kim Y., Kim J.W., Hwang Y.B., Kim S.H., Jang Y.H. Antiviral Activity of Plant-derived Natural Products against Influenza Viruses. *Journal of Life Science*. 2022;32(5):375–390.
48. Boora S., Khan A., Soniya K., Yadav S., Kaushik S., Kumar R., Chhikara S., Kaushik S. Antiviral potential of medicinal plants against influenza viruses: A systematic review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2023;16(3):1503–1513. DOI: 10.52711/0974-360X.2023.00247.

49. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV edition. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2023. 3576 p. (In Russ.)
50. Sergunova E. V., Sorokina A. A. Investigation of phenolic compounds of brier (*Rosa cinnamomea*) fruits and formulations by high performance liquid chromatography. *Pharmacy*. 2012;5:11–13. (In Russ.)
51. Sharifi-Rad J., Quispe C., Vergara C. V., Kitic D., Kostic M., Armstrong L., Khan Shinwari Z., Talha Khalil A., Brdar-Jokanović M., Ljevnaić-Mašić B., Varoni E. M., Iriti M., Leyva-Gómez G., Herrera-Bravo J., Salazar L. A., Cho W. C. Genus *Viburnum*: Therapeutic Potentialities and Agro-Food-Pharma Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:3095514. DOI: 10.1155/2021/3095514.
52. Ștefănescu R., Ciurea C. N., Mare A. D., Man A., Nisca A., Nicolescu A., Mocan A., Babotă M., Coman N.-A., Tanase C. Quercus Robur Older Bark—A Source of Polyphenolic Extracts with Biological Activities. *Applied Sciences*. 2022;12(22):11738. DOI: 10.3390/app122211738.
53. Yadav D., Srivastava S., Tripathi Y. B. *Acorus calamus*: A review. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*. 2019;6(4):62–67. DOI: 10.26438/ijrsbs/v6i4.6267.
54. Yang Y.-N., Liu Y.-Y., Feng Z.-M., Jiang J.-S., Zhang P.-C. Seven new flavonoid glycosides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* and their biological activities. *Carbohydrate Research*. 2019;485:107820. DOI: 10.1016/j.carres.2019.107820.
55. He R., Ma T.-T., Gong M.-X., Xie K.-L., Wang Z.-M., Li J. The correlation between pharmacological activity and contents of eight constituents of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Heliyon*. 2023;9(3):e14570. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14570.
56. Saifulazmi N. F., Rohani E. R., Harun S., Bunawan H., Hamezah H. S., Nor Muhammad N. A., Azizan K. A., Ahmed Q. U., Fakurazi S., Mediani A., Sarian M. N. A Review with Updated Perspectives on the Antiviral Potentials of Traditional Medicinal Plants and Their Prospects in Antiviral Therapy. *Life*. 2022;12(8):1287. DOI: 10.3390/life12081287.
57. Medicinal plant raw materials. Moscow: Izdatel'stvo standartov; 1980. 296 p. (In Russ.)
58. Lobanova I. E., Filippova E. I., Vysochina G. I., Mazurkova N. A. Antiviral properties of wild and cultivated plants of southwestern Siberia. Flora and vegetation of Asian Russia; 2016;2(22):64–72. (In Russ.)
59. Botirov E. K., Bonacheva V. M., Kolomiets N. E. Chemical composition and biological activity of metabolites of the genus *Equisetum*. *Chemistry of plant raw material*. 2021;1:5–26. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021017760.
60. Kizi K. S. A. Pharmacological Properties of *Plantago Major* L. and Its Active Constituents. *International Journal of Medical Science and Public Health Research*. 2022;3(4):9–12. DOI: 10.37547/ijmsphr/Volume03Issue04-03.
61. Adom M. B., Taher M., Mutalabisin M. F., Amri M. S., Abdul Kudos M. B., Wan Sulaiman M. W. A., Sengupta P., Susanti D. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;96:348–360. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.152.
62. Kurkin V. A. Fundamentals of Phytotherapy. Samara: LLC "Ofort", GOU VPO «SamGMU Roszdrava»; 2009. 963 p. (In Russ.)
63. Gagueva A. U., Stepanova E. F. Drug products is expectorative action. The role of plant sources in therapy of cough: the coverage of studies, range, demand. *Astrakhan Medical Journal*. 2018;13(4):23–31. (In Russ.) DOI: 10.17021/2018.13.4.23.31.
64. Jia A., Zhang Y., Gao H., Zhang Z., Zhang Y., Wang Z., Zhang J., Deng B., Qiu Z., Fu C. A review of *Acanthopanax senticosus* (Rupr and Maxim.) harms: From ethnopharmacological use to modern application. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;268:113586. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113586.
65. Bhusal K. K., Magar S. K., Thapa R., Lamsal A., Bhandari S., Maharjan R., Shrestha S., Shrestha J. Nutritional and pharmacological importance of stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A review. *Heliyon*. 2022;8(6):e09717. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09717.
66. Sharifi-Rad M., Berkay Yilmaz Y., Antika G., Salehi B., Tümer T. B., Kulandaisamy Venil C., Das G., Patra J. K., Karazhan N., Akram M., Iqbal M., Imran M., Sen S., Acharya K., Dey A., Sharifi-Rad J. Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the genus *Origanum*. *Phytotherapy Research*. 2021;35(1):95–121. DOI: 10.1002/ptr.6785.
67. Protsenko M. A., Mazurkova N. A., Filippova E. I., Kukushkina T. A., Lobanova I. E., Pshenichkina Y. A., Vysochina G. I. Anti-Influenza Activity of Extracts from Plants of the Lamiaceae Family. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2022;48(7):1534–1541. DOI: 10.1134/S1068162022070238.
68. Sargin S. A. Potential anti-influenza effective plants used in Turkish folk medicine: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;265:113319. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113319.
69. Dahija S., Čakar J., Vidic D., Maksimović M., Parić A. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Alnus incana* (L.) Moench and *Alnus viridis* (Chaix) DC. extracts. *Natural Product Research*. 2014;28(24):2317–2320. DOI: 10.1080/14786419.2014.931390.
70. Ilyicheva T. N., Netesov S. V., Gureev V. N. Microbiology practical work "Influenza viruses". Novosibirsk: Novosibirsk State University; 2012. 86 p. (In Russ.)
71. Freshni R. Ya. Animal Cell Culture: A Practical Guide. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2010. 691 p. (In Russ.)
72. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1–2):55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
73. Reed L. J., Muench H. A simple method of Estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493–497. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
74. Davies H. W., Appleyard G., Cunningham P., Pereira M. S. The use of a continuous cell line for the isolation of influenza viruses. *Bulletin of the World Health Organization*. 1978;56(6):991–993.
75. Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blödorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*. 1975;68(2):426–439. DOI: 10.1016/0042-6822(75)90284-6.
76. Sukhanova S. M., Putruchuk E. M., Generalov A. A. Trypsin. Properties and Use in the Production of Biological Medicinal Products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(2):106–113. (In Russ.) DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-2-106-113.
77. McAuley J. L., Gilbertson B. P., Trifkovic S., Brown L. E., McKimm-Breschkin J. L. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:39. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00039.
78. Zdrodovsky P. F., Sokolova M. I., editors. Guide to laboratory diagnostics of viral and rickettsial diseases. Moscow: Meditsina; 1965. 591 p. (In Russ.)
79. Guide to experimental (preclinical) study of pharmacological substances. Moscow: Medicina Publishing House, Shiko Publishing House; 2005. 826 p. (In Russ.)

ЮБИЛЕЙНАЯ X ВСЕРОССИЙСКАЯ GMP-КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

15-17 сентября
Кластер «Ломоносов»
Москва, 2025

**РЕГИСТРАЦИЯ
ОТКРЫТА**

Оператор:
ЦКК С-ГРУП
+7(495) 120-53-33
conference@sgr.com.ru

www.gosgmp.ru





Дурнишник обыкновенный (*Xanthium strumarium* L.): химические компоненты и биологическая активность (обзор)

Н. С. Попков✉, В. Д. Замыслова, М. Н. Повыдыш

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

✉ **Контактное лицо:** Попков Никита Сергеевич. **E-mail:** nikita.popkov@spcspu.ru

ORCID: Н. С. Попков – <https://orcid.org/0009-0008-2103-4206>;

В. Д. Замыслова – <https://orcid.org/0009-0008-4869-3287>;

М. Н. Повыдыш – <https://orcid.org/0000-0002-7768-9059>.

Статья поступила: 28.01.2025

Статья принята в печать: 27.06.2025

Статья опубликована: 27.06.2025

Резюме

Введение. Вопрос достаточности природных ресурсов лекарственных растений в настоящее время становится все более острым. Это является причиной исследования возможности применения инвазивных растений в качестве источников биологически активных веществ. *Xanthium strumarium* L. – растение семейства *Asteraceae*, сорное растение, распространенное практически по всему земному шару и обладающее многокомпонентным составом. Его применение в терапии различного рода патологий активно освещается в научной литературе. Проблема использования дурнишника обыкновенного в условиях современной доказательной медицины приобретает все большее значение.

Текст. В настоящей статье рассмотрен химический состав дурнишника обыкновенного на основе исследований, опубликованных с 2005 по 2022 гг. Подробно освещен состав эфирного масла, выступающего в качестве одного из основных компонентов, проведено сравнение компонентного состава эфирного масла различных хемотипов дурнишника, собранных в разных регионах мира. Рассмотрены данные о составе флавоноидов, фенилпропаноидов и стероидов, алкалоидов, жирных масел, смол, полисахаридов, аминокислот, витаминов, гликозидов и других соединений. Приведены структуры основных химических компонентов, характерных для дурнишника обыкновенного. В работе приведены данные об экспериментально подтвержденных видах биологической активности. Рассматривается опыт применения экстрактов дурнишника в исследованиях антибактериальной, противогрибковой, сколицидной и антирипаносомной активности. Кроме того, представлена информация об экспериментально подтвержденных видах биологической активности: противодиабетической, противоопухолевой, противовоспалительной, антиоксидантной и обезболивающей.

Заключение. На основании данных литературы можно рассматривать *Xanthium strumarium* L. не только как инвазивный и сорный вид, активно распространившийся практически по всему земному шару, но и как потенциальное лекарственное растение с богатым химическим составом.

Ключевые слова: дурнишник обыкновенный, химические компоненты, биологическая активность, эфирное масло, флавоноиды

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

Вклад авторов. Н. С. Попков – сбор и обработка литературных данных, подготовка текста статьи. В. Д. Замыслова – сбор литературных данных. М. Н. Повыдыш – обсуждение результатов, разработка концепции исследования.

Для цитирования: Попков Н. С., Замыслова В. Д., Повыдыш М. Н. Дурнишник обыкновенный (*Xanthium strumarium* L.): химические компоненты и биологическая активность. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):60–70. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2024>

Xanthium strumarium L.: chemical components and biological activity (review)

Nikita S. Popkov✉, Valeria D. Zamyslova, Maria N. Povydysh

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

✉ **Corresponding author:** Nikita S. Popkov. **E-mail:** nikita.popkov@spcpcu.ru

ORCID: Nikita S. Popkov – <https://orcid.org/0009-0008-2103-4206>;
Valeria D. Zamyslova – <https://orcid.org/0009-0008-4869-3287>;
Maria N. Povydysh – <https://orcid.org/0000-0002-7768-9059>.

Received: 28.01.2025

Accepted: 27.06.2025

Published: 27.06.2025

Abstract

Introduction. The issue of the sufficiency of natural resources of medicinal plants is currently becoming more and more acute. This is the reason for investigating the possibility of using invasive plants as sources of biologically active substances. *Xanthium strumarium* L. is a plant of the *Asteraceae* family, weed plant that is widespread almost all over the globe and has a multicomponent composition. Its use in the treatment of various pathologies is actively covered in scientific literature. The problem of using Common Cocklebur in the context of modern evidence-based medicine is becoming increasingly important.

Text. This article examines the chemical composition of common cocklebur based on studies published from 2005 to 2022. The composition of the essential oil as one of the main components is described in detail, and the comparison of the essential oil component composition of various chemotypes of cocklebur collected in different regions of the world is considered. Data on the composition of flavonoids, phenylpropanoids and steroids, alkaloids, fatty oils, resins, polysaccharides, amino acids, vitamins, glycosides and other compounds is considered. The structures of the main chemical components characteristic of the common cocklebur are given. The article presents data on experimentally confirmed types of biological activity. The experience of using cocklebur extracts in studies of antibacterial, antifungal, scolicidal and antitrypanosomal activities is considered. In addition, information is provided on experimentally confirmed types of biological activity: antidiabetic, antitumor, anti-inflammatory, antioxidant and analgesic.

Conclusion. Based on the literature data, *Xanthium strumarium* L. can be considered not only as an invasive and polluting species that has actively spread almost all over the globe, but also as a potential medicinal plant with a rich chemical composition.

Keywords: common cocklebur, chemical components, biological activity, essential oil, flavonoids

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

Contribution of the authors. Nikita S. Popkov – collection and processing of literary data, preparation of the text of the article. Valeria D. Zamyslova – collection of literary data. Maria N. Povydysh – discussion of the results, development of research components.

For citation: Popkov N. S., Zamyslova V. D., Povydysh M. N. *Xanthium strumarium* L.: chemical components and biological activity. *Drug development & registration*. 2025;14(3):60–70. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2024>

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивными в настоящее время принято называть виды растений, распространение которых за пределы мест естественного обитания угрожает биологическому разнообразию местных видов. Подобные растения способны конкурировать с местными растениями, а также подавлять прорастание их семян. Однако стоит отметить, что, несмотря на агрессивность распространения, такие виды могут содержать потенциально ценные биологически активные соединения. В таком случае их обильная биомасса становится преимуществом, поскольку представляет богатую ресурсную базу для получения природных соединений.

Одним из таких растений является дурнишник обыкновенный (*Xanthium strumarium* L.), распространившийся по большей части Евразии, а также встречающийся в северных частях Африки (на территории

Египта) и на островах Океании. В Российской Федерации растение встречается как сорное в основном в южных и умеренных широтах, редко заходя на северные территории.

Xanthium strumarium относится к семейству астровых (*Asteraceae*) и является однолетним травянистым растением. Его родиной принято считать Центральную или Южную Америку [1]. Растение достигает в высоту 30–50 см [2] (в некоторых случаях до 140 см [3]), имеет прямостоячие ветвистые стебли, часто с пурпурными пятнами, опушенные короткими белыми волосками. Листья зеленые или серовато-зеленые, очередные, черешковые, длиной 5–20 см и шириной 4–16 см, трехлопастные и, подобно стеблю, шершаво-опушенные. Край лопастей надрезанно-зубчатый [4]. Цветки дурнишника трубчатые, мелкие, зеленоватые или желтоватые. Женские цветки собраны пучками и располагаются у оснований черешков листьев, тогда как мужские собраны в плотные шаро-

видные головки на концах ветвей. Плоды представляют собой гладкие овальные семечки, заключенные в твердую колючую оболочку. Цветение обычно наблюдается с июня по август.

Дурнишник обыкновенный издавна используется в традиционной китайской медицине. Он применялся для лечения лейкодермии, укусов ядовитых насекомых, эпилепсии, малярии, ревматизма, диареи, туберкулеза, артрита, проказы, различных бактериальных и грибковых инфекций, кожных заболеваний и др. [5].

Химические компоненты

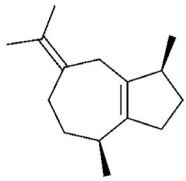
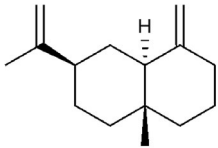
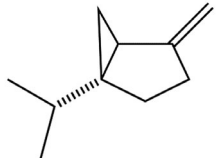
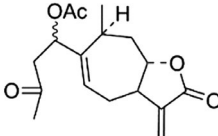
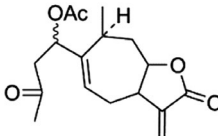
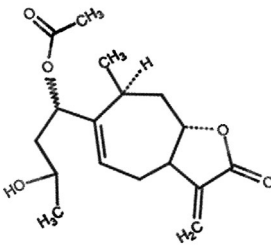
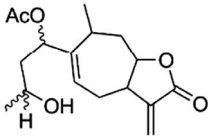
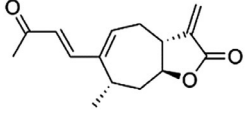
Подобное обилие эффектов возможно объяснить богатым химическим составом данного растения. В дурнишнике, согласно литературным данным, были найдены эфирное масло, алкалоиды, фенолкарбоновые кислоты, сапонины, стероиды, флавоноиды, витамин С, жирные масла, дубильные вещества, полисахариды, свободные аминокислоты, смолы, гликозиды, тиазиды. Сообщается о наличии в некоторых частях растения йода [2, 6].

Эфирное масло дурнишника обыкновенного, собранного в различных регионах, подвергали анализу с применением газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Было показано, что основными компонентами масла образцов из Ирана являются цис-β-гвайен (34,2 %), лимонен (20,3 %), борнеол (11,6 %), борнилацетат (4,5 %), β-кубебен (3,8 %), сабинен (3,6 %), фитол (3,1 %), β-селинен (2,8 %), камфен (2,2 %), α-кубебен (2,4 %), β-кариофиллен (1,9 %), α-пинен (1,8 %) и ксантинин (1,04 %). Доминирующим компонентом образцов эфирного масла из Бразилии также является цис-β-гвайен (79,6 %), тогда как другое исследование «иранского» масла свидетельствовало, что оно содержит в наибольших количествах борнилацетат (19,5 %), лимонен (15,0 %) и β-селинен (10,1 %) [6–9]. Кроме того, доминирующими сесквитерпеновыми лактонами являются гваяковые и секогваяковые, важным активным компонентам которых являются ксантанолиты. Исследователями были обнаружены ксантинин, ксантумин, ксантанол, ксантанола ацетат, изоксантанол, ксантуманол, ксантатин, ксантинозин и другие производные данных соединений (таблица 1).

При исследовании эфирного масла дурнишника, собранного в Египте, было выявлено, что оно по химическому составу наиболее близко к бразильскому образцу, поскольку в обоих образцах сесквитерпеноиды были доминирующим классом соединений (72,4 % в египетском образце и 88,13 % в бразильском) [10]. Таким образом, показано, что состав эфирного масла сильно варьирует в зависимости от региона произрастания, что объясняется главным образом различными условиями окружающей среды, в том числе сменой сезонов, возрастом и стадией развития растений, температурой и влажностью, атмосферным давлением и др.

Таблица 1. Наименования и структурные формулы некоторых компонентов эфирного масла дурнишника

Table 1. Names and structural formulas of some components of cocklebur essential oil

Наименование Name	Формула Formula
β-гвайен β-guaiene	
β-селинен β-selinene	
Сабинен Sabinene	
Ксантинин Xanthinin	
Ксантумин Xanthumin	
Ксантанол Xanthanol	
Ксантуманол Xanthumanol	
Ксантатин Xanthatin	

Наименование Name	Формула Formula
Ксантинозин Xanthinosin	

В траве дурнишника обыкновенного были обнаружены такие флавоноиды, как ононин, кверцетин, аллопатулетин, патулетин-3-глюкуронид, кверцетин-3-О-глюкуронид, формонетин (таблица 2) [11].

Таблица 2. Наименование и структурные формулы флавоноидов дурнишника обыкновенного

Table 2. Name and structural formulas of the flavonoids of Common cocklebur

Наименование Name	Структурная формула Structural formula
Аллопатулетин Allopatuletin	
Патулетин-3-глюкуронид R=OH Patuletin-3-glucuronide R=OH	

В литературе упоминается также наличие в траве дурнишника лигнанов и кумаринов. Так, были выявлены лигнаны диоспирозин, баланофонин А, сирингарезинол, пинорезинол, (-)-симуланол и др. С их наличием авторы связывают проявление в эксперименте противовоспалительного эффекта экстрактов дурнишника. Также из сырья впервые были изолированы 4 кумарина: скополетин, ятроцин В, клеомискозин А и клеомискозин С (таблица 3) [11].

Некоторые исследования также указывают на наличие в дурнишнике стероидных соединений. Так, в 2010 г. были получены β -ситостенон, β -ситостерол, даукостерол и другие [11, 12]. Позднее, в дополнение к вышеуказанным соединениям, были идентифицированы стигмастерол, эргостерол, таракастерилацетат и другие [11].

Среди химических соединений, обнаруженных в дурнишнике обыкновенном, есть также и фенилпропаноиды. Из феноловых кислот обнаружены кофейная, феруловая, протокатехиновая, хлорогеновая и др. Кроме того, выделены тринадцать кофейлхинных кислот, в том числе 1,3,5-три-О-кофейлхинная, 1,5-ди-О-кофейлхинная кислота, метиловый эфир неохлорогеновой кислоты, 1,3-ди-О-кофейлхинная кислота и

другие соединения. В дополнение к вышеуказанным обнаружены фенилпропаноиды ксантиумнолы А, В, С, D и E [11].

Таблица 3. Некоторые формулы лигнанов и кумаринов

Table 3. Formulas of lignans and coumarins

Наименование Name	Формула Formula
Диоспирозин Diospyrosin	
Баланофонин А Balanophonin A	
(-)-симуланол (-)-simulanol	
Клеомискозин А Cleomiscosin A	
Клеомискозин С Cleomiscosin C	

Как упоминалось выше, исследователи находили еще и тиазиды. Таковыми оказались ксантиазон, 2-гидроксиксантиазон и другие [6, 13].

В двадцатом веке из сырья дурнишника был получен токсичный гликозид, вначале получивший наименование «АА₂», а затем названный атрактилозид. Позднее к нему добавился еще один токсичный ком-

понент – карбоксиатрактилозид [11]. Из-за вышеуказанных компонентов применение дурнишника в лечебных целях ограничено. Для снижения содержания атрактилозида и карбоксиатрактилозида было предложено применять нагревание сырья при постоянном перемешивании. Однако при чрезмерном нагревании уменьшается не только содержание токсичных компонентов, но и целевых БАВ [11, 14].

В соответствии с китайской фармакопеей обработку сырья следует продолжать до момента изменения его цвета на желтый. При подобном подходе судить о качестве обработки сырья возможно только исходя из навыков конкретных специалистов. Следует понимать, что цвет сырья является весьма субъективной органолептической характеристикой, что может привести к ошибке, связанной с человеческим фактором. Поэтому некоторые исследователи предлагают использование компьютерного зрения для более точной и полной очистки. В соответствии с таким исследованием было определено, что при обработке в течение 7 мин улетучивается максимальное количество токсических компонентов при наименьших потерях целевых соединений [14].

Биологическая активность

Как упоминалось выше, дурнишник обыкновенный проявляет весьма широкий спектр фармакологических эффектов вследствие разнообразия биологически активных компонентов, содержащихся в сырье. Некоторые экспериментально подтвержденные виды биологической активности следует рассмотреть подробнее.

Прежде всего важный вклад в фармакологическую активность сырья дурнишника вносит эфирное масло. Было показано антибактериальное и противогрибковое действие, а также сколицидная активность эфирного масла. Для анализа применяли метод диффузии в агар. Компоненты эфирного масла дурнишника значительно ингибировали развитие как грамм-положительных (*Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*), так и грамм-отрицательных (*Klebsiella pneumoniae*) бактерий. Минимальная ингибирующая концентрация для *S. aureus*, *B. subtilis* и *K. pneumoniae* составила $0,5 \pm 0,1$ мкг/мл, $1,3 \pm 0,0$ и $4,8 \pm 0,0$ мкг/л соответственно, что говорит о наибольшей чувствительности *S. aureus*. При этом минимальная ингибирующая концентрация для *Pseudomonas aeruginosa* оказалась весьма большой ($20,5 \pm 0,3$ мкг/л), что свидетельствует об устойчивости данного микроорганизма к компонентам эфирного масла. В плане противогрибковой активности масло показало высокую эффективность против *Aspergillus niger* и *Candida albicans*, при воздействии на которые минимальная ингибирующая концентрация составила $34,3 \pm 0,0$ и $35,2 \pm 0,0$ мкг/мл соответственно [6, 15]. Схожие выводы об эффективности экстрактов дурнишника делают и другие авторы [16, 17].

При анализе действия эфирного масла на протосколии *Echinococcus granulosus* было выявлено, что процент смертности прямо пропорционален времени воздействия и концентрации эфирного масла. Так, наибольшая смертность наблюдалась при концентрации 20 мкг/мл и воздействии в течение 60 мин [6].

Другие исследования (Шерер и др., 2010) демонстрируют, что при испытаниях экстрактов и эфирного масла дурнишника на *S. aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* и *Clostridium perfringens* наибольшую резистентность продемонстрировали последние два вида, в то время как наибольшую чувствительность проявили бактерии вида *S. aureus* [7, 18].

При изучении действия эфирного масла и экстрактов *X. strumarium* против метицилин-чувствительных (MSSA) и метицилин-устойчивых (MRSA) *S. aureus* обе субстанции оказались эффективными в обоих случаях, однако большее подавление проявилось у метицилин-чувствительных клеток [19].

Согласно исследованиям Е. Nibret и др. (2011), *X. strumarium* проявлял эффекты и в отношении внеклеточного паразита *Trypanosoma brucei brucei* – подвида возбудителя такого опасного заболевания человека, как африканский трипаносомоз (сонная болезнь) или трипаносомоз животных (нагану). Данный подвид вызывает лишь болезни животных. Анализ действия индивидуальных БАВ, выделенных из листьев дурнишника, выявил наибольший трипаноцидный эффект у ксантата с $IC_{50} = 2,63$ мкг/мл. К тому же было выявлено, что, в отличие от стандартных фармакологических средств против животного трипаносомоза – диминазенацетурата и этидия бромида, ксантатин не влияет на структуры ДНК паразита, что свидетельствует об отличном механизме действия и иной мишени воздействия [20].

Рядом авторов проводились исследования влияния экстрактов дурнишника обыкновенного на уровень сахара в крови и массу тела животных с аллоксаниндуцированным диабетом. При испытании экстрактов в дозах 250 и 500 мг/кг веса мышей было выявлено существенное снижение веса у особей с диабетом при отсутствии значимых изменений в массе тела здоровых мышей. Такой эффект авторы связывают с действием флавоноидной и/или терпеноидной фракции водного экстракта дурнишника вследствие их потенцирования действия инсулина и увеличения поглощения глюкозы клетками. Исследование также показало значительное снижение уровня глюкозы в крови животных с аллоксаниндуцированным диабетом при действии экстрактов дурнишника обеих концентраций. При этом значимое снижение уровня глюкозы у здоровых мышей наблюдалось лишь при введении экстрактов в высоких дозах (500 мг/кг). Авторы выдвигают предположение, что такие эффекты экстракта могут быть связаны с сесквитерпеновым лактоном, предположительно ксантанолоидом,

механизм действия которого может быть схож с механизмом действия глибенкламида – лекарственного средства, применяемого в стандартной терапии сахарного диабета второго типа. Таким образом, экстракт дурнишника демонстрирует дозозависимый гипогликемический эффект, что объясняет его активное применение в китайской медицине при лечении диабета [21]. Опыты других исследователей также показали значительное снижение уровня глюкозы в крови под влиянием экстрактов дурнишника [22].

Согласно литературным данным, *X. strumarium* демонстрирует противоопухолевую активность. Так, Ирвинг Рамирез-Эроза и др. [23] исследовали активность гексанового, метанольного экстрактов, а также двух водных экстрактов (один был получен при комнатной температуре, другой – при кипячении) против трех различных линий клеток рака человека: WiDr ATCC (толстый кишечник), MDA-MB-231 ATCC (молочная железа) и NCI-417 (легкие). В исследовании оценивалась активность различных частей растения, в том числе плодов дурнишника. Для линии клеток WiDr наибольшую цитотоксичность проявили гексановый и хлороформный экстракты *X. strumarium*, а наименьшую – водный экстракт, показав процент смертности клеток 99,1; 95,7 и 40,6 % от общего числа соответственно. В отношении MDA-MB-231 наиболее эффективными оказались также гексановый (99,1 %) и хлороформный (95,8 %) экстракты, а наименее – также водный экстракт (2,7 %). Против линии NCI-417 эффективными оказались также гексановый (99,2 %) и хлороформный (95,0 %) экстракты, при этом водный экстракт оказался наиболее эффективен среди трех линий клеток (76,7 %). Таким образом наибольшую цитотоксичность проявили хлороформный и гексановый экстракты. При этом для хлороформного экстракта дурнишника обыкновенного IC_{50} составила 3,3; 6,2 и 0,1 мкг/мл для WiDr, MDA-MB-231 и NCI-417 соответственно. При изучении активности индивидуальных химических компонентов сырья дурнишника – ксантантина и ксантинозина была выявлена IC_{50} , составившая для линии клеток рака толстого кишечника $6,15 \pm 0,07$ и $2,65 \pm 0,07$ мкг/мл соответственно и для линии клеток рака молочной железы – $13,9 \pm 1,13$ и $4,8 \pm 0,56$ мкг/мл соответственно.

Анализ противораковой активности этанольного и хлороформного экстрактов дурнишника обыкновенного, собранного на Кубе, показал, что в целом хлороформное извлечение проявляет значительно большую эффективность по сравнению с этанольным в отношении линий СТ26 (мышинная карцинома толстой кишки), MDA MB 231 (клеточная линия рака молочной железы человека), MCF7 (эпителиоподобная клеточная линия, полученная из инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека) и A549 (аденокарциномные альвеолярные базальные эпителиальные клетки человека). Наибольшую цитотоксичность оба извлечения проявили в

отношении клеток линии СТ26 ($IC_{50} = 58,9 \pm 3,2$ и $25,3 \pm 1,4$ мкг/мл для этанольного и хлороформного экстрактов соответственно). Следует отметить, что в данной работе IC_{50} для MDA MB 231 составила $61,2 \pm 1,0$ и $53,3 \pm 2,3$ мкг/мл для этанольного и хлороформного извлечений соответственно [24].

В других работах проводили исследование активности экстрактов *X. strumarium* в отношении клеточной линии раковой опухоли печени HepG2 (HB-8065). Клетки подвергались воздействию экстрактов в четырех концентрациях: 40, 60, 80 и 100 мкг/мл. Показано, что экстракт снижал процент выживаемости раковых клеток при повышении концентрации, а IC_{50} составила 81,69 мкг/мл, что в сравнении с лекарственным средством камптотецином (ингибитор топоизомеразы, применяющийся для лечения различных видов рака) является весьма слабым показателем ($IC_{50} = 0,079$ мкг/мл). Через 60 ч воздействия экстракта на раковые клетки наблюдались признаки апоптоза с изменением морфологии клетки. Вышеуказанные результаты свидетельствуют о наличии у *X. strumarium* противораковой активности [25]. Результаты представленного исследования подтверждаются и другими учеными [26, 27].

Другая область фармакологического действия дурнишника относится к противовоспалительным свойствам. Так, изучен характер действия метанольного экстракта дурнишника обыкновенного на клетки, в которых продукция одного из медиаторов воспаления – оксида азота (II) (NO) – была индуцирована воздействием липополисахаридов. В результате эксперимента выявлено, что при значительном увеличении продукции NO в результате воздействия липополисахаридов метанольный экстракт ингибировал его продукцию, демонстрируя дозозависимый эффект. IC_{50} при вышеуказанных условиях составила 67,32 мкг/мл [28]. Оксид азота II синтезируется тремя различными формами нитрооксидсинтазы: нейрональной, эндотелиальной и индуцибельной (макрофагальной) (iNOS), причем первые две экспрессируются конститутивно, в то время как индуцибельная экспрессируется в ответ на интерферон γ , липополисахариды и ряд провоспалительных цитокинов [28, 29]. В данном случае увеличение содержания индуцибельной нитрооксидсинтазы свидетельствует о протекающем воспалительном процессе, а снижение ее уровня – о подавлении воспалительного процесса. В результате метанольный экстракт *X. strumarium* продемонстрировал активность в подавлении данного фермента [28, 30].

Подобно вышеуказанным эффектам, метанольный экстракт продемонстрировал высокую ингибирующую способность в отношении PGE_2 и ЦОГ-2 как основных медиаторов воспаления, синтезированных в ответ на действие липополисахаридов. Эффект был дозозависимым [28]. Метанольный экстракт дурнишника также значительно снижал вызванный каррагинаном отек задних лап у крыс [28]. Кроме того, есть

данные о снижении активности другого фермента, отвечающего за синтез медиаторов воспаления, – 5-липоксигеназы – под действием ксантата [20]. В других работах с использованием ингибирования липополисахаридов и моделирования воспаления на животных метанольный экстракт из листьев *X. strumarium* проявил противовоспалительный эффект как *in vivo*, так и *in vitro* [31]. Также описан ингибирующий эффект метанольного экстракта корней дурнишника в отношении ядерного фактора κB (NF- κB) и преобразователя сигнала и активатора транскрипции 3 (STAT 3) в мышиных макрофагах [32]. В 2015 г. было показано, что водный экстракт плодов дурнишника обыкновенного способен подавлять активацию NF- κB , ингибировать фосфорилирование таких элементов сигнальных путей воспаления, как митогенактивирующие протеинкиназы (МАРК), N-концевые (терминальные) киназы c-Jun, а также усиливать экспрессию HO-1 (гемоксигеназы-1), которая значительно снижает активность индуцибельной нитрооксидсинтазы, тем самым уменьшая воспаление [33, 34]. Позднее было обнаружено новое соединение – производное фенилпропаноидов ксантиумнол Е, проявлявшее активное ингибирующее действие на продукцию оксида азота, индуцированную липополисахаридами [35].

Аллергический ринит в настоящее время является одним из самых распространенных заболеваний развивающихся и развитых стран, которое проявляется заложенностью носа, чиханием, зудом в носу, ринореей и вызывается реакциями, опосредованными иммуноглобулином Е [36]. В целом ряде исследований изучалась эффективность извлечений из дурнишника обыкновенного против данного заболевания. Так, в одном из исследований проводили тест пассивной кожной анафилаксии и тест Шульца – Дейла, в результате которых была выявлена высокая эффективность экстракта из плодов *X. strumarium*, содержащего кофеилхинные кислоты. При этом извлечения данного растения оказались способны снизить проявление симптомов аллергического ринита у крыс и ингибировать высвобождение гистамина в тучных клетках костного мозга, что позволяет говорить о высоком потенциале применения дурнишника в терапии симптомов аллергического ринита [37].

Кроме противовоспалительных эффектов, метанольные экстракты дурнишника в эксперименте проявляли обезболивающий эффект. Эксперименты проводили *in vivo* (на мышах) с применением двух тестов: теста на сокращение мышц брюшной полости при воздействии уксусной кислоты и теста «Горячая пластина». Результаты выявили корреляцию «доза – эффект» при дозах 100 и 200 мг/кг, а тест «Горячая пластина» продемонстрировал значительное увеличение латентности реакции мышей (прыжок) при применении экстракта в тех же дозах. Указанные результаты могут свидетельствовать о периферических или центрально опосредованных обезболивающих свойствах [28].

В результате оценки антиоксидантных свойств эфирного масла дурнишника была выявлена весьма низкая способность к удалению радикалов DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), $\text{IC}_{50} = 321,93$ мкл/л (для сравнения: у аскорбиновой кислоты $\text{IC}_{50} = 35,07$ мкл/л). Столь слабая активность может быть связана с отсутствием способности терпеноидов выступать донорами водорода, а также с содержанием монотерпеноидов и сесквитерпеноидов в качестве основных компонентов масла [10]. В другой работе проводился анализ различных экстрактов (гексановый, хлороформный, водный, этилацетатный и суммарный неочищенный) на наличие антиоксидантной активности как *in vitro*, так и *in vivo*. В отношении радикалов DPPH наибольшую эффективность показал этилацетатный экстракт ($\text{IC}_{50} = 0,017 \pm 0,0004$ мг/мл), за которым следуют водный, неочищенный экстракты. Самый слабый эффект показал хлороформный экстракт ($\text{IC}_{50} = 0,234 \pm 0,017$ мг/мл), при этом неочищенный экстракт показал себя на одном уровне эффективности с синтетическим антиоксидантом бутилатгидрокситолуолом (ВНТ), использованным в качестве препарата сравнения (IC_{50} составила $0,084 \pm 0,0004$ мг/мл для экстракта и $0,087 \pm 0,001$ мг/мл для ВНТ). В ходе испытания в системе β -каротин / линолевая кислота наибольшую антиоксидантную активность продемонстрировал неочищенный экстракт (76,66 %), близкую к нему активность продемонстрировал этилацетатный экстракт (71,66 %), наименьшую активность, подобно предыдущему анализу, продемонстрировал хлороформный экстракт (22,06 %). Эти же исследователи оценили восстанавливающую активность вышеперечисленных экстрактов, в результате чего выявили картину, идентичную первому опыту с DPPH: наибольшую эффективность проявлял этилацетатный экстракт, за ним следовали водный, неочищенный и хлороформный. При этом эффективная концентрация EC_{50} этилацетатной фракции оказалась близка к значению для аскорбиновой кислоты, использовавшейся в качестве стандарта ($0,017 \pm 0,00015$ и $0,015 \pm 0,0004$ мг/мл соответственно), что свидетельствует о весьма высокой восстанавливающей способности соединений данного экстракта [38]. Значимый эффект в отношении уровня DPPH также оказал метанольный экстракт [39, 40].

В той же работе проводилось исследование антиоксидантной активности *in vivo*, причем маркерами выступали каталазная активность, содержание малонового диальдегида (МДА) (как результат перекисного окисления липидов) и глутатиона (GSH) (используется в качестве ко-субстрата для удаления перекиси водорода). Было показано, что лишь при высоких концентрациях неочищенного экстракта дурнишника (400 и 600 мг/кг) проявлялась каталазная активность, близкая к аскорбиновой кислоте (стандарт), а также провоцировалось снижение

концентрации МДА и увеличивалось содержание глутатиона [38]. Все вышеуказанные результаты свидетельствуют о потенциально высокой антиоксидантной активности сырья *X. strumarium*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая проанализированные данные литературы, можно рассматривать *Xanthium strumarium* L. не только как инвазивный и сорный вид, активно распространившийся практически по всему земному шару, но и как потенциальное лекарственное растение с богатым химическим составом. Число классов химических соединений, обнаруженных в дурнишнике, объясняет обилие исследований в области фитохимии данного вида, а также заинтересованность научного сообщества в осуществлении дальнейших фитохимических исследований. Кроме того, наличие флавоноидов, сесквитерпеновых лактонов, эфирного масла, алкалоидов, фенолкарбоновых кислот и ряда других соединений открывает значительный фармакологический потенциал сырья дурнишника как противомикробного, противовоспалительного, противоаллергического и противоопухолевого средства.

ЛИТЕРАТУРА

- Ullah R., Khan N., Hewitt N., Ali K., Jones D. A., Khan M. E. H. Invasive Species as Rivals: Invasive Potential and Distribution Pattern of *Xanthium strumarium* L. *Sustainability*. 2022;14(12):7141. DOI: 10.3390/su14127141.
- Морозова Л. В. Дурнишник обыкновенный, колючий и беловатый: ботаническое описание и перспективы их применения в фармации. В сб.: Конференция «Инновации и перспективы современной науки. Естественные науки». 09–31 января 2018. Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет»; 2018. С. 222–225.
- Масляков В. Ю., Зайко Л. Н., Гудкова Н. Ю., Кунакова Н. А., Журба О. В., Фадеев Н. Б. Полевые экспедиционные исследования лекарственных растений в ВИЛАРЕ (2008–2015). В сб.: Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ВИЛАР «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине». 23–25 июня 2016. Москва: Щербинская типография; 2016. С. 118–125.
- Бушуева Г. Р. Дурнишник обыкновенный (*Xanthium strumarium*) –перспективный источник биологически активных соединений (обзор). Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2017;2:36–46.
- Chavan S. T., Kulkarni A. U. Morphological and Phytochemical Studies on *Xanthium strumarium* L. *Plantae Scientia*. 2021;4(6):287–290. DOI: 10.32439/ps.v4i6.287-290.
- Sharifi-Rad J., Hoseini-Alfatemi S., Sharifi-Rad M., Sharifi-Rad M., Iriti M., Sharifi-Rad M., Sharifi-Rad R., Raeisi S. Phytochemical compositions and biological activities of essential oil from *Xanthium strumarium* L. *Molecules*. 2015;20(4):7034–7047. DOI: 10.3390/molecules20047034.
- Scherer R., Wagner R., Meireles M. A. A., Godoy H. T., Duarte M. C. T., Filho J. T. Biological activity and chemical composition of hydrodistilled and supercritical extracts of *Xanthium strumarium* L. leaves. *Journal of Essential Oil Research*. 2010;22(5):424–429. DOI: 10.1080/10412905.2010.9700363.
- Esmaili A., Rustaiyan A., Akbari M. T., Moazami N., Masoudi S., Amiri H. Composition of the essential oils of *Xanthium strumarium* L. and *Cetaurea solstitialis* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 2006;18(4):427–429. DOI: 10.1080/10412905.2006.9699131.
- Shkondrov A., Krasteva I., Kozuharova E., Ionkova I. Chemical composition of essential oil in fruits of *Xanthium strumarium* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2021;35(1):1474–1479. DOI: 10.1080/13102818.2021.1986426.
- El-Gawad A. A., Elshamy A., El Gendy A. E. I. N., Gaa-ra A., Assaeed A. Volatiles profiling, allelopathic activity, and antioxidant potentiality of *Xanthium strumarium* leaves essential oil from Egypt: Evidence from chemometrics analysis. *Molecules*. 2019;24(3):584. DOI: 10.3390/molecules24030584.
- Fan W., Fan L., Peng C., Zhang Q., Wang L., Li L., Wang J., Zhang D., Peng W., Wu C. Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of *Xanthium strumarium* L.: A review. *Molecules*. 2019;24(2):359. DOI: 10.3390/molecules24020359.
- Kan S., Chen G., Han C., Chen Z., Song X., Ren M., Jiang H. Chemical constituents from the roots of *Xanthium sibiricum*. *Natural Product Research*. 2011;25(13):1243–1249. DOI: 10.1080/14786419.2010.539182.
- Yen P. H., Hoang N. H., Trang D. T., Huong P. T. T., Tai B. H., Nhiem N. X., Kiem P. V. A New Thiazinedione Glycoside From the Fruits of *Xanthium strumarium* L. *Natural Product Communications*. 2021;16(7):1934578X211032082. DOI: 10.1177/1934578X211032082.
- Fan W. Xu Q., Wang L., Li L., Wang J., Wei Z., Fan L., Zhang D., Peng W., Wu C. Prediction of chemical component contents of the fruit of *Xanthium strumarium* L. during processing based on a computer vision system combined with a support vector machine. *Analytical Methods*. 2019;11(25):3260–3268. DOI: 10.1039/C9AY00637K.
- Ghahari S., Alinezhad H., Nematzadeh G. A., et al. Biochemical composition, antioxidant and biological activities of the essential oil and fruit extract of *Xanthium strumarium* Linn. from Northern Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2017;19(7):1603–1616.
- Beyatli A. Phytochemical analysis and antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of *Xanthium strumarium* L. (Asteraceae). *Turkish Journal of Biology*. 2025;49(1):127–137. DOI: 10.55730/1300-0152.2730.
- Zazharskyi V. V., Brygadyrenko V. V., Boyko O. O., Bilan M. V., Zazharska N. M. Antibacterial and anthelmintic activities of *Xanthium strumarium* (Asteraceae) extracts. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2024;15(1):129–133. DOI: 10.15421/022419.
- Sharifi-Rad J., Soufi L., Ayatollahi S. A. M., Iriti M., Sharifi-Rad M., Varoni E. M., Shahri F., Esposito S., Kuhestani K., Sharifi-Rad M. Anti-bacterial effect of essential oil from *Xanthium strumarium* against shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Biology*. 2016;62(9):69–74.
- Rad J. S., Alfatemi S. M. H., Rad M. S., Iriti M. In-vitro antioxidant and antibacterial activities of *Xanthium strumarium* L. extracts on methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ancient Science of Life*. 2013;33(2):109–113.

20. Nibret E., Youns M., Krauth-Siegel R.L., Wink M. Biological activities of xanthatin from *Xanthium strumarium* leaves. *Phytotherapy Research*. 2011;25(12):1883–1890. DOI: 10.1002/ptr.3651.
21. Mouhamad R., Allami R.H., Qader K.O., Faraj I.M., Aa S. Evaluate the influence of *Xanthium strumarium* L. Extract on blood sugar levels in healthy and diabetic mice. *Journal of Clinical Cases & Reports*. 2022;2:72-81. DOI: 10.46619/joccr.2022.5-2.1109.
22. Shaheen A., Akram S., Sharif S., Rashid A., Adnan A., Mush-taq M. Fractionation of *Xanthium strumarium* L. foliage phenolics, *in-vitro* antioxidant activities, and *in-vivo* anti-diabetic potential. *Frontiers in Chemistry*. 2023;11:1279729. DOI: 10.3389/fchem.2023.1279729.
23. Ramírez-Erosa I., Huang Y., Hickie R.A., Sutherland R.G., Barl B. Xanthatin and xanthinosin from the burs of *Xanthium strumarium* L. as potential anticancer agents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007;85(11):1160–1172. DOI: 10.1139/Y07-104.
24. Ferrer J.P., Zampini I.C., Cuello A.S., Francisco M., Romero A., Valdivia D., Gonzalez M., Salas C., Sanchez Lamar A., Isla M.I. Cytotoxic compounds from aerial organs of *Xanthium strumarium*. *Natural Product Communications*. 2016;11(3):371–374.
25. Ly H.T., Truong T.M., Nguyen T.T.H., Nguyen H.D., Zhao Y., Le V.M. Phytochemical screening and anticancer activity of the aerial parts extract of *Xanthium strumarium* L. on HepG2 cancer cell line. *Clinical Phytoscience*. 2021;7:14. DOI: 10.1186/s40816-021-00252-w.
26. Tong C., Chen R.-H., Liu D.-C., Zeng D.-S., Liu H. Chemical constituents from the fruits of *Xanthium strumarium* and their antitumor effects. *Natural Product Communications*. 2020;15(8):1934578X20945541. DOI: 10.1177/1934578X20945541.
27. Al-Mekhlafi F.A., Abutaha N., Mashaly A.M.A., Nasr F.A., Ibrahim K.E., Wadaan M.A. Biological activity of *Xanthium strumarium* seed extracts on different cancer cell lines and *Aedes caspius*, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017;24(4):817–821. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.07.003.
28. Kim I.-T., Park Y.-M., Won J.-H., Jung H.-J., Park H.-J., Choi J.-W., Lee K.-T. Methanol extract of *Xanthium strumarium* L. possesses anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(1):94–100. DOI: 10.1248/bpb.28.94.
29. Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Борисова Т.П. Активированные азотсодержащие метаболиты организма человека при заболеваниях органов дыхания. Генераторы и генерация (часть 1). *Теоретическая медицина*. 2015;6(66):147–152.
30. Khuda F., Iqbal Z., Khan A., Zakiullah, Shah Y., Ahmad L., Nasir F., Hassan M., Ismail, Shah W.A. Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;27(2):365–368.
31. Hossen M.J., Cho J.Y., Kim D. PDK1 in NF- κ B signaling is a target of *Xanthium strumarium* methanolic extract-mediated anti-inflammatory activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;190:251–260. DOI: 10.1016/j.jep.2016.06.019.
32. Ju A., Cho Y.-C., Cho S. Methanol extracts of *Xanthium sibiricum* roots inhibit inflammatory responses via the inhibition of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;174:74–81. DOI: 10.1016/j.jep.2015.07.038.
33. Yeom M., Kim J.-H., Min J.-H., Hwang M.K., Jung H.-S., Sohn Y. *Xanthii fructus* inhibits inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through suppressing NF- κ B and JNK/p38 MAPK. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;176:394–401. DOI: 10.1016/j.jep.2015.11.020.
34. Jiang H., Jiang H., Yang L., Xing X.D., Yan M.L., Guo X.Y., Su X.L., Sun Y.P., Yang B.Y., Wang Q.H., Kuang H.X. Chemical constituents of terpenoids from *Xanthium strumarium*. *Chinese Traditional Patent Medicine*. 2018;40:2461–2466.
35. Hossen M.J., Kim M.-Y., Cho J.Y. MAPK/AP-1-targeted anti-inflammatory activities of *Xanthium strumarium*. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2016;44(6):1111–1125. DOI: 10.1142/S0192415X16500622.
36. Bousquet J., Anto J.M., Bachert C., Baiardini I., Bosnic-Anticevich S., Canonica G.W., Melén E., Palomares O., Scadding G.K., Togias A., Toppila-Salmi S. Allergic rhinitis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1):95. DOI: 10.1038/s41572-020-00227-0.
37. Peng W., Han P., Yu L., Chen Y., Ye B., Qin L., Xin H., Han T. Anti-allergic rhinitis effects of caffeoylquinic acids from the fruits of *Xanthium strumarium* in rodent animals via alleviating allergic and inflammatory reactions. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019;29(1):46–53. DOI: 10.1016/j.bjp.2018.10.004.
38. Guemmaz T., Zerargui F., Boumerfeg S., Arrar L., Aouachria S., Khennouf S., Charef N., Baghiani A. Anti-hemolytic, anti-lipid peroxidation, antioxidant properties and acute toxicity of *Xanthium strumarium* leaves extracts. *Annual Research & Review in Biology*. 2018;24(3):1–12. DOI: 10.9734/ARRB/2018/40024.
39. Ingawale A.S., Sadiq M.B., Nguyen L.T., Ngan T.B. Optimization of extraction conditions and assessment of antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antimicrobial activities of *Xanthium strumarium* L. fruits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018;14:40–47. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.02.004.
40. Malpani M.O., Rajput P.R., Chinchole K.V., Kapse S.S., Ambarkar K.S. Phytochemical screening and antioxidant activity of extracts of *Xanthium strumarium*, *Chrysanthemum* and their mixture. *Rasayan Journal of Chemistry*. 2019;12(4):1901–1908. DOI: 10.31788/RJC.2019.1245447.

REFERENCES

1. Ullah R., Khan N., Hewitt N., Ali K., Jones D.A., Khan M.E.H. Invasive Species as Rivals: Invasive Potential and Distribution Pattern of *Xanthium strumarium* L. *Sustainability*. 2022;14(12):7141. DOI: 10.3390/su14127141.
2. Morozova L.V. Common, prickly and whitish cocklebur: botanical description and prospects of their use in pharmacy. In: Conference "Innovations and Prospects of Modern Science. Natural Sciences". 9–31 January 2018. Astrakhan: Publishing House "Astrakhanskii universitet"; 2018. P. 222–225. (In Russ.)
3. Maslyakov V.Yu., Zaiko L.N., Gudkova N.Yu., Kunakova N.A., Zhurba O.V., Fadeev N.B. Field expeditionary studies of medicinal plants in VILAR (2008–2015). In: Collection of scientific papers of the International scientific and practical conference dedicated to the 85th anniversary

- sary of VILAR "Biological features of medicinal and aromatic plants and their role in medicine". 23–25 June 2016. Moscow: Shcherbinskaya tipografiya; 2016. P. 118–125. (In Russ.)
4. Bushueva G. R. *Xanthium strumarium* – a promising source of biologically active compounds (review). *Voprosy obespecheniia kachestva lekarstvennykh sredstv*. 2017;2:36–46. (In Russ.)
5. Chavan S. T., Kulkarni A. U. Morphological and Phytochemical Studies on *Xanthium strumarium* L. *Plantae Scientia*. 2021;4(6):287–290. DOI: 10.32439/ps.v4i6.287-290.
6. Sharifi-Rad J., Hoseini-Alfatemi S., Sharifi-Rad M., Sharifi-Rad M., Iriti M., Sharifi-Rad M., Sharifi-Rad R., Raeisi S. Phytochemical compositions and biological activities of essential oil from *Xanthium strumarium* L. *Molecules*. 2015;20(4):7034–7047. DOI: 10.3390/molecules20047034.
7. Scherer R., Wagner R., Meireles M. A. A., Godoy H. T., Duarte M. C. T., Filho J. T. Biological activity and chemical composition of hydrodistilled and supercritical extracts of *Xanthium strumarium* L. leaves. *Journal of Essential Oil Research*. 2010;22(5):424–429. DOI: 10.1080/10412905.2010.9700363.
8. Esmaeili A., Rustaiyan A., Akbari M. T., Moazami N., Masoudi S., Amiri H. Composition of the essential oils of *Xanthium strumarium* L. and *Cetaurea solstitialis* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 2006;18(4):427–429. DOI: 10.1080/10412905.2006.9699131.
9. Shkondrov A., Krasteva I., Kozuharova E., Ionkova I. Chemical composition of essential oil in fruits of *Xanthium strumarium* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2021;35(1):1474–1479. DOI: 10.1080/13102818.2021.1986426.
10. El-Gawad A. A., Elshamy A., El Gendy A. E. I. N., Gaa-ra A., Assaeed A. Volatiles profiling, allelopathic activity, and antioxidant potentiality of *Xanthium strumarium* leaves essential oil from Egypt: Evidence from chemometrics analysis. *Molecules*. 2019;24(3):584. DOI: 10.3390/molecules24030584.
11. Fan W., Fan L., Peng C., Zhang Q., Wang L., Li L., Wang J., Zhang D., Peng W., Wu C. Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of *Xanthium strumarium* L.: A review. *Molecules*. 2019;24(2):359. DOI: 10.3390/molecules24020359.
12. Kan S., Chen G., Han C., Chen Z., Song X., Ren M., Jiang H. Chemical constituents from the roots of *Xanthium sibiricum*. *Natural Product Research*. 2011;25(13):1243–1249. DOI: 10.1080/14786419.2010.539182.
13. Yen P. H., Hoang N. H., Trang D. T., Huong P. T. T., Tai B. H., Nhiem N. X., Kiem P. V. A New Thiazinedione Glycoside From the Fruits of *Xanthium strumarium* L. *Natural Product Communications*. 2021;16(7):1934578X211032082. DOI: 10.1177/1934578X211032082.
14. Fan W. Xu Q., Wang L., Li L., Wang J., Wei Z., Fan L., Zhang D., Peng W., Wu C. Prediction of chemical component contents of the fruit of *Xanthium strumarium* L. during processing based on a computer vision system combined with a support vector machine. *Analytical Methods*. 2019;11(25):3260–3268. DOI: 10.1039/C9AY00637K.
15. Ghahari S., Alinezhad H., Nematzadeh G. A., et al. Biochemical composition, antioxidant and biological activities of the essential oil and fruit extract of *Xanthium strumarium* Linn. from Northern Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2017;19(7):1603–1616.
16. Beyatli A. Phytochemical analysis and antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of *Xanthium strumarium* L. (Asteraceae). *Turkish Journal of Biology*. 2025;49(1):127–137. DOI: 10.55730/1300-0152.2730.
17. Zazharsky V. V., Brygadyrenko V. V., Boyko O. O., Bilan M. V., Zazharska N. M. Antibacterial and anthelmintic activities of *Xanthium strumarium* (Asteraceae) extracts. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2024;15(1):129–133. DOI: 10.15421/022419.
18. Sharifi-Rad J., Soufi L., Ayatollahi S. A. M., Iriti M., Sharifi-Rad M., Varoni E. M., Shahri F., Esposito S., Kuhestani K., Sharifi-Rad M. Anti-bacterial effect of essential oil from *Xanthium strumarium* against shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Biology*. 2016;62(9):69–74.
19. Rad J. S., Alfatemi S. M. H., Rad M. S., Iriti M. In-vitro antioxidant and antibacterial activities of *Xanthium strumarium* L. extracts on methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ancient Science of Life*. 2013;33(2):109–113.
20. Nibret E., Youns M., Krauth-Siegel R. L., Wink M. Biological activities of xanthatin from *Xanthium strumarium* leaves. *Phytotherapy Research*. 2011;25(12):1883–1890. DOI: 10.1002/ptr.3651.
21. Mouhamad R., Allami R. H., Qader K. O., Faraj I. M., Aa S. Evaluate the influence of *Xanthium strumarium* L. Extract on blood sugar levels in healthy and diabetic mice. *Journal of Clinical Cases & Reports*. 2022;2:72-81. DOI: 10.46619/joccr.2022.5-2.1109.
22. Shaheen A., Akram S., Sharif S., Rashid A., Adnan A., Mush-taq M. Fractionation of *Xanthium strumarium* L. foliage phenolics, *in-vitro* antioxidant activities, and *in-vivo* anti-diabetic potential. *Frontiers in Chemistry*. 2023;11:1279729. DOI: 10.3389/fchem.2023.1279729.
23. Ramírez-Erosa I., Huang Y., Hickie R. A., Sutherland R. G., Barl B. Xanthatin and xanthinosin from the burs of *Xanthium strumarium* L. as potential anticancer agents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007;85(11):1160–1172. DOI: 10.1139/Y07-104.
24. Ferrer J. P., Zampini I. C., Cuello A. S., Francisco M., Romero A., Valdivia D., Gonzalez M., Salas C., Sanchez Lamar A., Isla M. I. Cytotoxic compounds from aerial organs of *Xanthium strumarium*. *Natural Product Communications*. 2016;11(3):371–374.
25. Ly H. T., Truong T. M., Nguyen T. T. H., Nguyen H. D., Zhao Y., Le V. M. Phytochemical screening and anticancer activity of the aerial parts extract of *Xanthium strumarium* L. on HepG2 cancer cell line. *Clinical Phytoscience*. 2021;7:14. DOI: 10.1186/s40816-021-00252-w.
26. Tong C., Chen R.-H., Liu D.-C., Zeng D.-S., Liu H. Chemical constituents from the fruits of *Xanthium strumarium* and their antitumor effects. *Natural Product Communications*. 2020;15(8):1934578X20945541. DOI: 10.1177/1934578X20945541.
27. Al-Mekhlafi F. A., Abutaha N., Mashaly A. M. A., Nasr F. A., Ibrahim K. E., Wadaan M. A. Biological activity of *Xanthium strumarium* seed extracts on different cancer cell lines and *Aedes caspius*, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017;24(4):817–821. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.07.003.
28. Kim I.-T., Park Y.-M., Won J.-H., Jung H.-J., Park H.-J., Choi J.-W., Lee K.-T. Methanol extract of *Xanthium stru-*

- marium* L. possesses anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(1):94–100. DOI: 10.1248/bpb.28.94.
29. Abaturov A. E., Volosovets A. P., Borysova T. P. Activated nitrogen-containing metabolites of the human body in respiratory diseases. Generators and generation (part 1). *Theoretical Medicine*. 2015;6(66):147–152. (In Russ.)
30. Khuda F., Iqbal Z., Khan A., Zakiullah, Shah Y., Ahmad L., Nasir F., Hassan M., Ismail, Shah W. A. Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;27(2):365–368.
31. Hossen M. J., Cho J. Y., Kim D. PDK1 in NF- κ B signaling is a target of *Xanthium strumarium* methanolic extract-mediated anti-inflammatory activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;190:251–260. DOI: 10.1016/j.jep.2016.06.019.
32. Ju A., Cho Y.-C., Cho S. Methanol extracts of *Xanthium sibiricum* roots inhibit inflammatory responses via the inhibition of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;174:74–81. DOI: 10.1016/j.jep.2015.07.038.
33. Yeom M., Kim J.-H., Min J.-H., Hwang M. K., Jung H.-S., Sohn Y. *Xanthii fructus* inhibits inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through suppressing NF- κ B and JNK/p38 MAPK. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;176:394–401. DOI: 10.1016/j.jep.2015.11.020.
34. Jiang H., Jiang H., Yang L., Xing X. D., Yan M. L., Guo X. Y., Su X. L., Sun Y. P., Yang B. Y., Wang Q. H., Kuang H. X. Chemical constituents of terpenoids from *Xanthium strumarium*. *Chinese Traditional Patent Medicine*. 2018;40:2461–2466.
35. Hossen M. J., Kim M.-Y., Cho J. Y. MAPK/AP-1-targeted anti-inflammatory activities of *Xanthium strumarium*. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2016;44(6):1111–1125. DOI: 10.1142/S0192415X16500622.
36. Bousquet J., Anto J. M., Bachert C., Baiardini I., Bosnic-Anticevich S., Canonica G. W., Melén E., Palomares O., Scadding G. K., Togias A., Toppila-Salmi S. Allergic rhinitis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1):95. DOI: 10.1038/s41572-020-00227-0.
37. Peng W., Han P., Yu L., Chen Y., Ye B., Qin L., Xin H., Han T. Anti-allergic rhinitis effects of caffeoylquinic acids from the fruits of *Xanthium strumarium* in rodent animals via alleviating allergic and inflammatory reactions. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019;29(1):46–53. DOI: 10.1016/j.bjp.2018.10.004.
38. Guemmaz T., Zerargui F., Boumerfeg S., Arrar L., Aouachria S., Khennouf S., Charef N., Baghiani A. Anti-hemolytic, anti-lipid peroxidation, antioxidant properties and acute toxicity of *Xanthium strumarium* leaves extracts. *Annual Research & Review in Biology*. 2018;24(3):1–12. DOI: 10.9734/ARRB/2018/40024.
39. Ingawale A. S., Sadiq M. B., Nguyen L. T., Ngan T. B. Optimization of extraction conditions and assessment of antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antimicrobial activities of *Xanthium strumarium* L. fruits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018;14:40–47. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.02.004.
40. Malpani M. O., Rajput P. R., Chinchole K. V., Kapse S. S., Ambarkar K. S. Phytochemical screening and antioxidant activity of extracts of *Xanthium strumarium*, *Chrysanthemum* and their mixture. *Rasayan Journal of Chemistry*. 2019;12(4):1901–1908. DOI: 10.31788/RJC.2019.1245447.



Разработка, характеристика, трансфер банков клеток на основе *Escherichia coli* для производства биофармацевтических препаратов (обзор)

Е. А. Буслаева¹✉, С. А. Аликина², З. Р. Хасаншина^{1,2}, Л. М. Кряжевских¹,
А. Н. Кучеренко¹, Р. В. Драй¹

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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (НИУ ИТМО). 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, д. 49, литера А

✉ Контактное лицо: Буслаева Евгения Александровна. E-mail: evgeniia.buslaeva@geropharm.com

ORCID: Е. А. Буслаева – <https://orcid.org/0009-0000-4389-8605>;
С. А. Аликина – <https://orcid.org/0009-0006-9504-7961>;
З. Р. Хасаншина – <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>;
Л. М. Кряжевских – <https://orcid.org/0009-0005-9519-4489>;
А. Н. Кучеренко – <https://orcid.org/0009-0003-9134-9944>;
Р. В. Драй – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

Статья поступила: 26.03.2025

Статья принята в печать: 04.08.2025

Статья опубликована: 05.08.2025

Резюме

Введение. На международном фармацевтическом рынке важное место занимают биопрепараты, созданные с использованием методов рекомбинантной ДНК. Сегодня бактериальные штаммы и клеточные линии млекопитающих широко используются для производства рекомбинантных белков, моноклональных антител и вакцин. Для того чтобы поддерживать постоянное качество и однородность исходного посевного материала, создаются банки клеток.

Текст. Основные рекомендации по разработке банков клеток изложены в руководствах, касающихся качества лекарственных препаратов, ICH Q5. В России аналогичные требования представлены в решении Совета Евразийской экономической комиссии № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». В соответствии с вышеуказанными рекомендациями возможно формирование одно- или двухуровневой системы банка клеток. Первым шагом должно быть создание главного банка клеток (ГБК), который создается в соответствии с высокими стандартами качества. ГБК следует инициировать из одной хорошо охарактеризованной бактериальной колонии. Следующим шагом будет создание рабочего банка клеток (РБК) из одного или нескольких контейнеров ГБК. В связи с тем, что все РБК созданы на основе хорошо охарактеризованных ГБК, их характеристика может быть сокращена. При характеристике оценивается идентичность, чистота и стабильность банков клеток. Рекомендации для проведения тестов представлены в нормативных документах. Тесты на идентичность подтверждают, что клетки в банке точно идентифицированы и соответствуют предполагаемой клеточной линии. Это крайне важно для предотвращения перекрестной контаминации и обеспечения использования соответствующих клеточных линий в производственных процессах. Оценка чистоты проводится с целью подтверждения отсутствия контаминантов, таких как бактерии, грибы и микоплазмы, в составе клеточной линии. Контроль микробиологической чистоты является ключевым компонентом оценки и гарантирует, что в производственном процессе используются клетки, свободные от контаминантов. Характеристика клеточных банков позволяет оценить генетическую стабильность клеток с течением времени. Это включает в себя оценку того, сохраняют ли клетки свои предполагаемые генетические характеристики и не подвергаются ли нежелательным мутациям во время культивирования. При трансфере технологии производитель также должен предоставить полную информацию о характеристике банков клеток.

Заключение. В данной статье изложены основные принципы разработки, характеристики и трансфера банков клеток на основе бактериальной системы экспрессии.

Ключевые слова: главный банк клеток, рабочий банк клеток, ICH, система экспрессии, характеристика

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

Вклад авторов. Е. А. Буслаева и С. А. Аликина – проведение обзора литературы, сбор информации, написание основного текста статьи. З. Р. Хасаншина – формулирование основной концепции статьи, редактирование текста статьи. Л. М. Кряжевских и А. Н. Кучеренко – проведение обзора литературы, согласование итогового варианта статьи. Р. В. Драй – определение основного направления исследования, утверждение окончательной версии статьи.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Спонсор не оказывал влияния на ход исследования и интерпретацию результатов.

Для цитирования: Буслаева Е. А., Аликина С. А., Хасаншина З. Р., Кряжевских Л. М., Кучеренко А. Н., Драй Р. В. Разработка, характеристика, трансфер банков клеток на основе *Escherichia coli* для производства биофармацевтических препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):71–81. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2064>

Escherichia coli cell bank: development, characterization, and transfer for biopharmaceutical medicines production (review)

Eugenia A. Buslaeva¹✉, Svetlana A. Alikina², Zukhra R. Khasanshina^{1,2}, Larisa M. Kriazhevskikh¹, Anastasiya N. Kucherenko¹, Roman V. Drai¹

¹ Closed Joint Stock Company "Pharm-Holding". 34A, Svyazi str., Strelina settlement, Saint-Petersburg, 198515, Russia

² Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics. 49A, Kronverksky prospect, Saint-Petersburg, 197101, Russia

✉ **Corresponding author:** Eugenia A. Buslaeva. **E-mail:** evgeniia.buslaeva@geropharm.com

ORCID: Eugenia A. Buslaeva – <https://orcid.org/0009-0000-4389-8605>;
Svetlana A. Alikina – <https://orcid.org/0009-0006-9504-7961>;
Zukhra R. Khasanshina – <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>;
Larisa M. Kriazhevskikh – <https://orcid.org/0009-0005-9519-4489>;
Anastasiya N. Kucherenko – <https://orcid.org/0009-0003-9134-9944>;
Roman V. Drai – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

Received: 26.03.2025

Accepted: 04.08.2025

Published: 05.08.2025

Abstract

Introduction. Biological medicines produced using recombinant DNA technology play an important role in the international pharmaceutical market. Currently, bacterial and mammalian expression systems are widely used to produce recombinant proteins, monoclonal antibodies, and vaccines. To maintain the quality and stability of inoculation, cell banks are generated.

Text. The general recommendations for cell bank development are outlined in the ICH Q5 guidelines. In the Russian Federation, similar requirements are specified in Decision No. 89 of the Council of the Eurasian Economic Commission "On approval of the Rules for assessments of biological medicines in the EAEU". Based on these requirements, one- or two-level cell banks should be established. Initially, a Master cell bank (MCB) is generated from a well-characterized single-cell bacterial colony according to high-quality standards. Subsequently, a Working cell bank (WCB) is created from one or several well-characterized MCB cryovials. As a result, the number of parameters required for WCB characterization can be reduced. The identity, purity, and stability of the cell bank should be determined. Requirements for cell bank characterization are detailed in official guidelines. An identity test is used to confirm the cell line or strain identification, which is a critical step to prevent cross-contamination and ensure the correct cell line in manufacturing processes. The absence of bacterial, fungal, or other types of contamination is demonstrated through purity testing. The sterility test is a key component, ensuring that a pure cell is used. The stability test demonstrates the genetic stability of the cells, including the preservation of genetic characteristics and the monitoring of harmful mutations during cultivation processes. Comprehensive data on the cell bank history, development, and characterization should be provided during its transfer.

Conclusion. This research presents the general concept of microbial cell bank development, characterization, and transfer based on bacterial expression systems.

Keywords: master cell bank, working cell bank, ICH, expression system, characterization

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. Eugenia A. Buslaeva and Svetlana A. Alikina – literature review, data analysis, writing. Zukhra R. Khasanshina – conceptualization, writing, review and editing. Larisa M. Kriazhevskikh and Anastasiya N. Kucherenko – literature review, writing, review and editing. Roman V. Drai – supervision, approval of final text.

Acknowledgment. This work was carried out with financial support from GEROPHARM. The sponsor did not influence the research's course or the interpretation of its results.

For citation: Buslaeva E. A., Alikina S. A., Khasanshina Z. R., Kriazhevskikh L. M., Kucherenko A. N., Drai R. V. *Escherichia coli* cell bank: development, characterization, and transfer for biopharmaceutical medicines production. *Drug development & registration*. 2025;14(3):71–81. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2064>

ВВЕДЕНИЕ

На международном фармацевтическом рынке выделяется группа высокоэффективных препаратов, полученных с использованием методов рекомбинантной ДНК. В начале 1982 года был одобрен первый генно-инженерный лекарственный препарат – рекомбинантный инсулин, который производился с помощью экспрессионной системы *Escherichia coli* [1, 2]. Это позволило получить новый надежный и постоянный источник инсулина для больных сахарным диабетом. Бактериальные штаммы по-прежнему широко используются для получения рекомбинантных белков и вакцин [3]. В конце 1980-х годов клеточные линии млекопитающих стали использоваться для получения рекомбинантных моноклональных антител и некоторых белков [4]. В период с 2014 по 2018 год в США и Европейском союзе было одобрено 155 биофармацевтических препаратов [5]. В настоящее время по всему миру продается более 300 биологических препаратов для терапии таких заболеваний, как нарушение обмена веществ (например, диабет 1 и 2 типа, гипогликемия), гематологические расстройства (например, анемия и хроническая болезнь почек, гемофилия А, геморрагический диатез, связанный с нарушениями свертываемости крови), а также в онкологии (например, меланома, рак молочной железы) [6–8].

Создание терапевтических белков включает несколько ключевых этапов (выбор системы экспрессии, культивирование клеток, создание банков клеток, выделение и очистка белка, разработка готовой лекарственной формы, тестирование безопасности и эффективности, регистрация и выпуск на рынок, полномасштабное производство) и является сложным и длительным процессом [6]. Разработка биопрепаратов требует значительных финансовых вложений, так как их применение часто предполагает многократное введение доз в течение длительного времени. Это связано с необходимостью производства больших объемов лекарственного вещества, которое должно оставаться доступным по цене. Для этого важно снизить производственные затраты и с время производства. Такие меры необходимы, чтобы продукт соответствовал клиническим стандартам и был успешно выведен на рынок [9].

Выбор подходящей системы экспрессии и вектора экспрессии является ключевым этапом в производстве рекомбинантных препаратов. Линии клеток, штаммы-продуценты, называемые клеточными субстратами, используемыми для производства биологических препаратов, могут быть клетками млекопитающих, дрожжей, насекомых, бактерий, грибов [10–12]. Данные субстраты являются источниками банков клеток и основным исходным материалом, который используется для производства активной фармацевтической субстанции [13]. Чтобы обеспечить посто-

янный источник клеток для производственного процесса, банки клеток должны быть созданы и поддерживаться в соответствии со строгими требованиями стандартов качества, производства и регулирования. Таким образом, банк клеток является критически важным исходным сырьем для производства биологических активных фармацевтических субстанций^{1, 2, 3, 4} [14]. В данном обзоре представлены ключевые подходы к созданию и поддержанию банков клеток *E. coli*.

Система банков клеток

В процессе производства биотехнологических препаратов бактериальная культура не ферментируется непрерывно, поскольку есть риск контаминации производственного штамма другими биологическими материалами, а также вероятность спонтанного мутагенеза, что может привести к потере стабильности штамма. Для предотвращения подобных ситуаций была разработана система банков клеток. Эта система позволяет получать один и тот же исходный материал на протяжении всего производственного процесса, сохраняя его в неизменном и неповрежденном виде [14].

Общие требования к производству биофармацевтических препаратов, начиная от создания банков клеток и заканчивая регистрацией лекарственных средств, содержатся в стандартах ICH (The International Council for Harmonisation). ICH предоставляет производителям рекомендации по производству безопасных и эффективных лекарственных средств⁵. В России аналогичные требования представлены в решении Совета Евразийской экономической комиссии № 89 «Об утверждении Правил проведения исследо-

¹ FDA Q11 Development and Manufacture of Drug Substances. Available at: <https://www.fda.gov/media/80909/download> Accessed: 17.07.2025.

² FDA Characterization and Qualification of Cell Substrate and other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications, Guidance for Industry. Available at: <https://www.fda.gov/media/78428/download> Accessed: 17.07.2025.

³ ICH guideline Q5D Derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-and-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnologicalbiological-products-step-5_en.pdf Accessed: 17.07.2025.

⁴ ICH guideline Q5B Quality of Biotechnological Products: Analysis of Expression Construct in Cell Lines Used for Production of r-DNA Derived Protein Products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-b-analysis-expression-construct-cell-lines-used-production-r-dna-derived-protein-products-step-5_en.pdf Accessed: 17.07.2025.

⁵ European Medicines Agency. Presentation – Manufacturing Process of Biologics. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-manufacturing-process-biologics-kovid-ho-afssaps_en.pdf Accessed: 17.07.2025.

ваний биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»¹.

Этапу создания банков клеток предшествует этап разработки штамма, который состоит из получения рекомбинантного вектора с геном интереса, трансформации штамма-хозяина и отбора клона с соответствующими характеристиками методом засева на селективную среду. После того как была выбрана подходящая система экспрессии, которая гарантирует высокую и постоянную экспрессию рекомбинантного белка, необходимо создать полностью описанные и охарактеризованные банки клеток, чтобы гарантировать наличие достаточного запаса эквивалентных клеток для использования в течение всего срока жизни продукта (рисунок 1)^{2, 3, 4, 5, 6, 7, 8} [15]. В соответствии

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии №89 от 3 ноября 2016 года «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0089/>. Ссылка активна на 17.07.2025.

² ICH guideline Q5A(R2) on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-r2-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-or-animal-origin-step-2b_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

³ ICH guideline Q5E Comparability of Biotechnological/Biological Products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-e-comparability-biotechnologicalbiological-products-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

⁴ ICH guideline Q5C Stability testing of biotechnological/biological products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-topic-q-5-c-quality-biotechnological-products-stability-testing-biotechnologicalbiological-products_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

⁵ ICH guideline Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-and-acceptance-criteria-biotechnologicalbiological-products-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

⁶ ICH guideline Q11 Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities). Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q11-development-and-manufacture-drug-substances-chemical-entities-and-biotechnologicalbiological-entities_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

⁷ ICH guideline Q8 (R2) Pharmaceutical development. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-considerations-ich-guideline-q8-r2-pharmaceutical-development-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

⁸ ICH guideline Q7 Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-7-good-manufacturing-practice-active-pharmaceutical-ingredients-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

с рекомендациями, содержащимися в ICH Q5D и решении Совета ЕЭК № 89, возможно создание одно- или двухуровневой системы банка клеток. Двухуровневая система банков клеток является наилучшим подходом для непрерывного производства продукта^{9, 10, 11}.

Наиболее важные рекомендации по созданию банков клеток собраны в ICH Q5B и ICH Q5D, а также в решении Совета ЕЭК № 89. Система банков клеток обеспечивает идентичность популяции клеток, что критически важно для создания однородных биотехнологических продуктов. Правильно подготовленный, документировано описанный, надлежащим образом хранимый и охарактеризованный банк клеток обеспечивает однородность исходного материала на всех этапах производства. Банки клеток создаются в соответствии с GMP (надлежащая производственная практика) или приобретаются из внешних источников [например, организации ATCC (American Type Culture Collection) и ВКМ (Всероссийская коллекция микроорганизмов)]. После получения банк клеток подлежит обязательной характеристике, за качество которой несет ответственность производитель независимо от источника происхождения.

На этапе разработки лекарственных средств формируется предварительный банк клеток (Preliminary cell bank, ПБК). Он создается из одной хорошо изолированной бактериальной колонии, полученной в результате трансформации бактериального штамма-хозяина с выбранным вектором экспрессии на среде с добавлением селективного маркера, например антибиотика. ПБК формируется до создания главного банка клеток (ГБК)¹². Несмотря на то, что ПБК может быть получен вне стандартов GMP, для него проводится полная характеристика в объеме, сопоставимом с характеристикой ГБК.

⁹ ICH guideline M4Q(R1) Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Quality. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m4q-common-technical-document-registration-pharmaceuticals-human-use-quality-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

¹⁰ ICH guideline Q9 on quality risk management. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich-guideline-q9-quality-risk-management-step-5-first-version_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

¹¹ ICH guideline Q10 Pharmaceutical quality system. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich-guideline-q10-pharmaceutical-quality-system-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

¹² European Pharmacopoeia 5.0. 5.2.3. Cell Substrates for the Production of Vaccines for Human Use. Available at: <http://www.uspbpep.com/ep50/5.2.3.%20Cell%20substrates%20for%20the%20production%20of%20vaccines%20for%20human%20use.pdf>. Accessed: 17.07.2025.

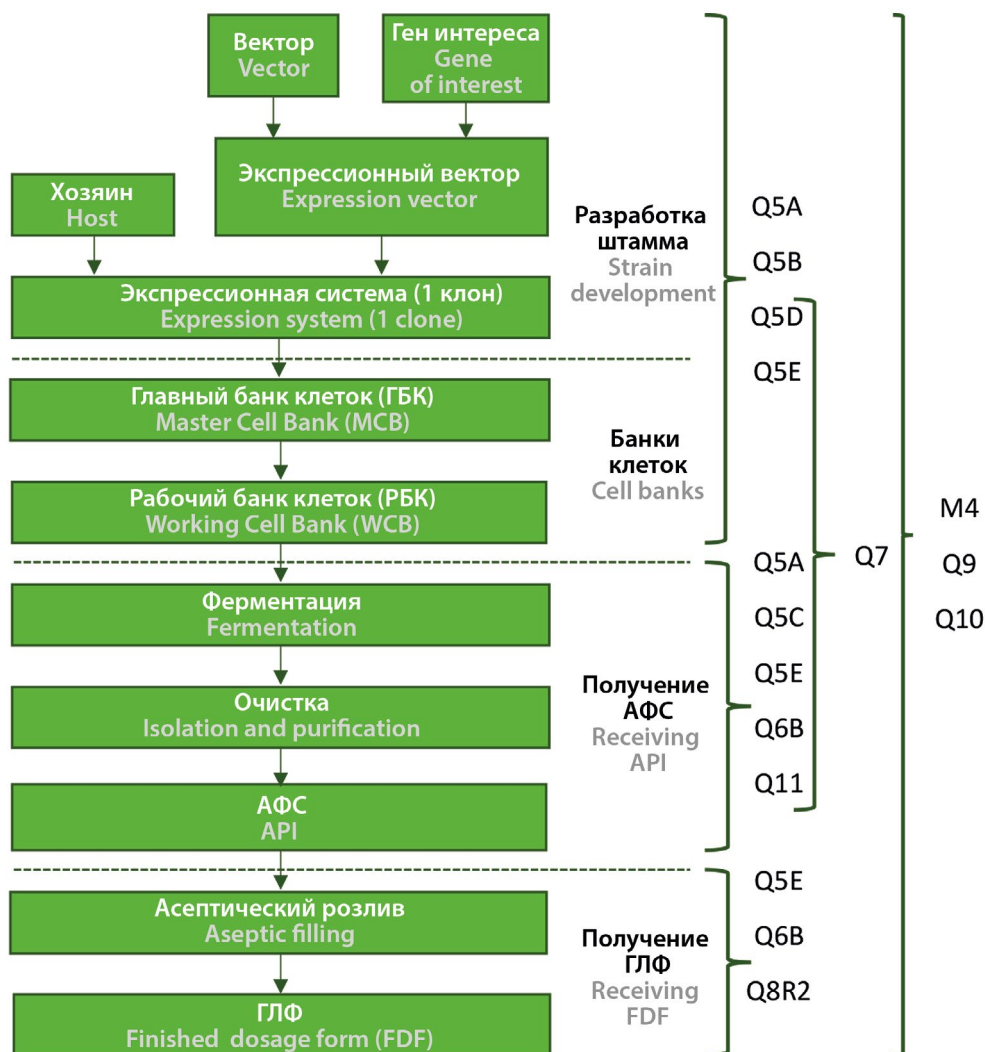


Рисунок 1. Этапы разработки биофармацевтических препаратов

Figure 1. Biopharmaceutical medicines development stages

На следующем этапе создается главный банк клеток (Master cell bank, ГБК). ГБК должен быть сформирован до начала производства серии, предназначенной для проведения 1 фазы клинических исследований, поэтому рекомендуется начать его создание сразу после выбора клона¹. Данный этап может продолжаться параллельно с подготовкой и характеризацией ГБК. Для непосредственного клинического применения биомолекулы она должна быть произведена на предприятии, соответствующем требованиям GMP, начиная с ГБК, изготовленного в условиях GMP [15]. ГБК, как правило, создается непосредственно из

исходного клона или из предварительного банка клеток. Во время формирования ГБК следует принимать все меры предосторожности, чтобы избежать контаминации. Количество контейнеров с культурой должно быть таким, чтобы обеспечить достаточное количество однородного исходного материала для всего производственного процесса. До начала использования главный банк клеток подлежит обязательной полной характеристике [16].

Далее на основе одного или нескольких контейнеров из ГБК создается рабочий банк клеток (Working cell bank, РБК). Рабочий банк клеток представляет собой клеточный материал, который используется непосредственно на производственном процессе. РБК используется для получения серий продукта для проведения 2 и 3 фаз клинических исследований и для последующего коммерческого производства. По мере исчерпания объема РБК в процессе производст-

¹ Cell Banking in the Spotlight: Advising Biologics Developers About Cell Bank Preparation and Characterization. Available at: <https://www.bioprocessintl.com/cell-line-development/cell-banking-in-the-spotlight-advising-biologics-developers-about-cell-bank-preparation-and-characterization>. Accessed: 17.07.2025.

ва для создания нового банка используется другой замороженный контейнер из ГБК [17]. В рекомендациях ICH Q5D указано, что банки клеток ГБК и РБК могут отличаться друг от друга по определенным параметрам, например составу культуральной среды и условиям культивирования. Однако такие отличия не должны оказывать неблагоприятное воздействие на качество лекарственного препарата. В процессе производства обычно формируется около 100 контейнеров ГБК и 100–500 контейнеров РБК [6].

На завершающем этапе производства на основе рабочего банка клеток создается послепроизводственный банк (End of Production, EoPC). Послепроизводственный банк клеток включает клетки, которые были культивированы до числа пассажей, сопоставимого или превышающего максимальное количество пассажей, используемое в производственном процессе¹ [18, 19]. На каждой производственной площадке создается собственный банк EoPC (клеток конца производства) и выполняется его однократное тестирование для подтверждения сохранения правильной кодирующей последовательности продукта на всех этапах производства [18]. Генетическая последовательность рекомбинантных белков может подвергаться мутациям, что потенциально влияет на структуру, функциональные свойства белка и, как следствие, на его эффективность и безопасность для пациентов. В EoPC важно подтвердить генетическую стабильность и соответствие характеристик исходной клеточной линии. Таким образом, данный банк клеток предназначен для подтверждения стабильности клеточной линии в течение всего жизненного цикла продукта. Кроме того, полученный охарактеризованный банк клеток служит резервным или справочным материалом для будущих производственных процессов.

Если потребуется создать новые банки клеток, на них будут проведены все необходимые тесты, что и для соответствующих банков, включая оценку однородности банка, роста, производительности и вирусной/микробной безопасности. Затем новый банк должен пройти сравнительное исследование для подтверждения того, что его характеристики соответствуют характеристикам предшественника. Процесс создания банков клеток представлен на рисунке 2.

Таким образом, основная задача ГБК – обеспечение достаточного запаса хорошо охарактеризованного источника клеток для производства. Количество наработанного банка клеток зависит от коэффициента использования, на который влияет спрос на продукт. Одноуровневый банк клеток может быть использован в том случае, когда для производства препарата требуется небольшое количество контейнеров.

¹ United States Pharmacopeia. Cell Banking Practices for Recombinant Biologics. Available at: <https://www.usp.org>. Accessed: 17.07.2025.

Требования к получению клеточных банков, подходы

Каждый производитель, после того как наладит систему банков клеток, должен разработать полную документацию, которая будет подтверждать каждый этап разработки. В соответствии с нормативными документами эта документация должна включать:

- историю культуры штамма-хозяина, включая способ его выделения;
- описание всех генетических манипуляций, включая метод трансформации вектора и способ отбора выбранного клона;
- перечень реагентов, использованных для культивирования клеток и создания банка клеток;
- описание метода криоконсервации, включая использованный криопротектор, параметры замораживания, количество проведенных пассажей; размер банка клеток, включая количество подготовленных контейнеров, способ укупорки, условия хранения контейнеров.

Производитель должен обеспечить защиту банка клеток от микробной и перекрестной контаминации, а также вести систему регистрации для каждого контейнера. Документация должна включать описание маркировки, устойчивой к условиям хранения. На каждом контейнере указываются название штамма, дата производства, уникальный код и номер [6]. Для бесперебойного функционирования системы банков клеток необходимо наличие точной информации о текущем уровне запасов, их местонахождении и истории использования [21].

Создание банков клеток включает в себя процесс криоконсервации клеток. Во время криоконсервации клетки могут быть повреждены из-за образования внутриклеточных кристаллов льда или осмотического давления, возникающих при снижении содержания воды [22]. Чтобы свести к минимуму повреждение клеток, необходимо строго контролировать скорость замораживания и использовать эффективные криопротекторы. В качестве криопротектора для бактериальных клеток часто используется глицерин в концентрации 10–25 % (об./об.) [17, 23].

Для обеспечения непрерывного производства биофармацевтических препаратов необходимо предусмотреть защиту от незапланированных событий (пожары, отключения электроэнергии, ошибки персонала). Банки клеток должны храниться в строгих условиях, обеспечивающих долгосрочную стабильность штамма (например, при –70 °C или в жидком азоте) [24, 25]. Также рекомендуется, чтобы банки клеток, используемые в производстве, хранились в двух или более местах в пределах одного объекта или в центрах, удаленных друг от друга. Со всеми контейнерами должны обращаться одинаково, при однократном извлечении контейнер не должен возвращаться на хранение. Согласно рекомендациям ICH Q5D и решению № 89, доступ к банкам клеток

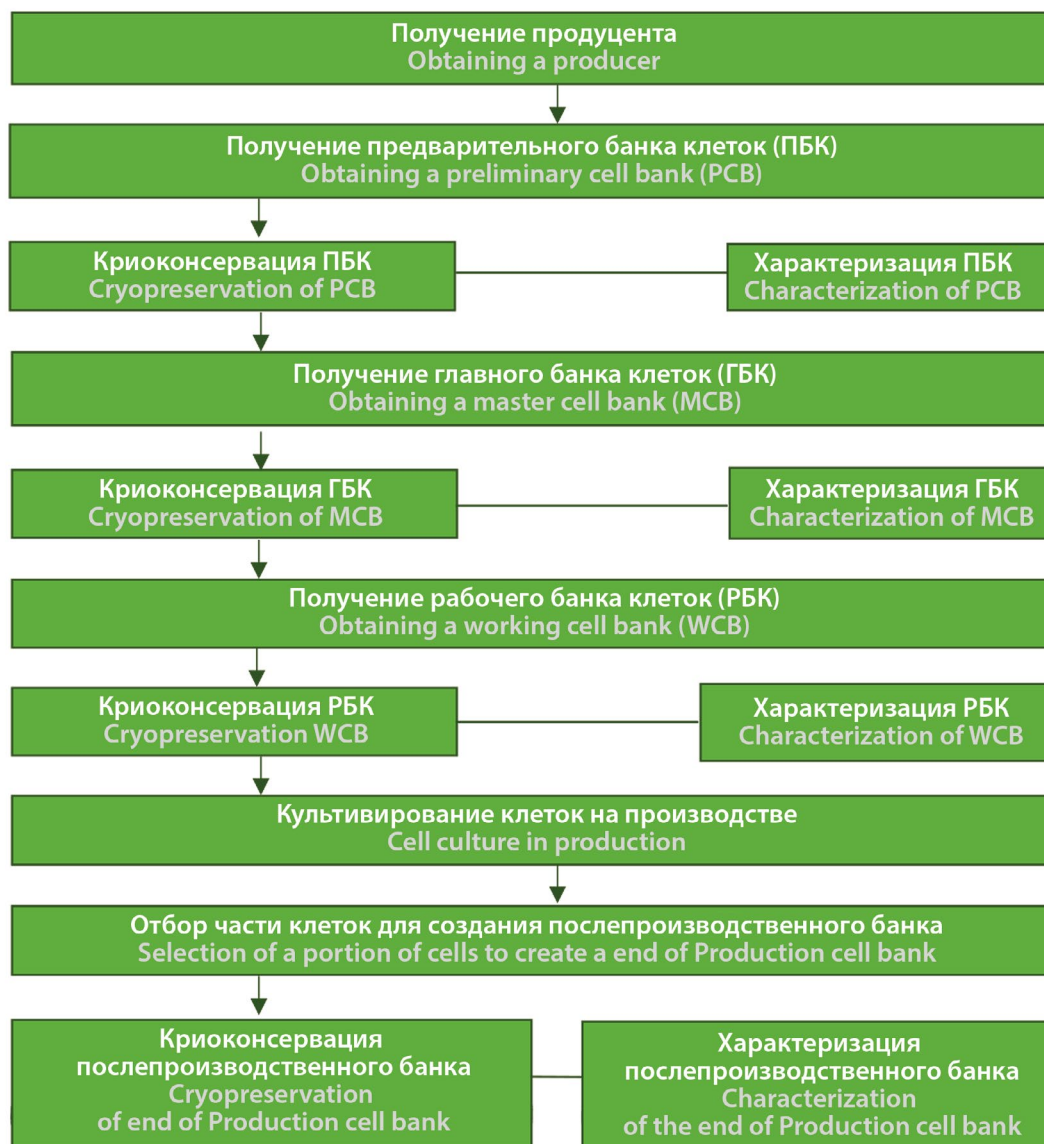


Рисунок 2. Пример блок-схемы процесса создания банков клеток [39]

Figure 2. Cell bank generation process scheme [39]

должен быть ограничен и контролироваться с ведением реестра местонахождения, идентичности и инвентаризации. Условия хранения ГБК и РБК должны быть идентичными.

Хранилище клеточных банков должно обеспечивать техническую поддержку, включая рекомендации по культивированию, решению проблем с ростом и жизнеспособностью клеток, а также по их практическому применению [26]. Технический персонал должен быть доступен для консультирования по вопросам криоконсервации, размораживания и применения передовых методов работы с клетками. Такая поддержка повышает удобство для пользователей, способствует успешному проведению экспериментов и повышает надежность результатов исследований.

Характеризация банков клеток

В соответствии с рекомендациями ICH Q5D каждая новая партия ГБК и РБК должна быть сначала полностью охарактеризована перед допуском к дальнейшим стадиям производства рекомбинантных белков [15]. Определение свойств и тестирование клеточных материалов из банков клеток – это ключевой этап контроля биологических и биотехнологических продуктов.

Чтобы обеспечить микробиологическую чистоту и безопасность клеточного банка, необходимо разработать и внедрить комплексную программу тестирования, основанную на тщательной и точной оценке рисков. При оценке важно учитывать тип клеточного банка, поскольку обоснование необходимости тестирования

тирования различается в зависимости от типа создаваемого клеточного банка [18].

Анализ характеристик ГБК позволяет производителю оценить этот источник клеточного субстрата с точки зрения наличия других клеточных линий, посторонних веществ, эндогенных агентов и молекулярных контаминантов (например, токсинов или антибиотиков из организма донора). Задача такого тестирования – подтвердить подлинность, микробиологическую чистоту и пригодность клеточного материала для использования в производстве.

В связи с тем, что все РБК сформированы на основе тщательно охарактеризованных ГБК, объем их характеристики может быть сокращен. Вновь сформированный ГБК тестируется однократно. До завершения всех анализов каждый из банков клеток имеет статус «в карантине». Только после получения удовлетворительных результатов он допускается к дальнейшим этапам производственного процесса.

Выбор стратегии тестирования зависит от типа банка, используемого штамма и внутренней политики производителя. Перечень основных показателей, которые должны быть определены для бактериальных банков клеток ГБК и РБК, представлен в таблице 1.

Производитель должен подтвердить идентичность бактериального штамма путем выполнения ряда тестов. Они также должны продемонстрировать, что бактериальный штамм из банка клеток обладает свойствами, идентичными используемому штамму-хозяину.

Для проверки идентичности могут использоваться как фенотипические, так и генотипические характеристики тестирования. Не считается необходимым проводить все возможные тесты. Тесты на идентичность, как правило, проводятся на ГБК. Для РБК проводится ограниченное тестирование на идентичность.

По рекомендациям ICH Q5D для большинства клеток микроорганизмов анализ роста на селективных средах достаточен для подтверждения подлинности клетки-хозяина на уровне вида для банка клеток хозяина и банка трансформированных клеток. Для *E. coli* при использовании различных штаммов в качестве дополнительных методов испытания на подлинность следует рассматривать фаготипирование – метод идентификации на основе специфических биологических характеристик взаимодействия с бактериофагами [27, 28]. Идентичность штамма, используемого в банке клеток, может быть подтверждена с помощью генетического анализа, например ПЦР или секвенирования, чтобы убедиться в принадлежности к нужному штамму и отсутствию нежелательных мутаций или контаминации¹. Дополнительно подтверждение подлинности экспрессирующей конструкции может осуществляться путем оценки экспрессии целевого продукта, например, с использованием капиллярного электрофореза [29, 30].

¹ Avance Biosciences. Quality Assurance of *E. coli* Cell Banks Used in Biopharmaceutical Production. Available at: <https://www.avancebio.com/quality-assurance-of-e-coli-cell-banks-used-in-biopharmaceutical-production/>. Accessed: 17.07.2025.

Таблица 1. Показатели, оцениваемые в процессе характеристики бактериальных банков

Table 1. Parameters tested during bacterial cell bank characterization

Показатель Parameter	Уровень клеточного банка Cell bank level			
	ГБК PCB	ГБК MCB	РБК WCB	Послепроизводственный банк клеток End of Production cell bank
Генетическая конструкция: • секвенирование Genetic construction: • sequencing	Нет No	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• рестрикционное картирование • restriction mapping	Нет No	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• копияность плазмиды • plasmid copy number	Нет No	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• сегрегационная стабильность • segregational stability	Нет No	Да Yes	Нет No	Да Yes
• структурная стабильность • structural stability	Нет No	Да Yes	Нет No	Да Yes
Контаминация: • наличие посторонней микрофлоры Contamination: • microbial contamination	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• отсутствие литических бактериофагов • absence of lytic bacteriophages	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• отсутствие лизогенных бактериофагов • absence of lysogenic bacteriophages	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Да Yes
Идентичность Identity	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
• генотипирование • genotyping	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
• фенотипирование • phenotyping	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
Продуктивность Productivity	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
Жизнеспособность Viability	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
Количество колониеобразующих единиц Colony forming units (CFU)	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No

Проверка стабильности банка клеток при хранении подтверждает, что клетки сохраняют жизнеспособность и генетическую целостность со временем, что критически важно для производства. Тестирова-

ние показывает, что клетки пережили криоконсервацию и пригодны для получения продукта [29]. Данные о жизнеспособности документируются, включая план мониторинга стабильности, который может проводиться при размораживании контейнеров для производства или подготовки новых банков.

Для оценки стабильности во время производственного культивирования необходимо провести исследование не менее чем в двух временных точках, в одной из которых используют клетки, подвергшиеся минимальному количеству пассажей, а в другой используют клетки на уровне или за пределами клеточного возраста *in vitro*. Оценка стабильности клеточного субстрата, как правило, выполняется однократно для каждого регистрируемого лекарственного препарата.

Важно подтверждение структуры и стабильности вектора экспрессии. Экспрессионный вектор, содержащий ген интереса и регуляторные элементы, должен сохранять свою нуклеотидную последовательность и свойства регуляторных элементов в течение всего процесса промышленного производства. Нестабильность вектора может привести к снижению уровня экспрессии, изменению структуры целевого продукта, следовательно, повлиять на качество и безопасность лекарственного препарата [31, 32]. Трансформация штамма-хозяина вектором экспрессии создает физиологическую нагрузку, что может привести к нестабильности плазмиды из-за изменений в ДНК (мутации, делеции, вставки) или сегрегационной нестабильности [6, 33]. Таким образом, для стабильной экспрессии важен подбор подходящего вектора. Структурная стабильность плазмиды проверяется секвенированием и рестрикционным анализом [6, 10, 34]. Для подтверждения стабильности используются методы: капиллярный электрофорез (однородность ДНК), ПЦР (остаточная ДНК) и рестрикционный анализ с эндонуклеазами¹ [35]. Сегрегационная стабильность вектора определяется процентом клеток, несущих плазмиду, при культивировании в течение четырех дней на среде с селективным маркером, например антибиотиками и без них [6, 36, 37].

Микробиологическая чистота банка клеток имеет решающее значение для гарантии отсутствия в нем посторонних микроорганизмов или примесей. Рекомендуется проводить тестирование на микробиологическую чистоту с целью выявления потенциальных контаминантов в банке клеток. Эти исследования включают в себя скрининг на различных средах с добавлением селективных агентов при разных условиях культивирования для обнаружения широкого спектра возможных контаминантов [29]. В ICH Q5D указано, что при разработке методов оценки микробиологической чистоты штамма производитель мо-

жет опираться на опубликованные литературные данные. При разработке тестов на случайные микробные агенты важно учитывать свойства клеток-продуцентов, возможных контаминантов, методов культивирования и возможные источники перекрестной контаминации в лаборатории. Критические точки, где возможно возникновение контаминации (бактериями, грибами, дрожжами или бактериофагами), должны быть идентифицированы при подготовке банков. При этом производитель может не проводить подробную характеристику случайных микробных агентов, достаточно подтвердить их отсутствие.

Трансфер банков клеток

Стратегия трансфера включает три этапа: анализ соответствия объекта, подготовку и выполнение плана снижения рисков. Такой подход упрощает передачу технологий и минимизирует риски, связанные с изменениями в эксплуатации или конфигурациях. Обеспечение качества продукции является критически важным, и данные из предыдущих производственных циклов используются для оценки качества и чистоты, особенно при нетипичных результатах. Их анализ помогает оценить влияние на продукт, выявить причины и принять корректирующие меры.

Трансфер банка клеток относится к процессам переноса клеток между различными банками, например из главного банка клеток в рабочие банки, а также к пополнению рабочих банков. Согласно рекомендациям Коллегии Евразийской экономической комиссии от 8 июня 2021 г. № 11 «О Руководстве по трансферу технологий и (или) аналитических методик при производстве лекарственных средств», передающая сторона обязана предоставить информацию об аттестации банка клеток². Клеточный субстрат, как сырье, должен соответствовать требованиям GMP, и поставщик обязан предоставить полную информацию для отслеживания его жизненного цикла. При передаче субстрата между площадками его транспортируют в заданном температурном режиме с фиксацией данных холодовой цепи, после чего помещают в карантин и проводят входной контроль в соответствии со стандартными операционными процедурами и спецификацией. На основе результатов контроля принимают решение о пригодности субстрата для создания ГБК, его утилизации или инициировании расследования.

Для определения характеристик сырья, важных для однородности и качества продукта, проводятся различные тесты, которые должны соответствовать требованиям к качеству, идентичности, чисто-

¹ Guest Column. Release specifications for plasmid MCBs, plasmid DNA. Cell & Gene. Available at: <https://www.cellandgene.com/doc/release-specifications-for-plasmid-master-cell-banks-plasmid-dna-0001>. Accessed: 17.07.2025.

² Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии №11 от 8 июня 2021 года «О Руководстве по трансферу технологий и (или) аналитических методик при производстве лекарственных средств». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/21rk0011/> Ссылка активна на 17.07.2025.

те и биологической активности. Поскольку ни один тест не охватывает все характеристики, режим тестирования определяется исходя из целевых характеристик [38]. Методы тестирования должны быть валидированы в соответствии с ICH Q2 и обеспечивать стабильные результаты¹. Помимо разработки собственных методов, доступны коммерческие наборы для обнаружения цитокинов, клеточных белков и других биомолекул, которые можно адаптировать под требования GMP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для того чтобы обеспечить единый исходный материал для всего технологического процесса производства терапевтических белков, необходимо создание банков клеток с соответствующими стандартами качества. Главный банк клеток создается сначала в четко определенных условиях на основе подробно описанных процедур из одной отобранной и хорошо охарактеризованной бактериальной колонии. Рабочий банк клеток создается на втором этапе из одного или нескольких контейнеров ГБК. Эти банки должны быть тщательно протестированы в соответствии с нормативными рекомендациями. Хорошо отработанная система создания и характеристики ГБК/РБК имеет решающее значение для последующих этапов разработки биотехнологического продукта, а затем для его утверждения соответствующими органами, ответственными за регистрацию лекарственного продукта.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

- Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*. 2018;36:1136–1145. DOI: 10.1038/nbt.4305.
- McElwain L., Phair K., Kealey C., Brady D. Current trends in biopharmaceuticals production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 2022;44(8):917–931. DOI: 10.1007/s10529-022-03276-5.
- İncir İ., Kaplan Ö. *Escherichia coli* in the production of biopharmaceuticals. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2025;72(2):528–541. DOI: 10.1002/bab.2664.
- Al-Rubeai M., editor. Cell Line Development. Cell Engineering. Dordrecht: Springer; 2009. 253 p.
- Johnson I. S. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*. 1983;219(4585):632–637. DOI: 10.1126/science.6337396.
- Sobolewska-Ruta A., Zaleski P. Cell Banks Preparation In Biopharmaceuticals Production. *Postępy Mikrobiologii – Advancements of Microbiology*. 2019;58(1):87–100. DOI: 10.21307/pm-2019.58.1.087.
- Walsh G., Walsh E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nature Biotechnology*. 2022;40(12):1722–1760. DOI: 10.1038/s41587-022-01582-x.
- Lagassé H. A. D., Alexaki A., Simhadri V. L., Katagiri N. H., Jankowski W., Sauna Z. E., Kimchi-Sarfaty C. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research*. 2017;6:113. DOI: 10.12688/f1000research.9970.1.
- Li F., Vijayasankaran N., Shen A. (Y.), Kiss R., Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*. 2010;2(5):466–479. DOI: 10.4161/mabs.2.5.12720.
- 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.
- Tripathi N. K., Shrivastava A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7:420. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00420.
- Niazi S., Magoola M. Advances in *Escherichia coli*-based therapeutic protein expression: Mammalian conversion, continuous manufacturing, and cell-free production. *Biologics*. 2023;3(4):380–401. DOI: 10.3390/biologics3040021.
- Geigert J., editor. The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals. Switzerland: Springer Cham; 2019. 426 p.
- Cabrera C. M., Cobo F., Nieto A., Cortés J. L., Montes R. M., Catalina P., Concha A. Identity tests: determination of cell line cross-contamination. *Cytotechnology*. 2006;51:45–50. DOI: 10.1007/s10616-006-9013-8.
- Schmeer M., Buchholz T., Schleef M. Plasmid DNA manufacturing for indirect and direct clinical applications. *Human Gene Therapy*. 2017;28(10):856–861. DOI: 10.1089/hum.2017.159.
- Dashnau J. L., Xue Q., Nelson M., Law E., Cao L., Hei D. A risk-based approach for cell line development, manufacturing and characterization of genetically engineered, induced pluripotent stem cell-derived allogeneic cell therapies. *Cytotherapy*. 2023;25(1):1–13. DOI: 10.1016/j.jcyt.2022.08.001.
- Zhu M. M., Mollet M., Hubert R. S., Kyung Y. S., Zhang G. G. Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture, and Purification. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. 2017;3:1639–1669. DOI: 10.1007/978-3-319-52287-6_29.
- Byer H., Wang W., Mogilyanskiy L. Mastering Cell Bank Production. *Biopharm International* 2015;8:20–24.
- Matanguihan C., Wu P. Upstream continuous processing: recent advances in production of biopharmaceuticals and challenges in manufacturing. *Current Opinion in Biotechnology*. 2022;78:102828. DOI: 10.1016/j.copbio.2022.102828.
- Menendez A. T., Ritter N., Zmuda J., Jani D., Goyal J. Recommendations for Cell Banks Used in GXP Assays. *BioProcess International*. 2012;10(1):27–40.
- Wrigley J. D., McCall E. J., Bannaghan C. L., Liggins L., Kendrick C., Griffen A., Hicks R., Fröderberg-Roth L. Cell Banking for Pharmaceutical Research. *Drug Discovery Today*. 2014;19(10):1518–1529. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.05.006.
- Simonin H., Bergaoui I. M., Perrier-Cornet J. M., Gervais P. Cryopreservation of *Escherichia coli* K12TG1: protection from the damaging effects of supercooling by freezing. *Cryobiology*. 2015;70(2):115–121. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.12.006.
- Whaley D., Damyar K., Witek R. P., Mendoza A., Alexander M., Lakey J. R. T. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation*. 2021;30:0963689721999617. DOI: 10.1177/0963689721999617.
- Bolhuis H., Grego M. Cryopreservation and recovery of a complex hypersaline microbial mat community. *Cryobiology*. 2024;114:104859. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2024.104859.

¹ ICH guideline Q2(R2) Validation of analytical procedures. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

25. Bhattacharjee K., Chrungoo N., Joshi S.R. Cryopreservation design for bacterial cell: A non-conventional gismatic approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2021;91:811–820. DOI: 10.1007/s40011-021-01266-7.
26. Weiskirchen S., Monteiro A.M., Borojevic R., Weiskirchen R. Unlocking potential: A comprehensive overview of cell culture banks and their impact on biomedical research. *Cells*. 2024;13(22):1861. DOI: 10.3390/cells13221861.
27. Maffei E., Shaidullina A., Burkolter M., Heyer Y., Estermann F., Druelle V., Suaer P., Willi L., Michaelis S., Hilbi H., Thaler D.S., Harms A. Systematic exploration of Escherichia coli phage-host interactions with the BASEL phage collection. *PLoS Biology*. 2021;19(11):e3001424. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001424.
28. Tóth I., Bagyinszky E., Sváb D. Multiplex polymerase chain reaction typing scheme based on Escherichia coli O157: H7 Sakai prophage (Sp)-associated genes. *International Journal of Infectious Diseases*. 2022;120:68–76. DOI: 10.1016/j.ijid.2022.04.015.
29. Sofer G., Zabriskie D., editors. Process Validation in Manufacturing of Biopharmaceuticals. Boca Raton: CRC Press; 2000. 402 p.
30. Van der Burg D., Josefsson L., Emmer Å., Sängers – van de Griend C.E. Recent capillary electrophoresis applications for upstream and downstream biopharmaceutical process monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023;160:116975. DOI: 10.1016/j.trac.2023.116975.
31. Lozano Terol G., Gallego-Jara J., Sola Martínez R.A., Martínez Vivancos A., Cánovas Díaz M., de Diego Puente T. Impact of the expression system on recombinant protein production in Escherichia coli BL21. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:682001. DOI: 10.3389/fmicb.2021.682001.
32. Allen J.R., Torres-Acosta M.A., Mohan N., Lye G.J., Ward J. M. Segregationally stabilised plasmids improve production of commodity chemicals in glucose-limited continuous fermentation. *Microbial Cell Factories*. 2022;21(1):229. DOI: 10.1186/s12934-022-01958-3.
33. De Marco A. Recent advances in recombinant production of soluble proteins in E. coli. *Microbial Cell Factories*. 2025;24(1):21. DOI: 10.1186/s12934-025-02646-8.
34. Jiang R., Yuan S., Zhou Y., Wei Y., Li F., Wang M., Chen B., Yu H. Strategies to overcome the challenges of low or no expression of heterologous proteins in Escherichia coli. *Biotechnology Advances*. 2024;75:108417. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2024.108417.
35. Schmeer M., Schleef M., Shankear R., Kobelt D., Walther W. Capillary Gel Electrophoresis (CGE) for quality control of plasmid DNA in gene therapy: quality control of 20 years stored GMP-grade plasmid DNA. *Methods in Molecular Biology*. 2022;2521:317–328. DOI: 10.1007/978-1-0716-2441-8_17.
36. Arredondo-Alonso S., Pöntinen A.K., Gama J.A., Gladstone R.A., Harms K., Tonkin-Hill G., Thorpe H.A., Simonsen G.S., Samuelsen Ø., Johnsen P.J., Corander J. Plasmid-driven strategies for clone success in Escherichia coli. *Nature Communications*. 2025;16(1):2921. DOI: 10.1038/s41467-025-57940-1.
37. Liao Y.-C., Saengsawang B., Chen J.-W., Zhuo X.-Z., Li S.-Y. Construction of an antibiotic-free Vector and its application in the Metabolic Engineering of Escherichia Coli for Polyhydroxybutyrate Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:837944. DOI: 10.3389/fbioe.2022.837944.
38. Michel A., Neville D. Developing an understanding of the analytical landscape for testing complex biological raw materials in advanced therapy medicinal products: A CRO perspective. *Cell Gene Therapy Insights*. 2021;7(2):317–326. DOI: 10.18609/cgti.2021.056.



Производные 2-амино-4-(2-фурил)пиридин-3-карбонитрилов как перспективные антистафилококковые препараты

Д. С. Беспалов², Д. М. Егоров^{1,2}, А. С. Крылов^{1,2}✉, Е. Н. Чернова¹,
И. Л. Кузикова¹, З. А. Жаковская¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук» (СПб ФИЦ РАН). 199178, Россия, г. Санкт-Петербург, 14-я линия В.О., д. 39

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)» (СПбГТИ(ТУ)). 190013, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский проспект, д. 24–26/49, литера А

✉ Контактное лицо: Крылов Александр Сергеевич. E-mail: alexandr_krylov@bk.ru

ORCID: Д. С. Беспалов – <https://orcid.org/0009-0008-3495-8491>;

Д. М. Егоров – <https://orcid.org/0000-0003-3744-9306>;

А. С. Крылов – <https://orcid.org/0000-0003-1773-7802>;

Е. Н. Чернова – <https://orcid.org/0000-0002-2135-4540>;

И. Л. Кузикова – <https://orcid.org/0000-0001-6199-3104>;

З. А. Жаковская – <https://orcid.org/0000-0002-5620-1317>.

Статья поступила: 09.07.2025

Статья принята в печать: 22.08.2025

Статья опубликована: 22.08.2025

Резюме

Введение. Соединения, содержащие в своем составе фурановый фрагмент, часто проявляют антимикробную активность. Несмотря на то что среди производных пиридина нет препаратов, проявляющих противомикробную активность, его комбинация с фурановым заместителем может рассматриваться как перспективный тандем для создания эффективных антимикробных препаратов.

Цель. Целью данного исследования является синтез гибридных структур, содержащих фурановый и аминопиридиновый фрагменты и исследование их антимикробных свойств.

Материалы и методы. Реакцией фурфурола, малондинитрила, ацетата аммония и соответствующего кетона получена серия 5,6-замещенных 2-амино-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрилов.

Результаты и обсуждение. Для полученных соединений исследована их антимикробная активность в отношении бактерий *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и дрожжеподобных грибов *Candida utilis*. Определены соединения, обладающие высокой антибактериальной активностью, проведена оценка влияния заместителей в 5 и 6 положениях на исследуемую активность.

Заключение. Получен ряд новых замещенных 5,6-диалкил-4-фурил-2-аминопиридин-3-карбонитрилов и исследована *in vitro* их антимикробная активность.

Ключевые слова: 2-аминопиридин, многокомпонентная реакция, антимикробная активность

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

Вклад авторов. Д. С. Беспалов и Д. М. Егоров осуществили синтез соединений и доказали их строение. Е. Н. Чернова провела масс-спектрометрическое исследование полученных соединений. И. Л. Кузикова и З. А. Жаковская провели исследования биологической активности соединений. Д. С. Беспалов, Д. М. Егоров, А. С. Крылов, И. Л. Кузикова и З. А. Жаковская участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-13-00224, <https://rscf.ru/project/23-13-00224/>, с использованием оборудования инжинирингового центра Санкт-Петербургского государственного технологического института.

Для цитирования: Беспалов Д. С., Егоров Д. М., Крылов А. С., Чернова Е. Н., Кузикова И. Л., Жаковская З. А. Производные 2-амино-4-(2-фурил)пиридин-3-карбонитрилов как перспективные антистафилококковые препараты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):82–90. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2140>

Derivatives of 2-amino-4-(furan-2-yl)pyridine-3-carbonitriles as promising antistaphylococcal drugs

Denis S. Beshpalov², Dmitry M. Egorov^{1,2}, Aleksandr S. Krylov^{1,2}✉, Ekaterina N. Chernova¹, Irina L. Kuzikova¹, Zoya A. Zhakovskaya¹

¹ St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. 39, 14th line V.O., Saint-Petersburg, 199178, Russia

² Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University). 24–26/49A, Moskovsky prospect, Saint-Petersburg, 190013, Russia

✉ Corresponding author: Aleksandr S. Krylov. E-mail: alexandr_krylov@bk.ru

ORCID: Denis S. Beshpalov – <https://orcid.org/0009-0008-3495-8491>;
Dmitry M. Egorov – <https://orcid.org/0000-0003-3744-9306>;
Aleksandr S. Krylov – <https://orcid.org/0000-0003-1773-7802>;
Ekaterina N. Chernova – <https://orcid.org/0000-0002-2135-4540>;
Irina L. Kuzikova – <https://orcid.org/0000-0001-6199-3104>;
Zoya A. Zhakovskaya – <https://orcid.org/0000-0002-5620-1317>.

Received: 09.07.2025

Accepted: 22.08.2025

Published: 22.08.2025

Abstract

Introduction. Furan-containing compounds frequently demonstrate antimicrobial properties. While pyridine-based compounds alone lack antimicrobial activity, their structural combination with a furan moiety presents a promising approach for designing novel antimicrobial agents.

Aim. This study aims to synthesize hybrid molecules incorporating both furan and aminopyridine fragments and evaluate their antimicrobial potential.

Materials and methods. We prepared a series of 5,6-substituted 2-amino-4-(2-furyl)pyridine-3-carbonitriles via a one-pot multicomponent reaction using furfural, malononitrile, ammonium acetate, and selected ketones.

Results and Discussion. The synthesized compounds exhibited significant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and the yeast-like fungus *Candida utilis*. Structure-activity relationship analysis revealed that substituents at the 5- and 6-positions critically influence antibacterial potency.

Conclusion. We successfully developed a novel series of 2-amino-5,6-dialkyl-4-(furan-2-yl)pyridine-3-carbonitriles and characterized their *in vitro* antimicrobial effects, identifying key structural features for enhanced activity.

Keywords: 2-aminopyridines, multicomponent reaction, antimicrobial activity

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

Contribution of the authors. Denis S. Beshpalov and Dmitry M. Egorov performed the synthesis of the compounds and confirmed their structures. Ekaterina N. Chernova conducted mass spectrometric analysis of the obtained compounds. Irina L. Kuzikova and Zoya A. Zhakovskaya performed the biological activity studies. Denis S. Beshpalov, Dmitry M. Egorov, Aleksandr S. Krylov, Irina L. Kuzikova, Zoya A. Zhakovskaya participated in writing the manuscript. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The study was carried out with the Russian Science Foundation (No. 23-13-00224, <https://rscf.ru/project/23-13-00224/>) using the equipment of the Engineering Center of the St. Petersburg State Technological Institute.

For citation: Beshpalov D. S., Egorov D. M., Krylov A. S., Chernova E. N., Kuzikova I. L., Zhakovskaya Z. A. Derivatives of 2-amino-4-(furan-2-yl)pyridine-3-carbonitriles as promising antistaphylococcal drugs. *Drug development & registration*. 2025;14(3):82–90. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2140>

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых антимикробных препаратов сохраняет высокую актуальность ввиду постоянной выработки резистентности у различных микроорганизмов [1–3]. Неконтролируемое и нецелесообразное использование антибиотических соединений является

триггером повышения устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, что приводит к глобальным проблемам современного здравоохранения. Данные организаций, осуществляющих эпидемиологический надзор в Европе (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, EARS-Net) и Азии (Central Asia and Eastern European Surveillance of Antimicrobial

Resistance, CAESAR), говорят об устойчивом росте резистентности бактерий к антибиотикам за последнее десятилетие¹. Центры по контролю и профилактике заболеваний США показали, что количество бактериальных инфекций, устойчивых к антимикробным препаратам, за время пандемии COVID-19 выросло на 20 %. Всемирная организация здравоохранения определяет устойчивость к антибиотикам как одну из наиболее серьезных угроз общественному здоровью в XXI веке. Выделены категории высокоvirulentных, резистентных видов бактерий, включающих *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и др.² Возрастает число патогенных грибов, устойчивых к противогрибковым препаратам [4]. Все это требует расширения области поиска и разработки новых эффективных антимикробных препаратов.

Наиболее эффективным подходом с точки зрения химии к синтезу биологически активных полифункциональных соединений является использование многокомпонентных реакций [5–8]. Данный подход позволяет однореакторно проводить синтез соединений, сочетающий сразу нескольких перспективных биологически активных фрагментов. Также данный метод позволяет экономить общее время процесса и расход используемых растворителей и компонентов для реакции, попутно снижая количество отходов и затраты на очистку полупродуктов.

Поиск новых перспективных биологически активных соединений рационально проводить в ходе поэтапной модификации структуры соединения, проявившего высокую активность в исследованиях. Производные, содержащие в своем составе фурановый фрагмент [9–13], часто проявляют антимикробную активность. Примером таких препаратов могут служить фуралятадон [14], нитрофура [15], нифуроксизид [16], цефуроксим [17], цефтиофу [18], дилоксанид [19] и их производные. Соединения, в состав которых входит пиридиновый фрагмент, также часто проявляют высокую биологическую активность [20–25]. Существуют лекарственные препараты, в состав активных фармацевтических субстанций которых входят соединения с аминопиридиновым фрагментом: метапирилен [26], феназопиридин [27], хлоропирамин [28], мепирамин [29], дальфампридин [30], амризон [31], кризотиниб [32] (рисунки 1). Несмотря на то что среди производных пиридина нет препаратов,

проявляющих противомикробную активность, его комбинация с фурановым заместителем может рассматриваться как перспективный тандем для создания эффективных антимикробных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР (¹H, ¹³C) были сняты на спектрометре Bruker Avance III HD 400 NanoBay (Bruker Corporation, США) на частотах 400,17 Гц (¹H), 101,62 Гц (¹³C). Масс-спектроскопические данные были получены на приборе Agilent 6530 Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, США). Определение температур плавления проводилось с использованием столика Кофлера (VEB Wägetechnik Rapido, PHMK 81/2969, Германия).

Общая методика получения соединений 4a–4l.

Изначально приготавливали раствор малондинитрила (х.ч., ФГУП «СКТБ «Технолог», Россия) **1** (0,01 моль) в безводном бензоле (х.ч., АО «БЕКТОН», Россия) (40 мл), добавляли фурфурол (ч.ч., АО «ЛенРеактив», Россия) **2** (0,01 моль), соответствующий кетон **3a–3l** (0,01 моль), ацетат аммония (ч.д.а., «ЛенРеактив», Россия) (0,07 моль). Реакционную смесь перемешивали при кипячении с насадкой Дина – Старка до прекращения отделения воды. После окончания реакции смесь упаривали в вакууме водоструйного насоса и остаток перекристаллизовывали из этилового спирта.

2-амино-6-трет-бутил-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4a). Выход 92 %, светло-желтые кристаллы. $T_{пл}$ 165–166 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСO-d₆), δ, ppm (J, Гц): 1,26 с (9H, (CH₃)₃C), 6,74 с (1H, CH_{Ar}), 6,75 уш. с (2H, NH₂), 6,99 с (1H, CH_{Ar}), 7,40 с (1H, CH_{Ar}), 7,94 с (1H, CH_{Ar}). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСO-d₆), δ_C, ppm: 29,83 ((CH₃)₃C), 38,01 ((CH₃)₃C), 80,72 (C_{Ar}CN), 103,71 (CH_{Ar}), 113,01 (CH_{Ar}), 113,07 (CH_{Ar}), 117,81 (CN), 141,11 (C_{Ar}), 145,65 (CH_{Ar}), 149,17 (C_{Ar}), 161,08 (C_{Ar}), 173,26 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), m/z : вычислено для C₁₄H₁₆N₃O, [M+H]⁺: 242,1288, найдено: 242,1293.

2-амино-6-метил-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4b). Выход 89 %, белые кристаллы. $T_{пл}$ 241–242 °С. $T_{пл}$ (лит. [36]) 169–171 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСO-d₆), δ, м. д. (J, Гц): 2,33 с (3H, CH₃), 6,73 с (1H, CH_{Ar}), 6,83 с (2H, NH₂), 6,87 с (1H, CH_{Ar}), 7,36 с (1H, CH_{Ar}), 7,94 с (1H, CH_{Ar}). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСO-d₆), δ_C, м. д.: 24,85 (CH₃), 80,28 (C_{Ar}CN), 107,67 (CH_{Ar}), 113,10 (CH_{Ar}), 117,82 (CN), 140,79 (C_{Ar}), 145,73 (CH_{Ar}), 148,93 (C_{Ar}), 161,52 (C_{Ar}), 162,86 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), m/z : вычислено для C₁₁H₁₀N₃O, [M+H]⁺: 200,0818, найдено: 200,0822.

2-амино-5,6-диметил-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4c). Выход 83 %, белые кристаллы. $T_{пл}$ 246–247 °С. $T_{пл}$ (лит. [37]) 198 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСO-d₆), δ, м. д. (J, Гц): 2,05 с (3H, CH₃), 2,37 с (3H, CH₃), 6,61 с (2H, NH₂), 6,71 дд (1H, CH_{Ar}, ³J_{HH} 3,4, ⁴J_{HH} 1,8), 6,84 д (1H, CH_{Ar}, ³J_{HH} 3,4), 7,92 д (1H, CH_{Ar}, ⁴J_{HH} 1,8). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСO-d₆), δ_C, м. д.: 15,54 (CH₃), 24,07 (CH₃), 85,99 (C_{Ar}CN), 112,05 (CH_{Ar}), 113,56

¹ Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. European Centre for Disease Prevention and Control. Available at: <https://doi.org/10.2900/230516>. Accessed: 25.07.2025.

² WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789240093461>. Accessed: 25.07.2025.

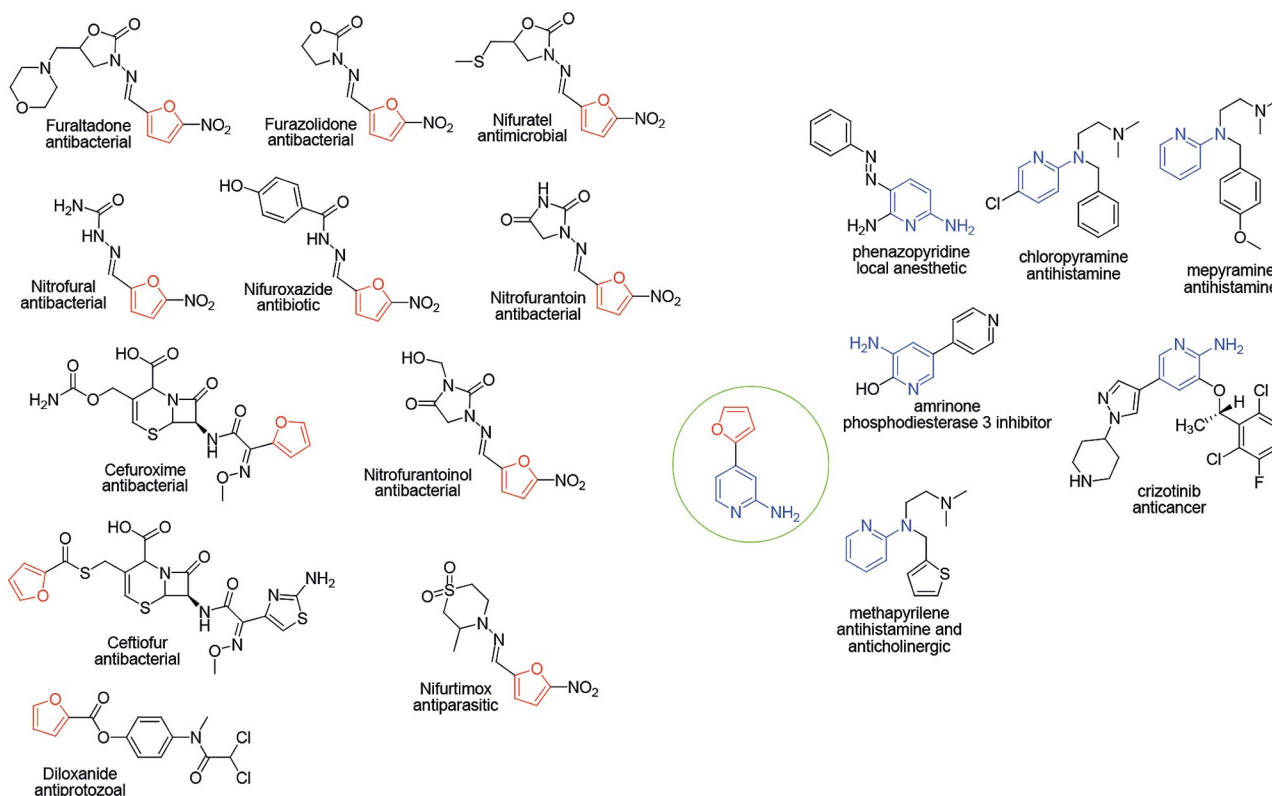


Рисунок 1. Структурные формулы активных фармацевтических субстанций, содержащих фурановый или аминопиридиновый фрагмент

Figure 1. The structures of active pharmaceutical ingredients containing a furan or aminopyridine fragment

(CH_{Ar}), 117,37 (CN), 118,07 (C_{Ar}), 141,34 (C_{Ar}), 144,79 (CH_{Ar}), 148,30 (C_{Ar}), 159,04 (C_{Ar}), 162,57 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₁₂H₁₂N₃O, [M+H]⁺: 214,0975, найдено: 214,0970.

2-амино-6-изобутил-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4d). Выход 86 %, светло-желтые кристаллы. *T*_{пл.} 211–212 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСО-*d*₆), δ, м. д. (*J*, Гц): 0,88 д (6H, CH₃, ³*J*_{HH} 6,6), 2,04 дг (1H, CH, ³*J*_{HH} 6,8), 2,45 д (2H, CH₂, ³*J*_{HH} 7,2), 6,75 дд (1H, CH_{Ar}, ³*J*_{HH} 3,6, ⁴*J*_{HH} 1,8), 6,83 уш. с (2H, NH₂), 6,86 с (1H, CH), 7,39 д (1H, CH_{Ar}, ³*J*_{HH} 3,6), 7,96 д (1H, CH_{Ar}, ⁴*J*_{HH} 1,8). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 22,74 (CH₃), 28,61 (CH₂), 47,39 (CH), 80,56 (C_{Ar}CN), 107,86 (CH_{Ar}), 113,13 (CH_{Ar}), 117,83 (CN), 128,77 (C_{Ar}), 140,68 (C_{Ar}), 145,75 (CH_{Ar}), 148,98 (C_{Ar}), 161,61 (C_{Ar}), 165,79 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₁₄H₁₆N₃O, [M+H]⁺: 242,1288, найдено: 242,1292.

2-амино-6-фенилил-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4e). Выход 89 %, светло-желтые кристаллы. *T*_{пл.} 160–162 °С. *T*_{пл.} (лит. [36]) 150 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСО-*d*₆), δ, м. д. (*J*, Гц): 6,80 дд (1H, CH_{Ar}, ³*J*_{HH} 3,6, ⁴*J*_{HH} 1,8), 7,02 уш. с (2H, NH₂), 7,51 м (3H, CH), 7,55 м (2H, CH), 8,02 д (1H, CH_{Ar}, ⁴*J*_{HH} 1,8), 8,11 с (1H, CH), 8,13 д (1H, CH, ³*J*_{HH} 2,4). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 81,90 (C_{Ar}CN), 104,82 (CH_{Ar}), 113,25 (CH_{Ar}), 113,61 (CH_{Ar}), 117,73 (CN), 127,56

(CH_{Ar}), 129,13 (CH_{Ar}), 130,63 (CH_{Ar}), 137,92 (C_{Ar}), 141,77 (C_{Ar}), 146,00 (CH_{Ar}), 149,17 (C_{Ar}), 159,26 (C_{Ar}), 161,63 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₁₆H₁₂N₃O, [M+H]⁺: 262,0975, найдено: 262,0982.

2-амино-6-(4-метоксифенил)-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4f). Выход 92 %, светло-желтые кристаллы. *T*_{пл.} 197–198 °С. *T*_{пл.} (лит. [37]) 184 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСО-*d*₆), δ, м. д. (*J*, Гц): 3,83 с (3H, CH₃O), 6,72 дд (1H, CH_{Ar}, ³*J*_{HH} 3,6, ⁴*J*_{HH} 1,8), 6,96 уш. с (2H, NH₂), 7,05 д (2H, CH, ³*J*_{HH} 8,5), 7,48 с (1H, CH_{Ar}), 7,51 д (1H, CH_{Ar}, ³*J*_{HH} 3,6), 8,00 д (1H, CH_{Ar}, ⁴*J*_{HH} 1,8), 8,09 д (2H, CH, ³*J*_{HH} 8,5). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 55,77 (CH₃O), 81,00 (C_{Ar}CN), 103,99 (CH_{Ar}), 113,17 (CH_{Ar}), 113,36 (CH_{Ar}), 117,93 (CN), 129,14 (CH_{Ar}), 130,23 (C_{Ar}), 141,55 (C_{Ar}), 145,85 (CH_{Ar}), 149,26 (C_{Ar}), 158,92 (C_{Ar}), 161,48 (C_{Ar}), 161,60 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₁₇H₁₄N₃O₂, [M+H]⁺: 292,1081, найдено: 292,1088.

2-амино-6-(2-нафтил)-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4g). Выход 86 %, светло-желтые кристаллы. *T*_{пл.} 210–211 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСО-*d*₆), δ, м. д. (*J*, Гц): 6,81 дд (1H, CH_{Ar}, ³*J*_{HH} 3,6, ⁴*J*_{HH} 1,8), 7,06 уш. с (2H, NH₂), 7,58 м (3H, CH), 7,71 с (1H, CH_{Ar}), 7,97 м (1H, CH_{Ar}), 8,04 м (3H, CH_{Ar}), 8,26 д (2H, CH, ³*J*_{HH} 8,6, ⁴*J*_{HH} 1,8), 8,71 м (1H, CH). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 81,95 (C_{Ar}CN),

105,18 (CH_{Ar}), 113,27 (CH_{Ar}), 113,65 (CH_{Ar}), 117,93 (CN), 124,85 (CH_{Ar}), 127,09 (CH_{Ar}), 127,38 (CH_{Ar}), 127,70 (C_{Ar}), 128,03 (CH_{Ar}), 128,62 (CH_{Ar}), 129,26 (C_{Ar}), 133,25 (C_{Ar}), 134,16 (C_{Ar}), 135,31 (C_{Ar}), 141,80 (C_{Ar}), 146,00 (CH_{Ar}), 149,17 (CH_{Ar}), 159,13 (C_{Ar}), 161,68 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₂₀H₁₄N₃O, [M+H]⁺: 312,1131, найдено: 312,1140.

2-амино-6-(4-фенилфенил)-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4h). Выход 81 %, светло-желтые кристаллы. *T*_{пл.} 226–227 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСО-*d*₆), δ, м. д. (*J*, Гц): 6,80 дд (1H, CH_{Ar}, ³J_{HH} 3,6, ⁴J_{HH} 1,8), 7,03 уш.с (2H, NH₂), 7,40 т (1H, CH, ³J_{HH} 7,3), 7,49 т (2H, CH, ³J_{HH} 7,6), 7,55 д (1H, CH, ³J_{HH} 3,5), 7,60 с (1H, CH_{Ar}), 7,74 д (2H, CH, ³J_{HH} 7,3), 7,81 д (2H, CH, ³J_{HH} 8,5), 8,02 д (1H, CH_{Ar}, ⁴J_{HH} 1,5), 8,22 д (1H, CH, ³J_{HH} 8,5). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 81,91 (C_{Ar}CN), 104,76 (CH_{Ar}), 113,28 (CH_{Ar}), 113,61 (CH_{Ar}), 117,78 (CN), 127,19 (CH_{Ar}), 127,32 (CH_{Ar}), 128,17 (CH_{Ar}), 128,38 (C_{Ar}), 129,48 (CH_{Ar}), 136,83 (CH_{Ar}), 139,73 (C_{Ar}), 141,76 (C_{Ar}), 142,14 (C_{Ar}), 145,98 (CH_{Ar}), 149,17 (C_{Ar}), 158,76 (C_{Ar}), 161,65 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₂₂H₁₆N₃O, [M+H]⁺: 338,1288, найдено: 338,1299.

2-амино-6-(3-хлорфенил)-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4i). Выход 84 %, светло-желтые кристаллы. *T*_{пл.} 160–162 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСО-*d*₆), δ, м. д. (*J*, Гц): 6,77 дд (1H, CH_{Ar}, ³J_{HH} 3,6, ⁴J_{HH} 1,8), 7,04 уш.с (2H, NH₂), 7,51 дд (2H, CH, ³J_{HH} 4,9, ⁴J_{HH} 1,4), 7,55 м (2H, CH), 7,99 с (1H, CH_{Ar}, ⁴J_{HH} 1,7), 8,05 м (1H, CH_{Ar}), 8,15 д (1H, CH, ⁴J_{HH} 1,4). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 82,55 (C_{Ar}CN), 105,00 (CH_{Ar}), 113,23 (CH_{Ar}), 113,85 (CH_{Ar}), 117,55 (CN), 126,05 (CH_{Ar}), 127,19 (CH_{Ar}), 130,25 (CH_{Ar}), 130,93 (CH_{Ar}), 134,12 (C_{Ar}), 139,92 (C_{Ar}), 141,95 (C_{Ar}), 146,03 (CH_{Ar}), 149,06 (C_{Ar}), 157,38 (C_{Ar}), 161,54 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₁₆H₁₁ClN₃O, [M+H]⁺: 296,0585, найдено: 296,0596.

2-амино-6-(4-фторфенил)-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4j). Выход 90 %, светло-желтые кристаллы. *T*_{пл.} 182–183 °С. *T*_{пл.} (лит. [38]) 180 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСО-*d*₆), δ, м. д. (*J*, Гц): 6,78 дд (1H, CH_{Ar}, ³J_{HH} 3,6, ⁴J_{HH} 1,8), 7,00 уш.с (2H, NH₂), 7,33 дд (2H, CH, ³J_{HH} 8,8, ³J_{HF} 8,8), 7,50 с (1H, CH), 7,52 д (1H, CH, ³J_{HH} 7,6), 7,55 д (1H, CH, ³J_{HH} 3,5), 8,00 д (1H, CH_{Ar}, ⁴J_{HH} 1,7), 8,17 дд (1H, CH, ³J_{HH} 8,8, ³J_{HF} 5,6). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 81,84 (C_{Ar}CN), 104,62 (CH_{Ar}), 113,23 (CH_{Ar}), 113,67 (CH_{Ar}), 116,02 д (CH, ²J_{CF} 21,45), 117,69 (CN), 129,89 д (CH, ³J_{CF} 8,6), 134,36 д (C, ⁴J_{CF} 3,3), 141,84 (C_{Ar}), 145,99 (CH_{Ar}), 149,11 (C_{Ar}), 158,13 (C_{Ar}), 161,57 (C_{Ar}), 163,87 д (C, ¹J_{CF} 247,9). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₁₆H₁₁FN₃O, [M+H]⁺: 280,0881, найдено: 280,0888.

2-амино-6-метил-5-гексил-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрил (4k). Выход 83 %, светло-желтые кристаллы. *T*_{пл.} 222–223 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСО-*d*₆), δ, м. д. (*J*, Гц): 0,83 д (3H, ³J_{HH} 7,1), 1,22 м (8H, CH), 1,62 т (3H, ³J_{HH} 7,7), 2,39 с (3H), 6,65 дд (1H, CH_{Ar}, ³J_{HH} 3,5, ⁴J_{HH} 1,7), 6,75 уш.с (2H, NH₂), 7,38 д (1H, CH_{Ar},

³J_{HH} 3,6), 7,92 д (1H, CH_{Ar}, ⁴J_{HH} 1,7). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 14,35 (CH₃), 22,43, 22,53, 23,23, 28,79, 29,10 (CH₂), 29,90 (CH₃), 38,27 (CH₂), 80,51 (C_{Ar}CN), 112,06 (CH_{Ar}), 113,06 (CH_{Ar}), 117,13 (CN), 117,76 (C_{Ar}), 140,83 (C_{Ar}), 144,74 (CH_{Ar}), 148,33 (C_{Ar}), 158,89 (C_{Ar}), 162,08 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₁₇H₂₂N₃O, [M+H]⁺: 284,1757, найдено: 284,1764.

2-амино-6-метил-4-(2-фурил)-5-карбэтокси-пиридин-3-карбонитрил (4l). Выход 91 %, светло-желтые кристаллы. *T*_{пл.} 222–223 °С. Спектр ¹H-ЯМР (400,17 МГц, ДМСО-*d*₆), δ, м. д. (*J*, Гц): 1,08 т (3H, CH₃, ³J_{HH} 7,1), 2,35 с (3H, CH₃), 4,14 кв (2H, CH₂O, ³J_{HH} 7,1), 6,73 дд (1H, CH_{Ar}, ³J_{HH} 3,6, ⁴J_{HH} 1,8), 7,09 д (1H, CH_{Ar}, ³J_{HH} 3,6), 7,32 с (2H, NH₂), 7,91 д (1H, CH_{Ar}, ⁴J_{HH} 1,8). Спектр ¹³C-ЯМР (101,62 МГц, ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 14,31 (CH₃), 23,41 (CH₃), 61,58 (CH₂O), 83,56 (C_{Ar}CN), 112,73 (CH_{Ar}), 114,16 (CH_{Ar}), 115,70 (CN), 116,69 (C_{Ar}), 140,45 (C_{Ar}), 145,87 (CH_{Ar}), 147,21 (C_{Ar}), 160,56 (C_{Ar}), 160,68 (C_{Ar}), 167,67 (C_{Ar}). Масс-спектр (HRMS-ESI), *m/z*: вычислено для C₁₄H₁₄N₃O₃, [M+H]⁺: 272,1030, найдено: 272,1036.

Экспериментальная биологическая часть

Анализ антимикробной активности синтезированных 2-амино-4-(2-фурил)пиридин-3-карбонитрилов проводили с использованием тест-штаммов грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* 0387, дрожжеподобного гриба *Candida utilis* LIA-01. Тест-штаммы были получены из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета. Антимикробную активность определяли методом диффузии в агар на среде Мюллера – Хинтона согласно протоколу CLSI, 2020¹.

Инокулюмы суточных тест-штаммов, выращенных на мясо-пептонном агаре при температуре 37 °С, с титром 1,5 × 10⁸ КОЕ/мл (для бактерий) и 1,5 × 10⁵ КОЕ/мл (для дрожжей), что соответствует плотности 0,5 по стандарту МакФарланда, засеивали газон на поверхность агаризованной среды. Растворы исследуемых соединений готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) и вносили по 50 мкл в лунки, асептически вырезанные в толще агара, или на стерильные диски производства Научно-исследовательского центра фармакотерапии (НИЦФ, СПб). В контрольные лунки и на диски вносили 50 мкл ДМСО. В качестве референс-препаратов использовали диски с бензилпенициллином (10 ЕД/диск) и ципрофлоксацином (5 мкг/диск) производства НИЦФ, СПб. Чашки Петри инкубировали в термостате при +35 °С в течение 24 ч. После инкубирования антимикробную активность определяли по образованию зон подавления роста тест-штаммов вокруг лунок или дисков. Статистиче-

¹ Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020. Available at: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>. Accessed: 25.07.2025.

скую значимость различий между диаметрами зон подавления роста каждого исследуемого соединения и референс-препаратов определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим U-тестом Манна – Уитни ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе ранее проведенных исследований [34] нами была изучена антимикробная активность ряда 2-амино-5,6-диалкил-4-(2-фурил)пиридин-3-карбонитрилов. Проведенный скрининг позволил экспериментально показать высокую активность производных данного класса соединений в отношении штамма грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. При этом наибольший интерес вызвали производные, содержащие в 4-м положении пиридинового кольца фурановый фрагмент.

На основании ранее полученных результатов целью данной работы было проведение исследования антимикробной активности производных ряда 2-амино-4-фурилпиридин-3-карбонитрилов и оценка влияния заместителей в 5-м и 6-м положениях пиридинового кольца на их активность. Синтез новых производных осуществлялся по методике, описанной в предыдущей работе [33], в ходе одnoreакторного процесса между соответствующим кетоном, фурфуролом и малондинитрилом в бензоле в присутствии ацетата аммония. Исследуемая реакция протекала аналогично, и изменения методики проводить не требовалось. Выход продуктов варьировал в диапазоне 71–92 % (рисунок 2).

Строение полученных соединений подтверждено данными ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C , а также данными масс-спектрометрии высокого разрешения. В качестве характерных сигналов, присут-

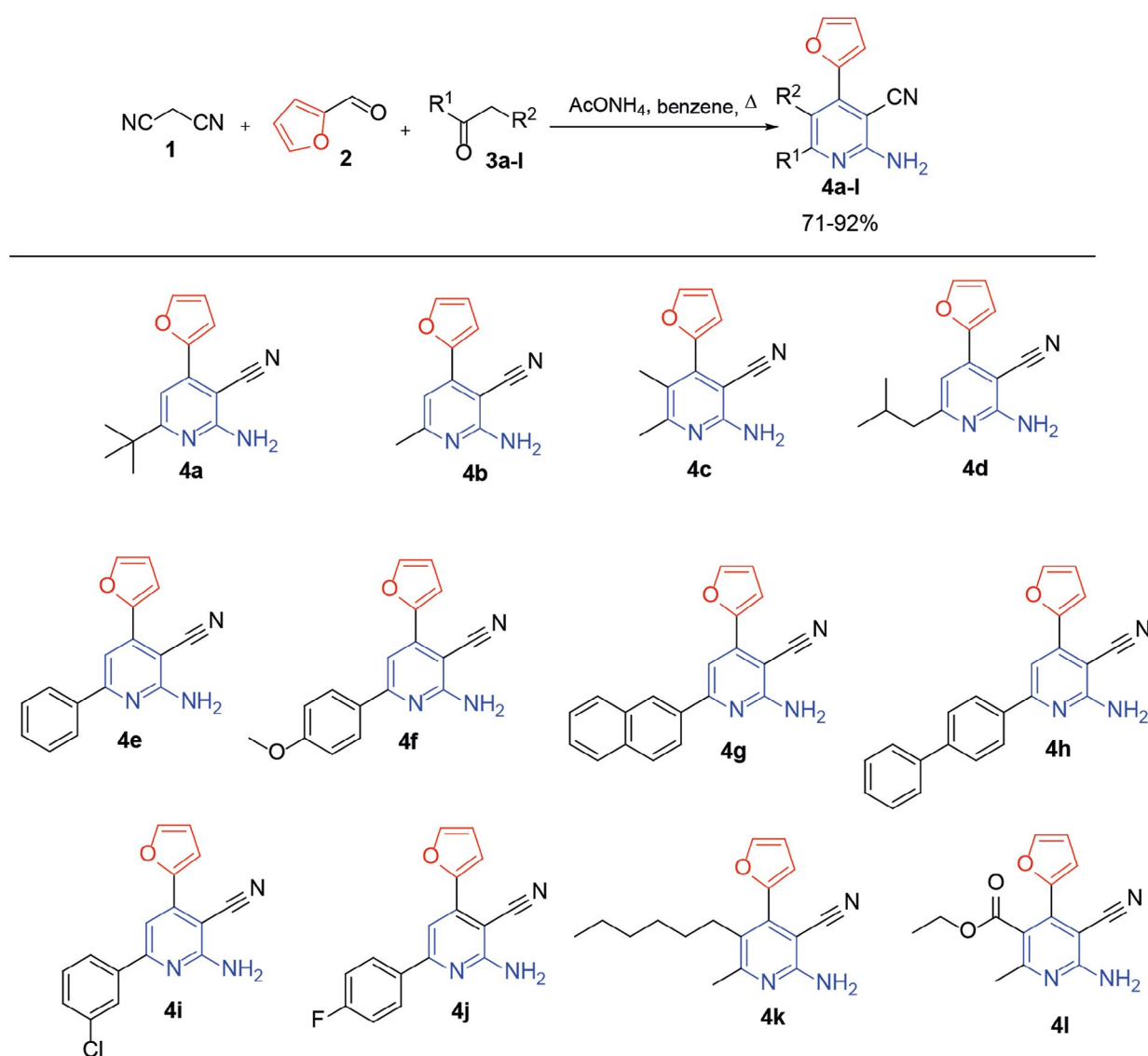


Рисунок 2. Схема синтеза 2-амино-4-(2-фурил)пиридин-3-карбонитрилов 4a–4l

Figure 2. Synthetic route to 2-amino-4-(furan-2-yl)pyridine-3-carbonitriles 4a–4l

вующих в спектрах ^1H -ЯМР, можно отметить сигнал группы NH_2 , выходящий в диапазоне δ_{H} 6,61–7,06 м. д., а также сигнал группы CH при ее наличии, выходящий в характерной области δ_{H} 6,86–7,60 м. д. По данным спектров ^{13}C -ЯМР, в качестве основных можно выделить сигнал атома углерода, связанного с нитрильной группой, который выходит в соответствующей области δ_{C} 80,28–81,95 м. д., и сигнал атома углерода нитрильной группы, выходящий в области δ_{C} 117,73–117,93 м. д.

In-vitro-исследования антимикробной активности показали, что все синтезированные соединения проявили активность по отношению к грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus*, это подтверждает выдвинутую гипотезу о том, что гибридные гетероциклические структуры, объединяющие в составе фурановый и пиридиновый фрагменты, обладают антимикробной активностью. Наиболее высокая антистафилококковая активность выявлена у соединения **4b**, содержащего в качестве заместителя метильную группу в 6-м положении, и **4c** с метильными группами в 5-м и 6-м положениях (таблица 1). Зоны ингибирования роста тест-штамма достигали 30 и 18 мм соответственно, что сопоставимо с активностью референс-препаратов бензилпенициллина в случае соединения **4b** и ципрофлоксацина в случае соединения **4c**. Соединения **4a**, **4d**, **4e**, **4f**, **4g**, **4h**, **4i**, **4j**, **4k**, **4l** проявили умеренную антистафилококковую активность, зоны ингибирования роста *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 составили от 13 до 15 мм, статистически значимых различий в их активности не выявлено. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что ключевое значение для проявления антистафилококковой активности связано с размером заместителей в 5-м и 6-м положении. Так, все соединения, содержащие в этом положении наименьший метильный заместитель или не содержащие заместителя (**4b**, **4c**), проявили большую активность по сравнению с остальными вариациями. Наличие более объемного *трет*-бутильного или изобутильного заместителя в 6-м положении (**4a** и **4d** соответственно) или наличие в 5-м положении крупных заместителей – гексильной или карбэтоксильной группы – приводит к существенному снижению проявляемой активности. Аналогичный результат наблюдается и в случае использования различных заместителей ароматической природы. Можно предположить несколько сценариев влияния строения исследуемых соединений на наблюдаемую активность. С одной стороны, ограничения зоны подавления могут возникать из-за низкой диффузии исследуемых соединений: чем больше молекулярная масса соединения, тем ниже проявляемая активность. Однако этот вариант не объясняет значительные различия в биологической активности соединений **4a** и **4b**, так как с данной точки зрения их структуры имеют несущественные различия и должны были бы проявлять схожие по величине зоны подавления роста. Возмож-

но, важную роль в механизме действия исследуемого вещества на штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 играет доступность пиридинового атома азота, и в этом случае наличие в 6-м положении объемного заместителя объясняет резкое снижение биологической активности при сравнении соединений **4a** и **4d** с **4b**. Этот же фактор может позволить объяснить изменение активности и в случае различных заместителей в 5-м положении соединений **4c**, **4k**, **4l**. Так, в случае соединения **4c** наличие в 5-м положении дополнительной метильной группы также снижает проявляемую активность, однако в меньшей степени по сравнению с более крупными заместителями в этом положении в соединениях **4k** и **4l**. Антимикробная активность полученных производных 2-амино-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрилов по отношению к штаммам грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* 0387 и дрожжеподобного гриба *Candida utilis* LIA-01 не выявлена.

Таблица 1. Антимикробная активность (зоны ингибирования роста) 2-амино-4-(2-фурил)-пиридин-3-карбонитрилов 4a–4l

Table 1. Antimicrobial activity (inhibition zone) of 2-amino-4-(furan-2-yl)pyridine-3-carbonitriles 4a–4l

Соединение* Compound*	Тест-штамм Test-strain		
	Зоны ингибирования роста, мм Growth suppression zone, mm		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 0387	<i>Candida utilis</i> LIA-01
4a	15 ± 0,5	—**	—
4b	29 ± 1,0	—	—
4c	18 ± 1,0	—	—
4d	14 ± 1,0	—	—
4e	14 ± 2,0	—	—
4f	13 ± 1,0	—	—
4g	13 ± 1,0	—	—
4h	14 ± 1,0	—	—
4i	14 ± 1,0	—	—
4j	14 ± 1,0	—	—
4k	15 ± 1,0	—	—
4l	13 ± 1,0	—	—
Бензилпенициллин Benzylpenicillin	29 ± 1,0	ND***	ND
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	19 ± 1,0	ND	ND

Примечание. * Концентрация соединений 5 мкг/диск.

** Зоны ингибирования роста отсутствуют.

*** ND – не определяли.

Note. * Compounds concentration 5 µg/disk.

** No activity.

*** Not determined.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования получен ряд новых замещенных 2-амино-5,6-диалкил-4-(2-фурил)пиридинил-3-карбонитрилов и исследована *in vitro* их антимикробная активность. Особое внимание с точки зрения биологической активности привлекают производные, содержащие фурильные фрагменты в четвертом положении пиридинового фрагмента. В целом соединения, относящиеся к ряду 2-амино-5,6-диалкил-4-(2-фурил)-пиридинил-3-карбонитрилов, можно рассматривать как перспективные антистафилококковые препараты, требующие более углубленного изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Smith W. P. J., Wucher B. R., Nadell C., Foster K. Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2023;21(8):519–534. DOI: 10.1038/s41579-023-00877-3.
- Bottery M. J., Pitchford J. W., Friman V.-P. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *The ISME Journal*. 2021;15(4):939–948. DOI: 10.1038/s41396-020-00832-7.
- Salam M. A., Al-Amin M. Y., Salam M. T., Pawar J. S., Akhter N., Rabaan A. A., Alqumber M. A. A. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare*. 2023;11(13):1946. DOI: 10.3390/healthcare11131946.
- Автономова А. В., Краснополянская Л. М. Анализ структуры возбудителей инвазивных микозов и развития их устойчивости к противогрибковым препаратам. *Антибиотики и Химиотерапия*. 2024;69(11–12):110–120. DOI: 10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-110-120. [Avtonomova A. V., Krasnopolskaya L. M. Structure of Pathogens Causing Invasive Mycoses and the Development of Their Resistance to Antifungal Drugs. *Antibiot Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024;69(11–12):110–120. (In Russ.) DOI: 10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-110-120.]
- Tilchenko D. A., Bibik E. Yu., Dotsenko V. V., Krivokolsko S. G., Frolov K. A., Aksenov N. A., Aksenova I. V. Synthesis and Hypoglycemic Activity of New Nicotinonitrile-Furan Molecular Hybrids. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2024;50(2):554–570. DOI: 10.1134/s1068162024020183.
- Ma X., Zhang W. Recent developments in one-pot stepwise synthesis (OPSS) of small molecules. *iScience*. 2022;25(9):105005. DOI: 10.1016/j.isci.2022.105005.
- Gorbunova I. A., Rogova A. S., Akhmetova D. R., Sidorov R. Yu., Priakhin E. E., Makhmudov R. R., Shipilovskikh D. A., Epifanovskaya O. S., Timin A. S., Shipilovskikh S. A. Design and one-pot synthesis of new substituted pyrrolo[1,2-a]thieno[3,2-e]pyrimidine as potential anti-tumor agents: *in vitro* and *in vivo* studies. *Bioorganic Chemistry*. 2024;148:107468. DOI: 10.1016/j.bioorg.2024.107468.
- Graebin C. S., Ribeiro F. V., Rogério K. R., Kümmerle A. E. Multicomponent Reactions for the Synthesis of Bioactive Compounds: A Review. *Current Organic Synthesis*. 2019;16(6):855–899. DOI: 10.2174/1570179416666190718153703.
- Saeid H., Al-Sayed H., Bader M. A Review on Biological and Medicinal Significance of Furan. *AlQalam Journal of Medical and Applied Sciences*. 2023;6(1):44–58. DOI: 10.5281/zenodo.7650255.
- Helmy M. T., Sroor F. M., Othman A. M., Hassaneen H. M., Saleh F. M., Mohamed Teleb M. A. Design, synthesis and *in-vitro* evaluation of new furan-substituted thiadiazolyl hydrazone derivatives as promising antimicrobial agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2023;60(4):585. DOI: 10.1002/jhet.4611.
- Kalyaev M. V., Ryabukhin D. S., Borisova M. A., Ivanov A. Yu., Boyarskaya I. A., Borovkova K. E., Nikiforova L. R., Salmo-va J. V., Ul'yanovskii N. V., Kosyakov D. S., Vasilyev A. V. Synthesis of 3-Aryl-3-(Furan-2-yl)Propanoic Acid Derivatives, and Study of Their Antimicrobial Activity. *Molecules*. 2022;27(14):4612. DOI: 10.3390/molecules27144612.
- Rendošová M., Gyepes R., Kello M., Vilková M., Mudroňová D., Olejníková P., Cardiano P., Gama S., Milea D., Vargová Z. Silver(I) pyrrole- and furan-2-carboxylate complexes – From their design and characterization to antimicrobial, anticancer activity, lipophilicity and SAR. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2023;246:112266. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2023.112266.
- Shatirova M. I., Karayeva A. R., Nagieva Sh. F., Gadzhiyeva L. Ya. Synthesis and Antimicrobial Activity of Unsaturated Ketones Containing a Furan Fragment. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2024;60(3):391–396. DOI: 10.1134/s1070428024030035.
- Zuma N. H., Aucamp J., N'Da D. D. An update on derivatization and repurposing of clinical nitrofurans. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;140:105092. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105092.
- Kashlikova I. M., Belyatskaya A. V., Krasnyuk I. I., Voropaeva E. A., Egorova E. A., Stepanova O. I., Vorob'yov A. N. Antimicrobial Activity of Nitrofur in Various Dosage Forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(1):57–60. DOI: 10.1007/s11094-020-02155-5.
- Althagafy H. S., Abd El-Aziz M. K., Ibrahim I. M., Abd-alhameed E. K., Hassanein E. H. M. Pharmacological updates of nifuroxazide: Promising preclinical effects and the underlying molecular mechanisms. *European Journal of Pharmacology*. 2023;951:175776. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175776.
- Perry C. M., Brogden R. N. Cefuroxime Axetil. *Drugs*. 1996;52(1):125–158. DOI: 10.2165/00003495-199652010-00009.
- Albarellos G. A., Landoni M. F. Current concepts on the use of antimicrobials in cats. *The Veterinary Journal*. 2009;180(3):304–316. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.01.001.
- Inshutiymana S., Aleu M. M., Abdinoor M. A., Janoowalla M. M., Norhayati N. Diloxanide in amoebiasis management: Unravelling the mechanism of action and effectiveness. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2024;136(1):e14106. DOI: 10.1111/bcpt.14106.
- Islam M. B., Islam M. I., Nath N., Emran T. B., Rahman M. R., Sharma R., Matin M. M. Recent Advances in Pyridine Scaffold: Focus on Chemistry, Synthesis, and Antibacterial Activities. *BioMed Research International*. 2023;9967591. DOI: 10.1155/2023/9967591.
- Elsayed M. A., Elsayed A. M., Sroor F. M. Novel biologically active pyridine derivatives: Synthesis, structure characterization, *in vitro* antimicrobial evaluation and structure-activity relationship. *Medicinal Chemistry Research*. 2024;33(3):476–491. DOI: 10.1007/s00044-024-03188-1.
- Ayaz M., Gündoğdu Ö., Aytaç S., Erdem B., Çiftçi H., Erdogdu Y. Microwave-assisted synthesis, characterizations, antimicrobial activities, and DFT studies on some pyridine derived Schiff bases. *Journal of Molecular Structure*. 2022;1269:133791. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.133791.
- Alsfook A. A., Othman I. M. M., Anwar M. M., Alshareef W. A., Saleh A., Saleh A. K., Nossier E. S. Synthesis and Computational Studies of New Pyridine, Pyrazole, Pyran, and Pyranopyrimidine-Based Derivatives of Potential Antimicrobial Activity as DNA Gyrase and Topoisomerase IV Inhi-

- bitors. *Journal of Molecular Structure*. 2025;1319:139528. DOI: 10.1016/j.molstruc.2024.139528.
24. Alsolimy A. Synthesis, computational and antimicrobial evaluation of some new pyridine derivatives. *Archiv der Pharmazie*. 2022;356(3):2200399. DOI: 10.1002/ardp.202200399.
25. Chiacchio M. A., Iannazzo D., Romeo R., Giofrè S. V., Legnani L. Pyridine and Pyrimidine Derivatives as Privileged Scaffolds in Biologically Active Agents. *Current Medicinal Chemistry*. 2018;26(40):7166–7195. DOI: 10.2174/0929867325666180904125400.
26. Furuya K., Mori H., Williams G. J. An enhancing effect of the antihistaminic drug methapyrilene on rat liver carcinogenesis by previously administered N-2-fluorenylaceta-mide. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1983;70(1):49–56. DOI: 10.1016/0041-008x(83)90178-3.
27. Preynat-Seauve O., Nguyen E. B.-V., Westermaier Y., Héritier M., Tardy S., Cambet Y., Feyeux M., Caillon A., Scapozza L., Krause K.-H. Novel Mechanism for an Old Drug: Phenazopyridine is a Kinase Inhibitor Affecting Autophagy and Cellular Differentiation. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:664608. DOI: 10.3389/fphar.2021.664608.
28. Kandil S., Prencipe F., Jones S., Hiscox S., Westwell A. D. The discovery of new and more potent chloropyramine (C4) analogues for the potential treatment of invasive breast cancer. *Chemical Biology & Drug Design*. 2017;91(1):314–321. DOI: 10.1111/cbdd.13083.
29. Liu B., Zhang X., Wang C., Zhang G., Zhang H. Antihis-tamine mepyramine directly inhibits KCNQ/M chan-nel and depolarizes rat superior cervical ganglion neu-rons. *Neuropharmacology*. 2008;54(4):629–639. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2007.11.012.
30. Egeberg M. D., Oh C. Y., Bainbridge J. L. Clinical Over-view of Dalfampridine: An Agent With a Novel Me-chanism of Action to Help With Gait Disturban-ces. *Clinical Therapeutics*. 2012;34(11):2185–2194. DOI: 10.1016/j.clinthera.2012.10.003.
31. Ward A., Brogden R. N., Heel R. C., Speight T. M., Avery G. S. Amrinone: A Preliminary Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use. *Drugs*. 1983;26(6):468–502. DOI: 10.2165/00003495-198326060-00002.
32. Heigener D. F., Reck M. Crizotinib. In: Martens U. M., editor. *Small Molecules in Oncology*. Cham: Springer Cham; 2018. P. 57–65. DOI: 10.1007/978-3-319-91442-8_4.
33. Bespalov D. S., Egorov D. M., Krylov A. S., Chernova E. N., Kuzikova I. L., Zhakovskaya Z. Synthesis of 5,6-Dialkyl-4-aryl-2-aminopyridine-3-carbonitriles and In Vitro Study of Their Antimicrobial Activity. *Russian Journal of General Chemistry*. 2024;94(12):3173–3180. DOI: 10.1134/s1070363224120065.
34. Kidwai M., Thakur R., Rastogi S. Ecofriendly synthesis of substituted pyridine and pyrido[2,3-d]pyrimidine deriva-tives. *Russian Chemical Bulletin*. 2005;54(6):1523–1526. DOI: 10.1007/s11172-005-0440-z.
35. Gouda M. A., Berghot M. A., Abd El-Ghani G. E., Kha-lil A. E.-G. M. Synthesis and Antioxidant Evaluation of Some Nicotinonitriles. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2015;53(4):1241–1250. DOI: 10.1002/jhet.2414.
36. Wu Q., Zhang Y., Cui S. Divergent Syntheses of 2-Amino-nicotinonitriles and Pyrazolines by Copper-Catalyzed Cyc-lization of Oxime Ester. *Organic Letters*. 2014;16(5):1350–1353. DOI: 10.1021/ol500094w.
37. Latif N., Mishriky N., Girgis N. S. Malononitriles & Cya-noesters: Part VI – Synthesis of New Biologically Active Cyanopyridines. *Indian Journal of Chemistry – Section B Organic and Medicinal Chemistry*. 1981;20(2):147–149.
38. Abdel-Fattah M. A. O., El-Naggar M. A. M., Rashied R. M. H., Gary B. D., Piazza G. A., Abadi A. H. Four-Component Synthesis of 1,2-Dihydropyridine Derivatives and their Evaluation as Anticancer Agents. *Medicinal Chemistry*. 2012;8(3):392–400. DOI: 10.2174/1573406411208030392.

Бесплатное мероприятие

«Разработка и регистрация лекарственных средств. Мастер-классы от команды ЦФА»

г. Москва, 19 сентября 2025 года

- Применение методов ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, ИФА для биоаналитических исследований
- Применение ТСКР и других методов моделирования высвобождения лекарственных средств в условиях *in vitro*
- Рассмотрение возможных запросов регулятора по исследованиям биоэквивалентности и ТСКР

Подробности на сайте



Зарегистрироваться





Экспериментальное и CFD-исследование новой конструкции прямоточного циклона

Е. В. Флисюк¹✉, В. С. Топталов², О. М. Флисюк², И. Г. Лихачев², Ю. М. Коцур¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)» [Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), СПбГТИ(ТУ)]. 190013, Россия, г. Санкт-Петербург, проспект Московский, д. 24–26/49, литера А

✉ Контактное лицо: Флисюк Елена Владимировна. E-mail: elena.flisyuk@pharminnotech.com

ORCID: Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
В. С. Топталов – <https://orcid.org/0009-0008-0215-7059>;
О. М. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0003-0527-8725>;
И. Г. Лихачев – <https://orcid.org/0000-0002-7180-0270>;
Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>.

Статья поступила: 24.01.2025

Статья принята в печать: 16.06.2025

Статья опубликована: 20.06.2025

Резюме

Введение. Очистка газовых потоков является важной задачей многих отраслей промышленности в области инженерной защиты окружающей среды. При осуществлении подобных мероприятий зачастую применяются циклоны – аппараты для очистки газовых потоков от мелкодисперсных частиц. В фармацевтической промышленности для решения таких задач требуется применение компактных высокоэффективных аппаратов, для разработки и исследования которых в последнее время все чаще применяются методы CFD-моделирования. В работе приводится сравнение результатов CFD-моделирования процесса очистки газа в прямоточном циклоне новой конструкции и эффективности улавливания в этом аппарате, полученной в результате экспериментальных исследований.

Цель. Сравнение результатов численного моделирования процесса очистки газа в двух конфигурациях прямоточного циклона новой конструкции с результатами эксперимента.

Материалы и методы. Для численного CFD-моделирования процесса разделения в исследуемом аппарате использовался программный комплекс FlowVision. Движение дискретной фазы – частиц – описывалось с помощью Lagrangian particle model. Для распределения частиц по размерам использовалось распределение Розина – Раммлера с минимальным диаметром 15 мкм, медианным 40 мкм и максимальным 120 мкм. Эксперименты проводились на экспериментальной установке, основной частью которой являлись прямоточный циклон, центробежный вентилятор и шнековый дозатор. В качестве модельного материала использовался тальк марки ТРПН, дисперсное распределение частиц которого было определено методом лазерной дифракции на анализаторе частиц SALD-2300 (Shimadzu, Япония).

Результаты и обсуждение. CFD-модель аппарата позволила определить поле скоростей газа, траектории потока и эффективность улавливания частиц в исследуемых конфигурациях прямоточного циклона. На основании информации о поле скорости газа и траекторий потока сделаны выводы о наиболее эффективных конструкторских решениях. Сравнение результатов численного моделирования и результатов эксперимента показало хорошую сходимость.

Заключение. Разработанная конструкция прямоточного циклона показала хорошую эффективность улавливания мелкодисперсных частиц. Численное CFD-моделирование позволило определить конструктивные особенности, негативно влияющие на эффективность, и оптимизировать конструкцию аппарата. Хорошая сходимость результатов модели и эксперимента подтверждает возможность использования CFD-программ для точного моделирования технологических процессов и определения их параметров.

Ключевые слова: прямоточный циклон, пылеулавливание, CFD, FlowVision, закрученный поток, численное моделирование

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

Вклад авторов. О. М. Флисюк и В. С. Топталов – концептуализация. И. Г. Лихачев – методология и проверка. Е. В. Флисюк, Ю. М. Коцур – формальный анализ. В. С. Топталов – исследования. В. С. Топталов – написание – первоначальная черновая подготовка. О. М. Флисюк, Е. В. Флисюк, Ю. М. Коцур – написание – рецензирование и редактирование. И. Г. Лихачев – надзор.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект 21-79-30029).

Для цитирования: Флисюк Е. В., Топталов В. С., Флисюк О. М., Лихачев И. Г., Коцур Ю. М. Экспериментальное и CFD-исследование новой конструкции прямоточного циклона. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):92–97. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2019>

Experimental and CFD study of a new design of a direct-flow cyclone

Elena V. Flisyuk¹✉, Valery S. Toptalov², Oleg M. Flisyuk², Ilya G. Likhachev², Yulia M. Kotsur¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University). 24–26/49A, prospect Moskovsky, Saint-Petersburg, 190013, Russia

✉ **Corresponding author:** Elena V. Flisyuk. **E-mail:** elena.flisyuk@pharminnotech.com

ORCID: Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
Valery S. Toptalov – <https://orcid.org/0009-0008-0215-7059>;
Oleg M. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0003-0527-8725>;
Ilya G. Likhachev – <https://orcid.org/0000-0002-7180-0270>;
Yulia M. Kotsur – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>.

Received: 24.01.2025

Accepted: 16.06.2025

Published: 20.06.2025

Abstract

Introduction. Purification of gas streams plays an important role in many industries in the field of environmental engineering. When implementing such measures, cyclones are often used – devices for cleaning gas streams from fine particles. In the pharmaceutical industry solving such problems requires the use of compact, highly efficient devices, for the development and study of which CFD-modelling methods have recently been increasingly used. The paper presents a comparison of the results of CFD-modelling of the gas purification process in a direct-flow cyclone of a new design and the capture efficiency in this apparatus obtained as a result of experimental studies.

Aim. Comparison of the results of numerical modelling of the gas purification process in two configurations of a direct-flow cyclone of a new design with the experimental results.

Materials and methods. The FlowVision software package was used for numerical CFD-modelling of the separation process in the studied device. The motion of the discrete phase – particles – was described using the Lagrangian particle model. Rosin-Rummler distribution with a minimum diameter of 15 microns, a median of 40 microns, and a maximum of 120 microns was used to distribute the particles by size. The experiments were carried out on an experimental setup, the main part of which was a direct-flow cyclone, a centrifugal fan and a screw doser. Technical talc was used as a model material, the dispersed particle distribution of which was determined by laser diffraction on a SALD-2300 particle analyzer (Shimadzu, Japan).

Results and discussion. The CFD-model of the device allowed us to determine the gas velocity field, flow trajectories and particle capture efficiency in the studied configurations of a direct-flow cyclone. Based on the information about the gas velocity field and flow trajectories, conclusions were made about the most effective 4 design solutions. Comparison of the numerical simulation results and the experimental results showed good convergence.

Conclusion. The developed design of the direct-flow cyclone showed good efficiency of fine particle capture. Numerical CFD-modelling allowed us to determine design features that negatively affect the efficiency and to optimize the design of the device. Good convergence of the model and experimental results confirms the possibility of using CFD-programmes for accurate modelling of technological processes and determining their parameters.

Keywords: direct-flow cyclone, dust collection, CFD, FlowVision, swirling flow, numerical modeling

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. Oleg M. Flisyuk and Valery S. Toptalov – conceptualization. Ilya G. Likhachev – methodology and validation. Oleg M. Flisyuk – formal analysis. Valery S. Toptalov – investigation. Valery S. Toptalov – writing – original draft. Oleg M. Flisyuk and Elena M. Flisyuk – writing – review and editing. Ilya G. Likhachev – supervision.

Funding. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project 21-79-30029).

For citation: Flisyuk E. V., Toptalov V. S., Flisyuk O. M., Likhachev I. G., Kotsur Yu. M. Experimental and CFD study of a new design of a direct-flow cyclone. *Drug development & registration*. 2025;14(3):92–97. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2019>

ВВЕДЕНИЕ

Циклоны представляют собой устройства, широко применяемые в химической, фармацевтической и перерабатывающей промышленности для очистки газов от твердых частиц. Улавливаемая мелкодисперсная твердая фаза в большинстве случаев представляет собой отходы производства. Сепарация таких материалов из выбрасываемых в атмосферу газов обеспечивает защиту окружающей среды от вредного воздействия на атмосферу.

Большинство известных на данный момент прямоточных циклонов, имеющих конкурентную эффективность очистки, обладают при этом и достаточно громоздкой конструкцией. Но в фармацевтической промышленности зачастую требуется использование компактного промышленного оборудования, которое при этом имеет и хорошие технико-технологические характеристики. При разработке такого оборудования целесообразно применять методы вычислительной гидродинамики (CFD), которые позволяют еще на этапе проектирования аппарата определить его эффективность и при необходимости оптимизировать конструкцию. В настоящее время исследованиям гидродинамики циклонов посвящено достаточно много работ [1–4].

Исследователи активно занимаются разработкой новых и совершенствованием имеющихся конструкций газоочистителей. Так, в работе *Jianfei Song* и др. [5] проведено экспериментальное и численное исследование циклонного сепаратора с тангенциальным подводом газа. *Lingzi Wang* и др. [6] описывают циклон с многослойным центральным каналом. Особенностью циклона является многоступенчатая и многократная закрутка входящего потока газа. *Ik-Hyun An* и др. разработали миниатюрный циклонный сепаратор [7], работающий при скорости потока менее 200 мл/мин.

Помимо работ по разработке новых конструкций аппаратов, можно отметить ряд статей, в которых изучается гидродинамика закрученных газовых потоков. Авторами в работах [8–9] приведен ряд математических моделей и численных исследований движения закрученных потоков в динамических газопромыслователях и циклонах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования является прямоточный циклон, а именно две его компоновки, представленные на рисунке 1. Различие компоновок определяет только форма и диаметр стабилизатора завихрителя: в первом случае диаметр стабилизатора составляет 20 % от диаметра входного патрубка аппарата, во втором – 65 %. Аппарат предназначен для улавливания мелкодисперсных частиц – размером от 15 мкм – из газовых потоков. Компактная конструкция, состоящая из патрубков для входа и выхода газа, а также лопастного завихрителя с профилированными ло-

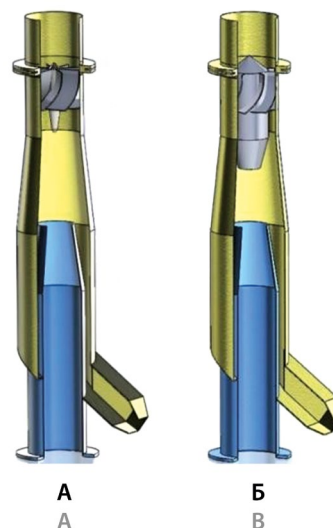


Рисунок 1. Компоновки исследуемого прямоточного циклона

Figure 1. Layouts of the investigated direct-flow cyclone

патками, уменьшающими турбулентность, позволяет встраивать циклон прямо в технологическую линию, в том месте, где это необходимо. На представленную конструкцию получен патент [10].

Процесс численного CFD-моделирования основывается на информации о поле скорости газа в аппарате. В настоящее время благодаря быстрому развитию вычислительной техники оказывается возможным осуществить расчеты течения газа при помощи численного решения уравнений гидродинамики.

Постановка задачи численного исследования циклона. Численное моделирование проводилось в программном комплексе FlowVision. Применяемый программный комплекс с высокой точностью позволяет моделировать различные технологические процессы, в том числе процессы тепло- и массообмена, а также строить расходонапорные характеристики насосного оборудования, определять кавитационный запас и т. д.

Так как при прохождении потока газа через аппарат образуется достаточно сложная гидродинамическая картина, основными особенностями которой являются обтекание лопастей и срыв потока газа с них, для моделирования процесса была выбрана модель турбулентности $k-\omega$ SST, которая наилучшим образом подходит для описания таких течений.

Для моделирования дисперсной фазы была выбрана Lagrangian particle model. Абсолютная плотность материала – 2,6 г/мл³, приблизительно такая же, как у экспериментального материала – талька. Из-за небольшого размера форма частиц не оказывала никакого влияния на результат моделирования, поэтому было принято, что частицы имели форму

шара. Распределение Розина – Раммлера с минимальным диаметром 15 мкм, медианным 40 мкм и максимальным 120 мкм определяло их размер.

Описание экспериментальной установки. Эффективность улавливания рассматриваемого циклона определялась на установке, схема которой приведена на рисунке 2.

Установка работает следующим образом. Центробежный вентилятор 9 создает разрежение в циклоне 4, за счет чего в него всасывается воздух. Мелкодисперсный материал дозируется во входящий поток воздуха шнековым питателем 1. Поток воздуха с частицами проходит через завихритель и за счет возникшей центробежной силы частицы отбрасываются к стенкам циклона, затем они вместе с закрученным потоком воздуха попадают в камеру для сбора пыли. Расход воздуха регулируется шиберной заслонкой 7.

В качестве модельного материала для проведения экспериментов был выбран тальк молотый марки ТРПН. Дисперсный состав исходного материала был проанализирован методом лазерной дифракции на анализаторе частиц SALD-2300 (Shimadzu, Япония). Результаты анализа пробы приведены на рисунке 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В программном комплексе FlowVision были определены поля скоростей, траектории потока и эффективность обеих конфигураций циклона. На рисунке 4, А и 4, Б представлены результаты моделирования поля скорости в аппарате с обычным завихрителем и с завихрителем, у которого удлинен стабилизатор. При использовании обычного стабилизатора после завихрителя образуется турбулентный след, в который попадают твердые частицы из газового потока. В турбулентном следе они движутся хаотически и под действием всасывающей силы (в выходящем из циклона воздухе) уносятся в патрубок для выхода газа.

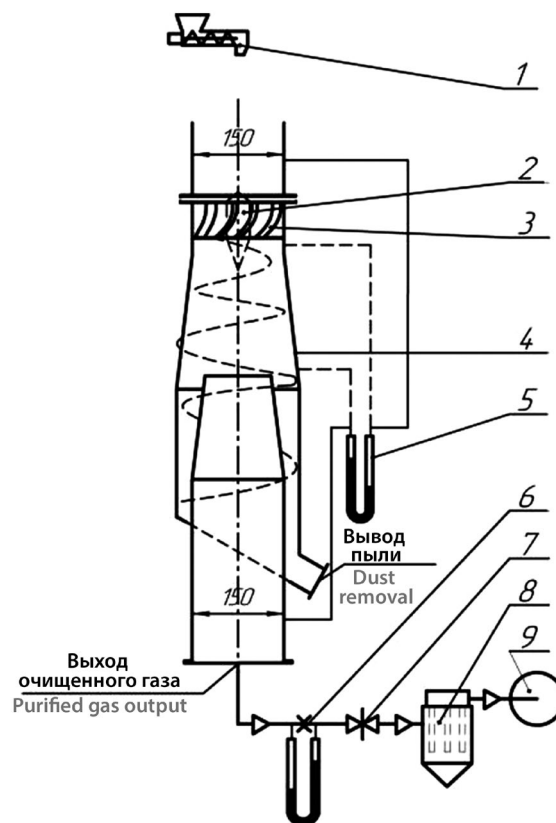


Рисунок 2. Схема экспериментальной установки.

1 – шнековый дозатор; 2 – завихритель; 3 – лопасть завихрителя; 4 – корпус прямоточного циклона; 5 – дифманометр; 6 – диафрагма с присоединенным к ней дифманометром; 7 – шиберная заслонка; 8 – рукавный фильтр; 9 – центробежный вентилятор

Figure 2. The scheme of the experimental installation.

1 – screw doser; 2 – swirler; 3 – swirler blade; 4 – direct-flow cyclone housing; 5 – differential manometer; 6 – diaphragm with a differential manometer attached to it; 7 – flip gate; 8 – bag filter; 9 – centrifugal blower

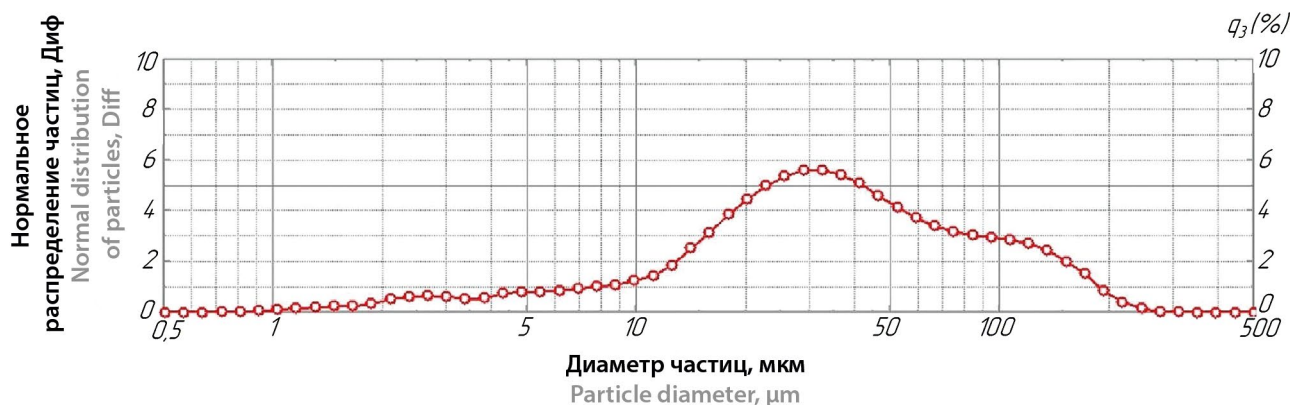


Рисунок 3. Дисперсный состав исходного материала (талька)

Figure 3. The dispersed composition of the starting material (talс)

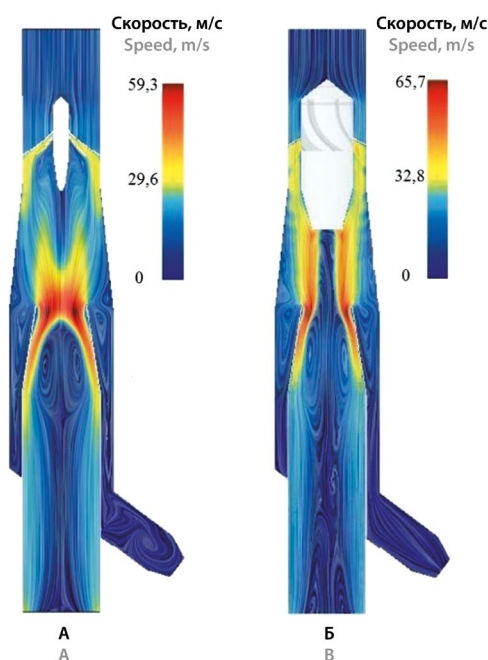


Рисунок 4. Поле скорости газа в циклонах с различной геометрией стабилизатора

Figure 4. Gas velocity field in cyclones with different stabilizer geometry

В случае использования удлиненного стабилизатора турбулентный след образуется в патрубке для выхода газа. После стабилизатора завихрителя наблюдается только небольшой срыв потока, который не оказывает существенного влияния на процесс сепарации в циклоне.

Траектории потока на рисунке 5, А и 5, Б наглядно показывают, что использование удлиненного стабилизатора положительно сказывается на общей структуре потока газа в аппарате – при использовании такого стабилизатора значительная часть потока проходит через камеру для сбора частиц и лишь затем уходит в патрубок для выхода газа.

На рисунке 6, А и 6, Б показано распределение объемной концентрации частиц в меридиональной плоскости циклона. На рисунке 6, Б видно, как частицы, проходя завихритель, образуют достаточно плотный слой у стенок камеры разделения, впоследствии попадая в камеру для сбора. В то же время в случае использования стабилизатора обычной формы (рисунок 6, А) многие частицы, попадая в турбулентный след завихрителя, уносятся в патрубок для очищенного газа, что уменьшает эффективность работы аппарата.

Сопоставление расчетной и экспериментальной эффективности циклона. На рисунке 7 приведены расчетные и экспериментальные кривые зависимости эффективности улавливания от скорости газового потока, входящего в аппарат. При работе с достаточно мелкодисперсными частицами аппарат показал высокий КПД очистки – 91 %, а результаты моделирова-



Рисунок 5. Различие в структуре потока

Figure 5. Difference in flow structure

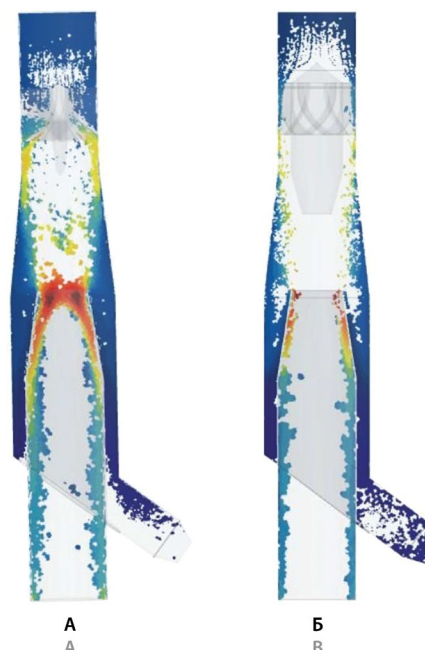


Рисунок 6. Объемное распределение частиц в меридиональной плоскости циклона

Figure 6. Volume distribution of particles in the meridional plane of the cyclone

ния и экспериментальные данные показали хорошую сходимость. Разница в эффективности между конфигурациями аппарата составила около 10 %. В ходе эксперимента было определено, что диапазон скорости воздуха для наиболее эффективного разделения составляет 12–14 м/с.

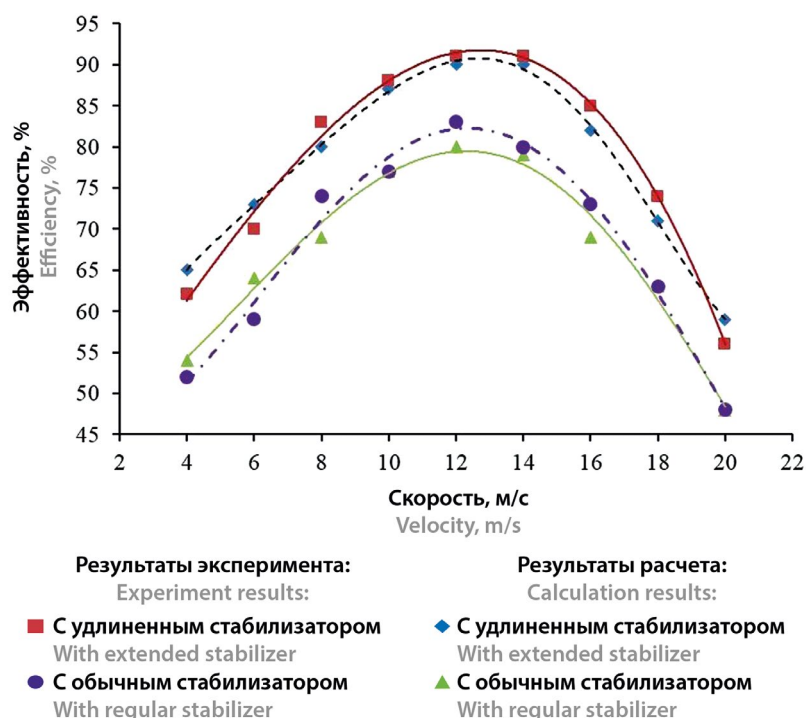


Рисунок 7. Экспериментальная и расчетная зависимость эффективности улавливания аппарата от скорости газового потока

Figure 7. Experimental and calculated dependence of the apparatus capture efficiency on the gas flow velocity

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что представленная конструкция циклона может успешно применяться в промышленности для улавливания из газовых потоков пылей различных материалов и составов, в том числе мелкодисперсных. Компактность конструкции при достаточно высокой степени разделения, в том числе для мелкодисперсных частиц, позволяет применять его в стесненных производственных помещениях.

Численное моделирование аппарата показало хорошую сходимость с экспериментальными данными. Это в очередной раз доказывает возможность применения CFD-моделирования для расчета технологических аппаратов и оптимизации их конструкции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Yu G., Dong S., Yang L., Yan D., Dong K., Wei Y., Wang B. Experimental and numerical studies on a new double-stage tandem nesting cyclone. *Chemical Engineering Science*. 2021;236:116537. DOI: 10.1016/j.ces.2021.116537.
- Safikhani H., Akhavan-Behabadi M. A., Shams M., Rahimyan M. H. Numerical simulation of flow field in three types of standard cyclone separator. *Advanced Powder Technology*. 2010;21(4):435–442. DOI: 10.1016/j.appt.2010.01.002.
- Gimbun J., Chuah T. G., Choong T. S. Y., Fakhru'l-Razi A. A CFD study on the prediction of cyclone collection efficiency. *International Journal for Computational Methods in Engineering Science and Mechanics*. 2005;6(3):161–168. DOI: 10.1080/15502280590923649.
- You Y., Seibold F., Wang S., Weigand B., Gross U. URANS of turbulent flow and heat transfer in divergent swirl tubes using the k- ω SST turbulence model with curvature correction. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2020;159:120088. DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2020.120088.
- Song J., Wei Y., Sun G., Chen J. Experimental and CFD study of particle deposition on the outer surface of vortex finder of a cyclone separator. *Chemical Engineering Journal*. 2017;309:249–262. DOI: 10.1016/j.cej.2016.10.019.
- Wang L., Liu B., Feng J., Peng X. Experimental study on the separation performance of a novel oil-gas cyclone separator. *Powder Technology*. 2023;415:118124. DOI: 10.1016/j.powtec.2022.118124.
- An I.-H., Lee C.-H., Lim J.-H., Lee H.-Y., Yook S.-J. Development of a miniature cyclone separator operating at low Reynolds numbers as a pre-separator for portable black carbon monitors. *Advanced Powder Technology*. 2021;32(12):4779–4787. DOI: 10.1016/j.appt.2021.10.027.
- Narasimha M., Brennan M. S., Holtham P. N., Napier-Munn T. J. A comprehensive CFD model of dense medium cyclone performance. *Minerals Engineering*. 2007;20(4):414–426. DOI: 10.1016/j.mineng.2006.10.004.
- Mousavi S. M., Ghadimi B., Kowsary F. Numerical study on the effects of multiple inlet slot configurations on swirl cooling of a gas turbine blade leading edge. *International Communications in Heat and Mass Transfer*. 2018;90:34–43. DOI: 10.1016/j.icheatmasstransfer.2017.10.012.
- Flisyuk O. M., Toptalov V. S., Martsulevich N. A., Muratov O. V. Direct-flow cyclone. Patent RUS 195672U1 RU 2020.



Выбор полимерного носителя для создания твердой дисперсной системы диосмина методом экструзии горячего расплава

А. А. Данилова✉, Е. В. Вишняков, Е. С. Сурбеева, К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, Е. В. Флисюк

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

✉ Контактное лицо: Данилова Александра Артёмовна. E-mail: shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

ORCID: А. А. Данилова – <https://orcid.org/0000-0002-0191-7342>;
Е. В. Вишняков – <https://orcid.org/0000-0002-4716-7866>;
Е. С. Сурбеева – <https://orcid.org/0000-0002-7005-2477>;
К. А. Гусев – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>;
Д. Н. Маймистов – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>;
Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Статья поступила: 23.06.2025

Статья принята в печать: 09.07.2025

Статья опубликована: 11.07.2025

Резюме

Введение. Крайне неудовлетворительные физико-химические и технологические свойства диосмина, входящего в состав ряда востребованных флебопротекторных лекарственных средств, становятся причиной увеличения терапевтической дозировки активного вещества в лекарственной форме и влияют на усложнение производственного процесса. С целью улучшения характеристик активной субстанции предложена технология создания твердых дисперсных систем методом экструзии горячего расплава. Особую значимость в контексте рассматриваемого подхода приобретает выбор эффективной полимерной матрицы.

Цель. Выбор и обоснование использования полимерного носителя из группы поливинилпирролидонов для создания твердой дисперсии диосмина методом экструзии горячего расплава.

Материалы и методы. Объект исследования: субстанция диосмина (субстанция-порошок, Chengdu Runde Pharmaceutical Co., Ltd., Китай). В качестве кандидатов для разработки твердых дисперсий с модельным соотношением АФС и носителя 1:99 выбраны два родственных гидрофильных полимера: сополимер поливинилпирролидона с винилацетатом в соотношении 60:40 (ПВПВА) марки VIVAPHARM® PVP/VA 64 (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия) и поливинилпирролидон марки Kollidon® K17 PF (BASF, США). Термические свойства АФС и полимеров-носителей исследовали с помощью синхронного термического анализа. Получение ТДС диосмина осуществляли с помощью двухшнекового лабораторного экструдера НААКЕ™ MiniCTW (Thermo Fisher Scientific, Германия). Количественное содержание диосмина в составе твердых дисперсий определяли методом ВЭЖХ. Для оценки влияния процесса экструзии на функциональные характеристики образцов изучали технологические свойства АФС и измельченных твердых дисперсий. В том числе исследовали термические и структурные характеристики методами дифференциально-сканирующей калориметрии и ИК-Фурье-спектроскопии соответственно.

Результаты и обсуждение. Использование Kollidon® K17 в составе бинарных твердых дисперсий диосмина является неэффективным по причине повышенной вязкости расплава, наличия рисков образования неоднородной системы, а также потенциального ухудшения технологических свойств образцов относительно исходной микронизированной АФС. С учетом особенностей ведения процесса экструзии, а также принимая во внимание результаты оценки термических, структурных и технологических характеристик твердых дисперсных систем, сделан вывод об эффективности использования сополимера поливинилпирролидона с винилацетатом. Рассматриваемая полимерная матрица позволяет обеспечить более однородное диспергирование и сплавление с диосмином наряду с тенденцией к возможной аморфизации действующего вещества, что позволит в том числе улучшить свойства его растворимости.

Заключение. Использование сополимера поливинилпирролидона с винилацетатом способствует улучшению неудовлетворительных характеристик микронизированной субстанции диосмина, что в перспективе позволит нивелировать отклонения в ходе процесса производства твердых лекарственных форм за счет снижения рисков пылеобразования, механических потерь в совокупности с обеспечением однородности дозирования.

Ключевые слова: диосмин, ПВПВА 64, Kollidon® K17, твердые дисперсии, экструзия горячего расплава, технологические свойства, температура стеклования

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

Вклад авторов. А. А. Данилова – поиск и систематизация данных, планирование экспериментальных работ и реализация получения опытных образцов твердых дисперсий диосмина методом экструзии горячего расплава, оценка технологических свойств образцов, интерпретация термических характеристик. Е. В. Вишняков – снятие ИК-Фурье-спектров твердых дисперсий. Е. В. Вишняков, А. А. Данилова – интерпретация данных ИК-Фурье-спектроскопии. Е. С. Сурбеева – определение количественного содержания диосмина в опытных образцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. А. А. Данилова – статистический анализ данных. А. А. Данилова, К. А. Гусев, Е. В. Флисюк, Д. Н. Маймистов – обсуждение результатов, написание теста статьи.

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

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании JRS Pharma (ООО «Реттенмайер РУС», Россия) за предоставленные образцы полимера.

Для цитирования: Данилова А. А., Вишняков Е. В., Сурбеева Е. С., Гусев К. А., Маймистов Д. Н., Флисюк Е. В. Выбор полимерного носителя для создания твердой дисперсной системы диосмина методом экструзии горячего расплава. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):98–107. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2128>

Polymer carrier selection for creation of diosmin solid dispersion system by hot melt extrusion

Alexandra A. Danilova✉, Evgeniy V. Vishnyakov, Elizaveta S. Surbееva, Konstantin A. Gusev, Denis N. Maimistov, Elena V. Flisyuk

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

✉ **Corresponding author:** Alexandra A. Danilova. **E-mail:** shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

ORCID: Alexandra A. Danilova – <https://orcid.org/0000-0002-0191-7342>;

Evgeniy V. Vishnyakov – <https://orcid.org/0000-0002-4716-7866>;

Elizaveta S. Surbееva – <https://orcid.org/0000-0002-7005-2477>;

Konstantin A. Gusev – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>;

Denis N. Maimistov – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>;

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

Received: 23.06.2025

Accepted: 09.07.2025

Published: 11.07.2025

Abstract

Introduction. The extremely unfavorable physical, chemical and functional properties of diosmin, a component of a number of popular phlebotective drugs, cause an increased therapeutic dosage of the active pharmaceutical ingredient (API) in the dosage form and complicate the manufacturing process. In order to improve the characteristics of API, a technology of solid dispersion systems (SDS) creation by hot melt extrusion (HME) has been proposed. Particular importance in the context of current approach is attached to the selection of an effective polymer matrix.

Aim. The selection and justification of using a polymer carrier from the polyvinylpyrrolidone group for creating diosmin solid dispersions by hot melt extrusion.

Materials and methods. Object of study: diosmin (powder micronized substance, Chengdu Runde Pharmaceutical Co., Ltd., China). As candidates for the development of solid dispersions with a model ratio of API to carrier of 1:99, two related hydrophilic polymers were selected: a copolymer of polyvinylpyrrolidone with vinyl acetate in a ratio of 60:40 (PVPVA) – VIVAPHARM® PVP/VA 64 (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Germany), and polyvinylpyrrolidone brand Kollidon® K17 PF (BASF, USA). The thermal properties of the API and polymer carrier were characterized using synchronous thermal analysis. Diosmin SDS were obtained using a HAAKE™ MiniCTW twin-screw extruder (Thermo Fisher Scientific, Germany). The quantitative content of diosmin in the solid dispersions was determined by HPLC. To assess the effect of the extrusion process on the sample characteristics, the functional properties of API and milled SDS were compared. In particular, the thermal and structural characteristics were studied using differential scanning calorimetry and FTIR spectroscopy, respectively.

Results and discussion. Kollidon® K17 is not effective in binary diosmin solid dispersions due to the increased viscosity of the melt, the risk of forming a heterogeneous system, and the potential degradation of the samples' functional properties relative to the pure micronized API. Taking into account the specifics of the extrusion process, as well as the results of the thermal, structural, and functional characteristics analysis of SDS, it was concluded that copolymer of polyvinylpyrrolidone with vinyl acetate is the most effective. This polymer matrix enables more uniform dispersion and fusion with diosmin, along with a tendency towards possible amorphization of the API, and thus – the possibility of solubility properties improvement.

Conclusion. The utilization of a copolymer of polyvinylpyrrolidone with vinyl acetate improves the unfavorable characteristics of micronized diosmin, which will eventually eliminate deviations during the manufacturing process of solid dosage forms by reducing the risks of dust formation and mechanical losses, as well as ensuring uniform dosing.

Keywords: diosmin, PVPVA 64, Kollidon® K17, solid dispersion systems, hot melt extrusion, functional properties, glass transition temperature

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 – search and systematization of data, planning of experimental work and implementation of diosmin solid dispersions by hot melt extrusion, evaluation of the functional properties of samples, interpretation of thermal characteristics. Evgeniy V. Vishnyakov – characterization of the experimental samples with FTIR-spectroscopy. Evgeniy V. Vishnyakov, Alexandra A. Danilova – interpretation of FTIR-spectroscopy data. Elizaveta S. Surbeeva – determination of diosmin quantitative content in experimental samples by high-performance liquid chromatography. Alexandra A. Danilova – data statistical analysis. Alexandra A. Danilova, Konstantin A. Gusev, Elena V. Flisyuk, Denis N. Maimistov – discussion of results, writing of a test article.

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., Vishnyakov E. V., Surbeeva E. S., Gusev K. A., Maimistov D. N., Flisyuk E. V. Polymer carrier selection for creation of diosmin solid dispersion system by hot melt extrusion. *Drug development & registration*. 2025;14(3):98–107. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2128>

ВВЕДЕНИЕ

С учетом роста числа случаев хронических заболеваний вен особое значение приобретают лекарственные препараты (ЛП), снижающие проницаемость сосудов и повышающие их тонус [1–3]. Согласно отечественным и зарубежным клиническим рекомендациям, одними из наиболее предпочтительных терапевтических средств являются препараты растительного происхождения, содержащие диосмин или комбинацию диосмина с гесперидином в соотношении 9:1 (микронизированные флавоноидные фракции)¹ [4–6]. К числу наиболее известных на российском фармацевтическом рынке ЛП относятся Детралекс®, Детравенол®, Флебодиа 600®, Флебофа® и пр.² По сравнению с синтетическими флебопротекторами (например, кальция добелизатом) востребованность лекарственных средств (ЛС) на основе диосмина обусловлена выраженным сродством к организму человека, меньшим каскадом побочных эффектов и возможностью применения у различных групп пациентов, например, при коморбидных состояниях, а также при беременности и грудном вскармливании без существенного риска развития осложнений [6–8].

¹ Клинические рекомендации «Варикозное расширение вен нижних конечностей» (2021). Доступно по: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/402776841/> Ссылка активна на 05.02.2025.

² Государственный реестр лекарственных средств РФ. Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>. Ссылка активна на 01.02.2025.

Вместе с тем существенным недостатком ЛС диосмина является крайне большая дозировка активного вещества в готовой лекарственной форме (от 500 до 1000 мг), что способствует увеличению массы и размера таблеток и снижает приверженность со стороны пациентов в связи с неудобством приема. Увеличение терапевтической дозировки обусловлено крайне низкой растворимостью активной фармацевтической субстанции (АФС) в воде (порядка $0,019 \pm 0,005$ мг/л)³. Для решения проблемы низкой растворимости и ограниченной биодоступности производители используют микронизацию с целью увеличения площади поверхности контакта частиц со средой желудочно-кишечного тракта, что, в свою очередь, позволяет увеличить абсорбцию в отделах тонкого и толстого кишечника. С другой стороны, внедрение рассматриваемого подхода в технологический процесс существенно усложняет его организацию в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики. В частности, микронизированный порошок АФС обладает выраженной склонностью к пылению наряду со значительным накоплением статического заряда на поверхности микронизированных частиц, что приводит к повышенному загрязнению используемого оборудования и производственных помещений. Таким образом, необходимо предложить и внедрить иные технологические решения, сочетающие в себе возможности по улучшению как

³ База данных PubChem. Доступно по: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diosmin>. Ссылка активна на 10.09.2024.

биофармацевтических, так и технологических свойств используемой субстанции в рамках соответствия требованиям фармацевтической системы качества.

Одной из перспективных стратегий улучшения физико-химических характеристик диосмина является технология создания твердых дисперсных систем (ТДС) методом экструзии горячего расплава (ЭГР) [9–11]. Последовательное смешение, диспергирование и сплавление АФС с полимерами-носителями (например, поливинилпирролидонами (ПВП) различной молекулярной массы) позволяет снизить степень кристалличности действующего вещества. В такой системе может образоваться аморфная фаза АФС с улучшенными свойствами растворимости в воде и биорелевантных средах, а также сохранением физико-химической стабильности [11, 12].

В контексте современных исследований интерес для сравнения представляет изучение свойств ТДС диосмина на основе гидрофильных полимерных матриц из группы ПВП с относительно небольшими температурами стеклования, а именно сополимера поливинилпирролидона с винилацетатом (ПВПВА) и поливинилпирролидона (ПВП) K17, которые активно используются в качестве носителей для разработки твердых дисперсий [11, 13].

С учетом вышеизложенного **целью данного исследования** стал выбор и обоснование использования полимерного носителя из группы ПВП для создания ТДС диосмина методом ЭГР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована субстанция диосмина (Chengdu Runde Pharmaceutical Co., Ltd., Китай). В качестве кандидатов для разработки твердых дисперсий выбраны два родственных гидрофильных полимера: сополимер поливинилпирролидона с винилацетатом в соотношении 60:40 (ПВПВА) марки VIVAPHARM® PVP/VA 64 (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия) и поливинилпирролидон K17 марки Kollidon® K17 PF (BASF, США).

Предварительную оценку термических свойств АФС и полимеров-носителей проводили с помощью синхронного термического анализа на установке Thermal Analysis System TGA/DSC 3+ (METTLER TOLEDO, Швейцария) в соответствии с методикой, описанной в [14].

Согласно данным ранее проведенных нами исследований по созданию ТДС флавоноидов методом ЭГР установлено, что соотношение действующего вещества и полимера-носителя 1:99 является эффективным для повышения растворимости и высвобождения АФС за счет возможной аморфизации [12]. По этой причине для получения модельных образцов ТДС диосмина на основе выбранных полимеров в соотношении 1:99 предварительно готовили физические смеси путем смешения компонентов в ступке. ЭГР смесей проводили с использованием двухшнекового лабораторного экструдера НААКЕ™ MiniCTW с

сонаправленными коническими шнеками (Thermo Fisher Scientific, Германия). Процесс вели в пределах 170–180 °С в зависимости от выбранного носителя и скорости вращения шнеков – 30 об/мин. В качестве формирующего элемента использовали матрицу круглого сечения диаметром 2,5 мм.

Количественное определение АФС осуществляли методом ВЭЖХ с использованием прибора LicArt 62 (ООО «Лабконцепт», Россия), оснащенного диодно-матричным детектором с учетом требований Государственной фармакопеи РФ (ГФ РФ) XV издания, ОФС.1.2.1.2.0005¹. Условия хроматографирования: колонка Phenomenex Luna C18(2), 150 мм × 4,6 мм × 5 мкм, с предколонкой Phenomenex C18, 3 × 4 мм, температура – 40 °С; подвижная фаза (ПФ) А – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты, ПФ Б – метанол, режим элюирования: 0–25 мин – 70–40 % ПФ А, 25–26 мин – 40–70 % ПФ А, 26–30 мин – 40 % ПФ А, объем вводимой пробы – 10 мкл [15].

Гранулометрический состав исходной АФС оценивали в соответствии с распределением частиц по размерам с помощью лазерного анализатора «Микросайзер-201С» (ООО «ВА Инсталт», Россия). Пробоподготовку образцов осуществляли посредством суспендирования навески АФС в глицерине. Измерения проводили в трехкратной повторности.

Перед изучением технологических свойств полученных экструдатов проводили их измельчение с помощью конической мельницы-калибратора ZLJ-125 (Shanghai Unique Machinery Technology Co., Ltd., Китай) при скорости вращения роторного ножа 600 об/мин с последующей калибровкой через сито с диаметром ячеек 1,00 мм. В качестве целевой фракции использовали грануляты размером менее 710 мкм.

Для оценки технологических свойств диосмина и измельченных ТДС использовали показатели сыпучести и насыпной плотности в соответствии с методиками ГФ РФ XV издания (ОФС.1.4.2.0016 «Сыпучесть порошков», ОФС.1.4.2.0024 «Насыпная плотность и плотность после уплотнения»)^{2,3}. Изучение сыпучести образцов осуществляли в трехкратной повторности с помощью тестера сыпучести порошков ERWEKA GTD-63150 (ERWEKA GmbH, Германия), насыпной плотности – тестера насыпной плотности ERWEKA SVM 21 (ERWEKA GmbH, Германия). Для интерпре-

¹ ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-1-2-1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/vysokoeffektivnaya-zhidkostnaya-khromatografiya>. Ссылка активна на 01.02.2025.

² ОФС.1.4.2.0016 «Сыпучесть порошков». Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-2/sypuchest-poroshkov/?sphrase_id=1080661. Ссылка активна на 01.02.2025.

³ ОФС.1.4.2.0024 «Насыпная плотность и плотность после уплотнения». Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-2/nasypnaya-plotnost-i-plotnost-posle-uplotneniya/?sphrase_id=1085399. Ссылка активна на 01.02.2025.

тации данных проводили расчет косвенных показателей: индекса Карра (коэффициент прессуемости) и числа Хауснера, позволяющих оценить функциональные характеристики образцов в качественном отношении.

ИК-Фурье-спектры исследуемых ТДС снимали при длинах волн от 400 до 4000 см⁻¹ на спектрометре Spectrum 3 (PerkinElmer, США) с использованием приставки нарушенного полного внутреннего отражения. Визуализацию, а также расчеты корреляции спектров осуществляли с использованием пакета программного обеспечения Spectrum 3, версия 10.7.2.

Термические свойства полученных ТДС изучали с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на установке термического анализа Thermal Analysis System DSC 3+ (METTLER TOLEDO, Швейцария). Точная навеска образца помещалась в перфорированный алюминиевый тигель (объем 40 мкл), после чего производились последовательные нагрев, охлаждение, повторный нагрев образца в диапазоне от 0 до 200 °С. Тепловые эффекты оценивали по результатам повторного нагрева. Изменение температуры осуществлялось со скоростью 10 К/мин в среде азота (расход – 50 мл/мин). Обработка данных осуществлялась с помощью специализированного программного обеспечения Mettler STARe, версия V16.20с.

Для статистической интерпретации полученных данных использовали программное обеспечение R-Studio (R Foundation for Statistical Computing, Австрия). Все расчеты проводили согласно требованиям ОФС.1.1.0013 ГФ РФ¹.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки технологии экструзии предварительно изучение термических характеристик диосмина и выбранных полимеров-носителей (ПВПВА 64, ПВП К17). АФС характеризовалась выраженным эндотермическим пиком плавления при температуре 285,86 °С. На основании чего определен допустимый предел температурного нагрева образца при ЭГР – до 285 °С – с целью нивелирования рисков термического разложения.

При исследовании термических свойств ПВПВА 64 установлено, что для рассматриваемого полимера характерна относительно невысокая температура стеклования, около 105 °С, за счет присутствия винилацетатного компонента [12, 16]. Процесс ЭГР на основе рассматриваемой полимерной матрицы ведут, как правило, в диапазоне температур до 180 °С, чтобы обеспечить сохранность структурно-механических

свойств носителя [13, 16, 17]. В то же время при изучении свойств родственного полимера ПВП К17 при повторном нагреве обнаружено наличие двух эффектов стеклования при температурах 91,7 и 136,35 °С соответственно. Согласно литературным данным, основной вклад в стеклование вносит вторая температурная точка – 136,35 °С [13]. Исходя из этого, минимальная температура экструзии ТДС на основе ПВП К17 составит порядка 165–170 °С [13, 17], что также удовлетворяет требованиям допустимого температурного нагрева АФС диосмина. С другой стороны, наличие дополнительного эффекта стеклования при 91,7 °С может оказывать негативное влияние на смешиваемость компонентов в ТДС и провоцировать температурные девиации в процессе ЭГР.

Следующим этапом исследования стал экспериментальный скрининг параметров экструзии для модельных систем на основе ПВПВА 64 и ПВП К17 (таблица 1).

Таблица 1. Параметры ЭГР для твердых дисперсий диосмина

Table 1. HME parameters for diosmin solid dispersions

Образец Sample	$T_{ЭГР}$, °С T_{HME} , °С	n , об/мин n , rpm	$M_{кр}$, Н·м T , N·m	Выход, % ($n = 3$) Yield, % ($n = 3$)	Количественное содержание АФС, % ($n = 3$) API content, % ($n = 3$)
ТДС ПВПВА SDS PVPVA	170	30	0,22	95	90,0 ± 0,5
ТДС К17 SDS K17	180	30	0,27	83	90,0 ± 0,9

Примечание. $T_{ЭГР}$ – температура экструзии; n – скорость вращения шнеков; $M_{кр}$ – крутящий момент.

Note. T_{HME} – temperature of hot melt extrusion; n – speed rate; T – torque.

Пределы изменения переменных факторов процесса (температуры и скорости вращения шнеков) для ТДС диосмина на основе рассматриваемых полимерных матриц являлись схожими. Помимо прочего, количественное содержание АФС в рассматриваемых системах, независимо от выбранного полимера-носителя, являлось сопоставимым. Однако качество получаемых экструдатов значительно изменялось в зависимости от типа используемого носителя. ТДС на основе ПВПВА имели большую прочность и плотность, в то время как образцы с ПВП К17 характеризовались хрупкостью. Механические нагрузки при сплавлении диосмина с ПВПВА были ниже (крутящий момент в пределах 0,22 Н·м) относительно рассматриваемых значений для составов на основе ПВП К17. При получении образцов с ПВП К17 возникла необходимость увеличения температуры до

¹ ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний». Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-fizicheskikh-fiziko-khimicheskikh-i-khimicheskikh-ispityaniy/?sphrase_id=1085405. Ссылка активна на 01.02.2025.

180 °С вследствие большей вязкости расплава по сравнению с ПВПВА 64 [17].

Дальнейшим этапом работы стало изучение технологических свойств образцов (рисунок 1). Исходная субстанция диосмина представляет собой микронизированный, плохо сыпучий порошок с преобладанием мелкодисперсных фракций частиц размером от 1,1 до 6,3 мкм, что существенно ухудшает свойства текучести, сжимаемости и прессуемости. АФС склонна к образованию крупных агломератов диаметром от 0,5 до 2,5 см. Данное явление косвенно подтверждалось существенным расхождением величины насыпной плотности до и после уплотнения (в среднем – 0,21 г/см³).

По сравнению с чистым веществом образцы ТДС на основе ПВПВА характеризовались значительным увеличением сжимаемости и прессуемости (p -value < 0,05), что может объясняться влиянием морфологии частиц полимера-носителя. Расхождения по насыпной плотности до и после уплотнения исследуемого образца составили не более 0,01 г/см³, сыпучесть характеризовалась как «отличная». Данное явление объясняется вкладом процесса ЭГР, который позволяет укрупнить частицы АФС и снизить выраженность степени их кристалличности за счет сплавления с полимером-носителем, с сохранением или улучшением скорости растворения действующего вещества [18].

При использовании ПВП К17 характеристики сыпучести, прессуемости и сжимаемости измель-

ченных экструдатов оказались хуже относительно свойств чистой АФС. Расхождения по насыпной плотности до и после уплотнения составили порядка 0,27–0,33 г/см³, то есть происходила агрегация измельченных частиц вследствие повышенной статистики. В соответствии с ГФ РФ сыпучесть классифицировалась как «плохая».

В качестве дополнительного элемента контроля качества полученных ТДС проведены исследования термических свойств образцов методом ДСК (рисунок 2). Для оценки взаимодействия компонентов учитывалось изменение величины температуры стеклования твердых дисперсий относительно чистых полимеров-носителей [19].

Наличие нескольких эффектов стеклования у твердых дисперсий диосмина на основе ПВП К17, а также завышенные значения первой температуры стеклования экспериментального образца по сравнению с чистым полимером (113,25 °С относительно 91,14 °С) свидетельствуют лишь об ограниченной растворимости (связываемости) АФС с носителем [20]. При исследовании термических свойств ТДС диосмина на основе ПВПВА 64 обнаружен один эффект стеклования. Кроме того, температура стеклования исследуемого образца оказалась сопоставима с соответствующим значением у полимера-носителя, что позволяет выдвинуть предположение о наличии аморфной фазы диосмина в ТДС.

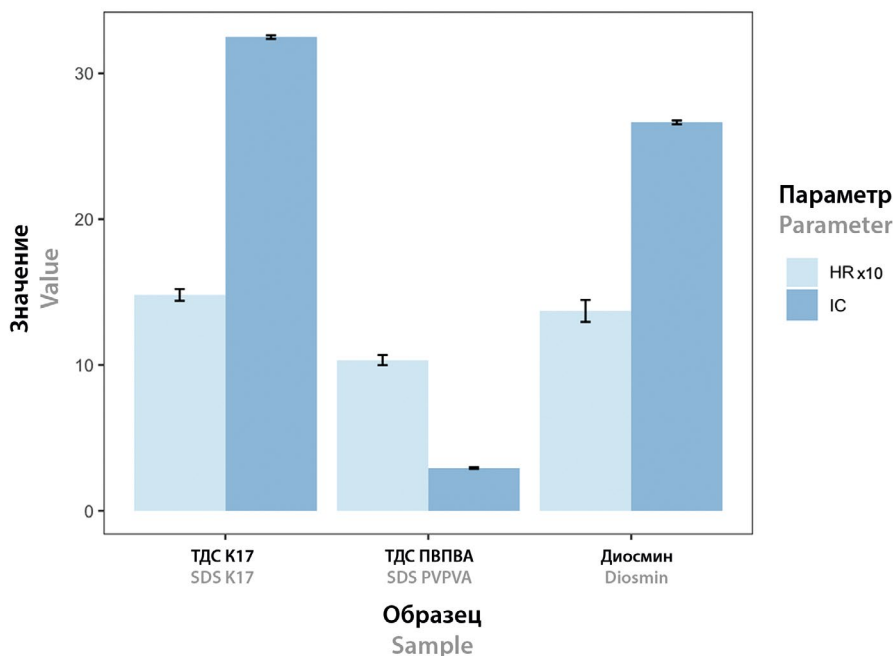


Рисунок 1. Результаты оценки технологических свойств чистой АФС, твердых дисперсий на основе ПВПВА 64 и ПВП К17 ($n = 3$; $P = 95\%$).

HR – число Хауснера; IC – индекс Карра

Figure 1. Results of functional properties evaluation for pure API, solid dispersions based on PVPVA 64 and PVP K17 ($n = 3$; $P = 95\%$).

HR – Hausner ratio; IC – Carr's index

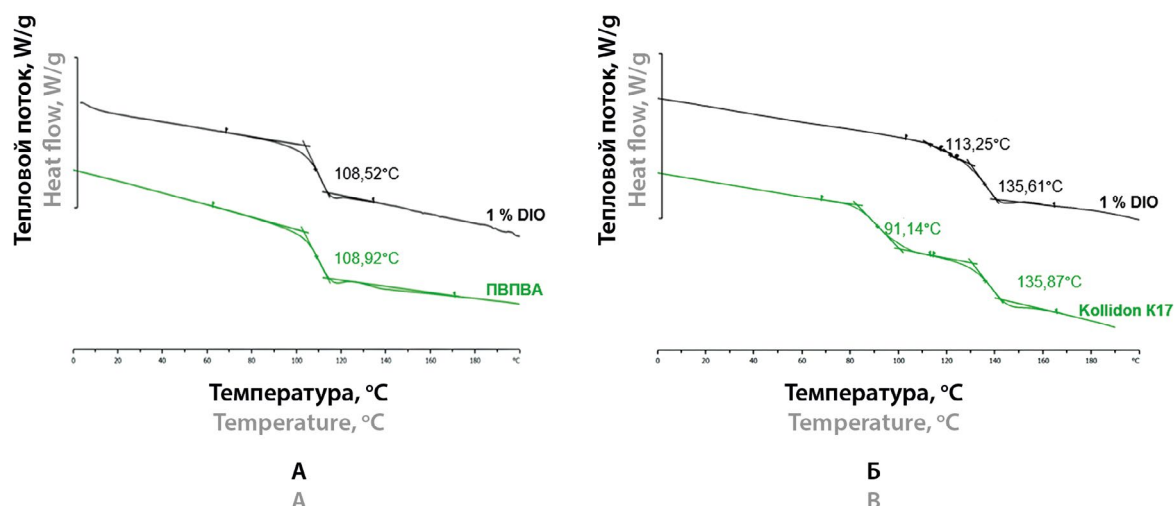


Рисунок 2. Результаты ДСК для составов ТДС диосмина:

А – на основе ПВП К17; Б – на основе ПВПВА 64

Figure 2. DSC-curves of diosmin SDS compositions:

А – based on PVP K17; Б – based on PVPVA 64

Анализ структурных характеристик ТДС диосмина методом ИК-Фурье-спектроскопии позволил выявить отсутствие новых характеристических пиков поглощения в спектрах, то есть изменений в молекулярной структуре АФС не происходило (рисунки 3, 4).

Для исследуемых составов независимо от выбранного полимера-носителя зафиксировано сглаживание и изменение полос пропускания гидроксигрупп в диапазоне 3500–3200 cm^{-1} . Девиация характеристических полос валентных колебаний фенольных гидроксидов при 1230–1140 cm^{-1} подтверждалась образованием водородных связей с полярными группами полимеров-носителей. Необходимо отметить, что в отличие от спектров ТДС на основе ПВП К17 в спектре составов с ПВПВА наблюдалась девиация в диапазоне 1000–1100 cm^{-1} , связанная с вовлечением эфирной группы

винилацетатного фрагмента в возможное образование комплекса с АФС за счет водородных связей. По этой причине рассчитанные значения корреляции спектров ТДС на основе ПВПВА со спектром полимера-носителя (корреляция – 0,9845) оказались больше аналогичной величины для состава с ПВП К17 (корреляция – 0,9821).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов проведенных исследований можно сделать вывод о нерациональности использования ПВП К17 для разработки бинарных ТДС диосмина методом ЭГР. Наличие нескольких эффектов стеклования, в том числе относительно высокая температура стеклования, которая определяет пара-

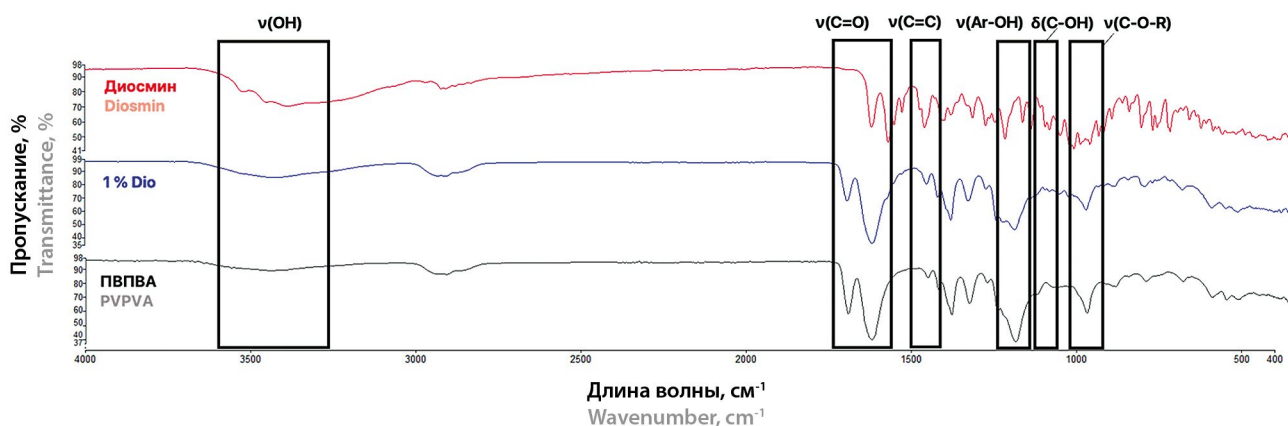


Рисунок 3. ИК-спектры диосмина, твердой дисперсии на его основе и ПВПВА 64

Figure 3. FTIR-spectrum of diosmin, its solid dispersion PVPVA 64

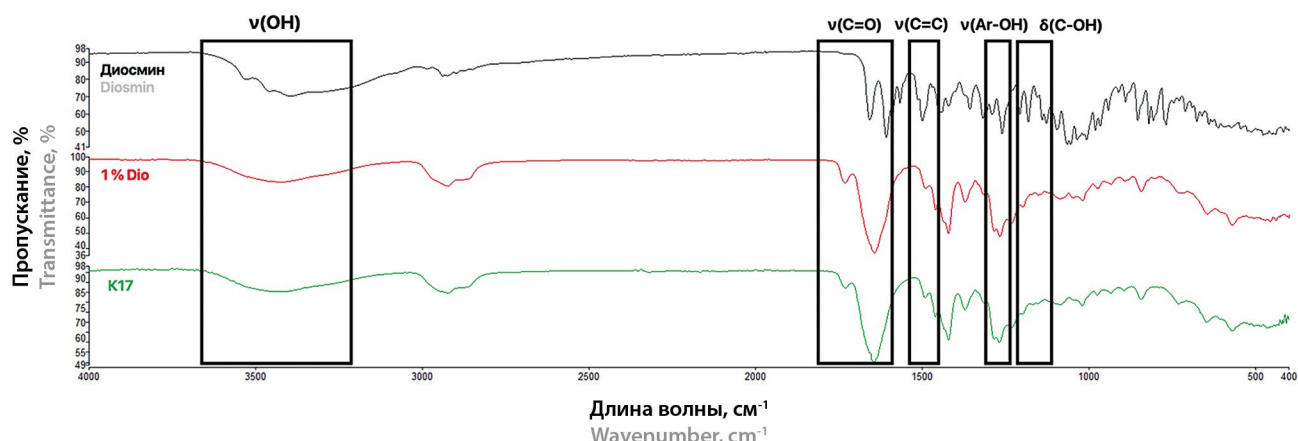


Рисунок 4. ИК-спектры диосмина, твердой дисперсии на его основе и ПВП К17

Figure 4. FTIR-spectrum of diosmin, its solid dispersion PVP K17

метры экструзионной обработки, повышенная вязкость расплава полимера-носителя не позволяют получать однородные твердые дисперсии, что приводит к снижению качества экструдатов. Для решения выявленной проблемы рационально вводить в состав композиции пластифицирующие агенты (например, полиэтиленгликоли), которые позволяют снижать величину температуры стеклования обрабатываемой смеси и способствуют более равномерному диспергированию и связыванию АФС [21].

Наиболее предпочтительной для разработки ТДС диосмина является полимерная матрица в виде ПВПВА 64, которая позволяет добиться более однородного диспергирования и сплавления АФС с носителем наряду с тенденцией к возможной аморфизации действующего вещества. Матрица в виде ПВПВА 64 имеет большее число потенциальных сайтов, участвующих в комплексообразовании, за счет чего обеспечивает лучшее связывание с диосмином. С точки зрения технологических свойств использование ПВПВА 64 является обоснованным для разработки ТДС диосмина методом ЭГР, поскольку способствует нивелированию неудовлетворительных функциональных характеристик микронизированной АФС посредством укрупнения размеров частиц. Создание твердой дисперсии диосмина на основе ПВПВА в перспективе позволит снизить риски возникновения отклонений в ходе процесса производства твердых ЛФ (например, уменьшить пылеобразование и механические потери на операциях смешения, грануляции, калибровки гранулята), обеспечить необходимую однородность дозирования.

ЛИТЕРАТУРА

- Baylis R. A., Smith N. L., Klarin D., Fukaya E. Epidemiology and genetics of venous thromboembolism and chronic venous disease. *Circulation research*. 2021;128(12):1988–2002. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318322.
- Benn S., Moore Z., Patton D., O'Connor T., Nugent L., Harkin D., Avsar P. What is the prevalence of chronic venous disease among health care workers? A scoping review. *International Wound Journal*. 2023;20(9):3821–3839. DOI: 10.1111/iwj.14222.
- Ortega M. A., Fraile-Martínez O., García-Montero C., Álvarez-Mon M. A., Chaowen C., Ruiz-Grande F., Pekarek L., Monserrat J., Asúnsolo A., García-Honduvilla N., Álvarez-Mon M., Bujan J. Understanding chronic venous disease: a critical overview of its pathophysiology and medical management. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(15):3239. DOI: 10.3390/jcm10153239.
- De Maessener M. G., Kakkos S. K., Aherne T., Baekgaard N., Black S., Blomgren L., Giannoukas A., Gohel M., de Graaf R., Hamel-Desnos C., Jawien A., Jaworucka-Kaczorowska A., Lattimer C. R., Mosti G., Noppeney T., van Rijn M. J., Stansby G., Kolh P., Bastos Goncalves F., Chakfé N., Coscas R., de Borst G. J., Dias N. V., Hinchliffe R. J., Koncar I. B., Lindholt J. S., Trimarchi S., Tulamo R., Twine C. P., Vermassen F., Wanhainen A., Björck M., Labropoulos N., Lurie F., Mansilha A., Nyamekye I. K., Ramirez Ortega M., Ulloa J. H., Urbanek T., van Rij A. M., Vuylsteke M. E. Editor's Choice – European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2022 Clinical Practice Guidelines on the management of chronic venous disease of the lower limbs. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2022;63(2):184–267. DOI: 10.1016/j.ejvs.2021.12.024.
- Головина В. И., Золотухин И. А. Применение диосмин-содержащих препаратов в лечении хронических заболеваний вен. *Лечебное дело*. 2023;2:67–73. DOI: 10.24412/2071-5315-2023-12881.
- Gerges S. H., Wahdan S. A., Elsherbiny D. A., El-Demerdash E. Pharmacology of Diosmin, a Citrus Flavone Glycoside: An Updated Review. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2022;47:1–18. DOI: 10.1007/s13318-021-00731-y.
- Богачев В. Ю., Болдин Б. В., Комов К. В., Дженина О. В. Фиксированные комбинации в фармакотерапии хронических заболеваний вен. *Амбулаторная хирургия*. 2024;21(2):44–51. DOI: 10.21518/akh2024-042.

8. Lurie F., Branisteanu D.E. Improving Chronic Venous Disease Management with Micronised Purified Flavonoid Fraction: New Evidence from Clinical Trials to Real Life. *Clinical Drug Investigation*. 2023;43(1):9–13. DOI: 10.1007/s40261-023-01261-y.
9. 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.
10. 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.
11. Wdowiak K., Pietrzak R., Tykarska E., Cielecka-Piontek J. Hot-Melt Extrusion as an Effective Technique for Obtaining an Amorphous System of Curcumin and Piperine with Improved Properties Essential for Their Better Biological Activities. *Molecules*. 2023;28(9):3848. DOI: 10.3390/molecules28093848.
12. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1935.
13. LaFountaine J. S., Prasad L. K., Brough C., Miller D. A., McGinity J. W., Williams R. O. Thermal Processing of PVP- and HPMC-Based Amorphous Solid Dispersions. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17:120–132. DOI: 10.1208/s12249-015-0417-7.
14. 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.
15. Hemalatha G., Sreedevi A., Sruthi K. S., Swetha P. Development and optimization of a simple, robust RP-HPLC technique for analysis of diosmin and hesperidin using quality by design. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2024;14(3):95–101. DOI: 10.7324/JAPS.2024.162037.
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. Bühler V. Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals: Povidone, Crospovidone and Copovidone. Berlin: Springer; 2005. 254 c.
18. 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.
19. Kapourani A., Vardaka E., Katopodis K., Kachrimanis K., Barmapalexis 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.
20. Kanaze F. I., Kokkalou E., Niopas I., Georgarakis M., Stergiou A., Bikiaris D. Thermal analysis study of flavonoid solid dispersions having enhanced solubility. *Journal of thermal analysis and calorimetry*. 2006;83(2):283–290. DOI: 10.1007/s10973-005-6989-9.
21. Hess F., Kipping T., Weitschies W., Krause J. Understanding the Interaction of Thermal, Rheological, and Mechanical Parameters Critical for the Processability of Polyvinyl Alcohol-Based Systems during Hot Melt Extrusion. *Pharmaceutics*. 2024;16:472. DOI: 10.3390/pharmaceutics16040472.

REFERENCES

1. Baylis R. A., Smith N. L., Klarin D., Fukaya E. Epidemiology and genetics of venous thromboembolism and chronic venous disease. *Circulation research*. 2021;128(12):1988–2002. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318322.
2. Benn S., Moore Z., Patton D., O'Connor T., Nugent L., Harkin D., Avsar P. What is the prevalence of chronic venous disease among health care workers? A scoping review. *International Wound Journal*. 2023;20(9):3821–3839. DOI: 10.1111/iwj.14222.
3. Ortega M. A., Fraile-Martínez O., García-Montero C., Álvarez-Mon M. A., Chaowen C., Ruiz-Grande F., Pekarek L., Monserrat J., Asúnsolo A., García-Hondurilla N., Álvarez-Mon M., Bujan J. Understanding chronic venous disease: a critical overview of its pathophysiology and medical management. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(15):3239. DOI: 10.3390/jcm10153239.
4. De Maessener M. G., Kakkos S. K., Aherne T., Baekgaard N., Black S., Blomgren L., Giannoukas A., Gohel M., de Graaf R., Hamel-Desnos C., Jawien A., Jaworucka-Kaczorowska A., Lattimer C. R., Mosti G., Noppeney T., van Rijn M. J., Stansby G., Kolh P., Bastos Goncalves F., Chakfé N., Coscas R., de Borst G. J., Dias N. V., Hinchliffe R. J., Koncar I. B., Lindholt J. S., Trimarchi S., Tulamo R., Twine C. P., Vermassen F., Wanhainen A., Björck M., Labropoulos N., Lurie F., Mansilha A., Nyamekye I. K., Ramirez Ortega M., Ulloa J. H., Urbanek T., van Rij A. M., Vuylsteke M. E. Editor's Choice – European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2022 Clinical Practice Guidelines on the management of chronic venous disease of the lower limbs. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2022;63(2):184–267. DOI: 10.1016/j.ejvs.2021.12.024.
5. Golovina V. I., Zolotukhin I. A. The Use of Diosmin Drugs in the Treatment of Chronic Venous Insufficiency. *Medical practice*. 2023;2:67–73. (In Russ.) DOI: 10.24412/2071-5315-2023-12881.
6. Gerges S. H., Wahdan S. A., Elsherbiny D. A., El-Demerdash E. Pharmacology of Diosmin, a Citrus Flavone Glycoside: An Updated Review. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2022;47:1–18. DOI: 10.1007/s13318-021-00731-y.
7. Bogachev V. Y., Boldin B. V., Komov K. V., Dzhennina O. V. Fixed-dose combinations in pharmacotherapy of chronic venous diseases. *Ambulatory Surgery*. 2024;21(2):44–51. (In Russ.) DOI:10.21518/akh2024-042.
8. Lurie F., Branisteanu D.E. Improving Chronic Venous Disease Management with Micronised Purified Flavonoid Fraction: New Evidence from Clinical Trials to Real Life. *Clinical Drug Investigation*. 2023;43(1):9–13. DOI: 10.1007/s40261-023-01261-y.

9. 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. *Chemical and Pharmaceutical Journal*. 2024;58(2):26–35. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2024-58-2-26-35.
10. 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.
11. Wdowiak K., Pietrzak R., Tykarska E., Cielecka-Piontek J. Hot-Melt Extrusion as an Effective Technique for Obtaining an Amorphous System of Curcumin and Piperine with Improved Properties Essential for Their Better Biological Activities. *Molecules*. 2023;28(9):3848. DOI: 10.3390/molecules28093848.
12. 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 extrusion. *Drug development & registration*. 2025;14(1):127–137. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1935.
13. LaFountaine J. S., Prasad L. K., Brough C., Miller D. A., McGinley J. W., Williams R. O. Thermal Processing of PVP- and HPMC-Based Amorphous Solid Dispersions. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17:120–132. DOI: 10.1208/s12249-015-0417-7.
14. 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.
15. Hemalatha G., Sreedevi A., Sruthi K. S., Swetha P. Development and optimization of a simple, robust RP-HPLC technique for analysis of diosmin and hesperidin using quality by design. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2024;14(3):95–101. DOI: 10.7324/JAPS.2024.162037.
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. Bühler V. Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals: Povidone, Crospovidone and Copovidone. Berlin: Springer; 2005. 254 c.
18. 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.
19. Kapourani A., Vardaka E., Katopodis K., Kachrimanis K., Barmapalexis 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.
20. Kanaze F. I., Kokkalou E., Niopas I., Georgarakis M., Stergiou A., Bikiaris D. Thermal analysis study of flavonoid solid dispersions having enhanced solubility. *Journal of thermal analysis and calorimetry*. 2006;83(2):283–290. DOI: 10.1007/s10973-005-6989-9.
21. Hess F., Kipping T., Weitschies W., Krause J. Understanding the Interaction of Thermal, Rheological, and Mechanical Parameters Critical for the Processability of Polyvinyl Alcohol-Based Systems during Hot Melt Extrusion. *Pharmaceutics*. 2024;16:472. DOI: 10.3390/pharmaceutics16040472.



Подходы к контролю качества носителей лекарственных средств (обзор)

У. А. Ефремова✉, П. А. Чугунова, Е. С. Поникаровская, И. И. Тернинко

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

✉ Контактное лицо: Ефремова Ульяна Андреевна. E-mail: ulyana.efremova@spcpu.ru

ORCID: У. А. Ефремова – <https://orcid.org/0000-0001-5144-3061>;

П. А. Чугунова – <https://orcid.org/0009-0008-2169-7800>;

Е. С. Поникаровская – <https://orcid.org/0009-0005-5126-0034>;

И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Статья поступила: 08.04.2025

Статья принята в печать: 07.06.2025

Статья опубликована: 11.07.2025

Резюме

Введение. Развитие нанотехнологий привело к созданию сложных систем доставки лекарственных средств: липосом, дендримеров, неорганических наночастиц, клеточных систем и полимерных наночастиц. Все эти системы требуют комплексного подхода к контролю качества. В данном обзоре рассматриваются ключевые атрибуты контроля качества, среди которых физико-химические и химические методы анализа, а также актуальные регуляторные требования.

Текст. Системы доставки лекарственных средств представляют собой перспективные технологии, направленные на повышение безопасности и эффективности фармакотерапии. Многообразие компонентов и сложность структуры создают ряд трудностей при разработке подходов к контролю качества новых носителей. Существующие физические и физико-химические методы анализа активно используются для определения морфологических характеристик носителей, физических характеристик их мембраны, подтверждения структуры субстратов и конечной частицы. Однако отсутствие ряда стандартизованных подходов, в частности для определения дзета-потенциала мембраны частиц, остается серьезным вызовом для ряда исследователей и регуляторных органов.

Заключение. В данном обзоре представлена системная характеристика подходов к контролю качества систем доставки и их компонентов, которые существуют в настоящее время. Многообразие методов анализа носителей позволяет наиболее полно оценить качество носителей, однако в дальнейшем необходима гармонизация существующих международных норм с российскими стандартами, что минимизирует риски, связанные с использованием носителей в направленной доставке лекарственных средств.

Ключевые слова: носители лекарственных средств, липосомы, мицеллы, стандартизация, контроль качества

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

Вклад авторов. У. А. Ефремова проводила сбор и систематизацию материала, осуществляла работу с табличными материалами, отвечала за подготовку рукописи. П. А. Чугунова и Е. С. Поникаровская осуществляли сбор данных из литературных источников. И. И. Тернинко отвечала за редактирование текста статьи, научное консультирование и формулирование концептуальной идеи публикации.

Для цитирования: Ефремова У. А., Чугунова П. А., Поникаровская Е. С., Тернинко И. И. Подходы к контролю качества носителей лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):108–122. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2075>

Approaches to quality control of drug carriers (review)

Ulyana A. Efremova✉, Polina A. Chugunova, Elizaveta S. Ponikarovskaya, Inna I. Terninko

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

✉ Corresponding author: Ulyana A. Efremova. E-mail: ulyana.efremova@spcpu.ru

© Ефремова У. А., Чугунова П. А., Поникаровская Е. С., Тернинко И. И., 2025

© Efremova U. A., Chugunova P. A., Ponikarovskaya E. S., Terninko I. I., 2025

ORCID: Ulyana A. Efremova – <https://orcid.org/0000-0001-5144-3061>;
Polina A. Chugunova – <https://orcid.org/0009-0008-2169-7800>;
Elizaveta S. Ponikarovskaya – <https://orcid.org/0009-0005-5126-0034>;
Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Received: 08.04.2025

Accepted: 07.06.2025

Published: 11.07.2025

Abstract

Introduction. The development of nanotechnology has led to the creation of complex drug delivery systems: liposomes, dendrimers, inorganic nanoparticles, cellular systems, and polymer nanoparticles. All these systems require an integrated approach to quality control. This review examines the key attributes of quality control, including physico-chemical and chemical analysis methods, as well as current regulatory requirements.

Text. Drug delivery systems represent promising technologies aimed at improving the safety and effectiveness of pharmacotherapy. The variety of components and complexity of the structure create a number of difficulties in developing approaches to quality control of new media. Existing physical and physico-chemical analysis methods are actively used to determine the morphological characteristics of carriers, the physical characteristics of their membrane, and to confirm the structure of substrates and the final particle. However, the lack of a number of standardized approaches, in particular, for determining the zeta potential of a particle membrane, remains a serious challenge for a number of researchers and regulatory authorities.

Conclusion. This review provides a systematic description of the approaches to quality control of delivery systems and their components that currently exist. The variety of media analysis methods makes it possible to fully assess the quality of media, but in the future it is necessary to harmonize existing international standards with Russian standards, which minimizes the risks associated with the use of media in the targeted delivery of medicines.

Keywords: drug delivery systems, nanocarriers, structure of nanocarriers, standardization, quality control

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. Ulyana A. Efremova collected and systematized the material, worked with tabular materials, was responsible for writing. Polina A. Chugunova and Elizaveta S. Ponikarovskaya collected data from literary sources. Inna I. Terninko was responsible for editing the text of the article, scientific advice and the concept of the review.

For citation: Efremova U. A., Chugunova P. A., Ponikarovskaya E. S., Terninko I. I. Approaches to quality control of drug carriers. *Drug development & registration*. 2025;14(3):108–122. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2075>

ВВЕДЕНИЕ

Поиск инновационных подходов к направленной доставке лекарственных средств является одним из самых динамично развивающихся направлений современной фармации ввиду запроса медицинского сообщества на таргетную терапию. Системы доставки (СД) позволяют повысить эффективность терапии, снизить побочные эффекты и обеспечить целенаправленное воздействие на патологические очаги на уровне клеточных систем [1, 2]. Наночастицы на основе липидных и полимерных носителей, гибридные системы и другие передовые подходы открывают новые возможности для контролируемого высвобождения активных веществ, улучшения их биодоступности и преодоления биологических барьеров, позволяя повысить эффективность терапии, снизить побочные эффекты и токсическое действие некоторых препаратов на организм человека в целом. Однако разработка таких систем требует строгого контроля качества

на всех этапах – от синтеза и характеристики до доклинических и клинических испытаний [3].

Целью данного обзора является сбор и систематизация данных об основных подходах к контролю качества СД лекарственных средств, включая стандартизированные методы анализа, нормативные требования и инновационные технологии, которые позволяют обеспечить соответствие разрабатываемых препаратов международным стандартам и, как следствие, эффективность и безопасность. Актуальность темы обусловлена необходимостью внедрения надежных и стандартизированных протоколов контроля качества для успешного перехода от лабораторных исследований к промышленному производству и клиническому применению. В ходе данного обзора были проанализированы научные публикации в библиотечных базах данных Web of Science, Scopus, PubMed, GoogleScholar и Elibrary (глубина поиска составила 15 лет).

КЛАССИФИКАЦИЯ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ИХ КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

С момента разработки первой формулы лекарственного препарата с контролируемым высвобождением в 1950-х годах до настоящего времени внимание исследовательских групп приковано к созданию новых, усовершенствованных носителей (рисунк 1), которые по сравнению с традиционными лекарственными средствами (ЛС) имеют ряд преимуществ: не подвержены влиянию физиологических условий организма, имеют лучшую растворимость, обеспечивают пространственный контроль над высвобождением препарата, повышают эффективность и снижают токсическое действие активных фармацевтических субстанций (АФС) [4, 5].

Органические носители

Органические носители – перспективные системы для таргетной доставки ЛС, синтезируемые преимущественно из природных или синтетических биоразлагаемых и биосовместимых молекул. Выбор данных субстратов обусловлен их минимальной иммуногенностью и способностью к контролируемой деградации *in vivo* без образования токсичных метаболитов. Использование этих носителей способствует улучшению фармакокинетики и фармакодинамики лекарственного препарата за счет повышения биодоступности гидрофобных ЛС путем их солюбили-

зации в гидрофильной фазе и снижения системной токсичности посредством локализованного высвобождения АФС [6–8]. С целью повышения эффективности структура носителей может быть функционализирована. Так, ковалентное присоединение лигандов (RGD-пептиды, фолиевая кислота, углеводы) к поверхности частиц способствует селективному накоплению в тканях-мишенях за счет взаимодействия с рецепторами клеток [9, 10], а нанесение полиэтиленгликоля как полимерного покрытия обеспечивает стерический барьер для носителя, предотвращая его взаимодействие с белками плазмы, включая опсонины [11]. К наиболее изученным органическим носителям относят липосомы, мицеллы, дендримеры и нанокапсулы на основе растительных полимеров. Каждый из этих типов носителей обладает рядом уникальных физико-химических характеристик, что способствует реализации возможности их адаптации под конкретные терапевтические задачи [12]. Кроме того, такое широкое разнообразие носителей лекарственных средств обусловлено многоплановостью задач и индивидуальными требованиями к препаратам. Так, для гидрофобных препаратов предпочтительными будут носители, имеющие в структуре липидное ядро, а гидрофильные или пептидные молекулы показывают наилучшую инкапсуляцию в дендримеры и полимерные наночастицы на основе сополимера полимолочной и гликолевой кислот. Путь введения препарата также играет важную роль в выборе подходящего носителя: в случае перорального применения лекарственного препарата частицы должны быть



Рисунок 1. Классификация носителей лекарственных средств

Figure 1. Classification of drug carriers

устойчивы к кислой среде желудка (частицы на основе хитозана), при внутривенном введении ЛС с целью нивелирования опсонизации стоит использовать ПЭГилированные системы и т. д.

Липосомы

Липосомы представляют собой наноразмерные сферические структуры и являются одними из самых распространенных частиц, используемых в медицине. На сегодняшний день около 20 липосомальных препаратов одобрены агентствами FDA и EMA для клинического применения [13]. Среди них ряд жизненно важных препаратов, применяемых при лечении онкологических заболеваний, грибковых инфекций и генной терапии: Doxil® (Alza Corporation, США), DaunoXome® (Galen, СК), Onivyde® (Merrimack Pharmaceuticals, МА, США), Ambisome® (NeXstar Pharmaceuticals, США), Visudyne® (QLT Phototherapeutics Inc., Канада), Spikevax® (Moderna, Inc., США), Comirnaty® (Pfizer-BioNTech, США).

Липосомы образованы из двойного слоя фосфолипидов, который может инкапсулировать как гидрофильные, так и гидрофобные молекулы. Эти везикулы используются в различных областях науки и промышленности, включая фармацевтику, для целенаправленной доставки активных веществ, что повышает их биодоступность и минимизирует системную токсичность [14]. Для последующей характеристики подходов к контролю качества, которые могут быть использованы при анализе липосом, важно понимать, из каких компонентов они состоят (рисунок 2).

Ключевую роль в структуре и функциональности липосом играют фосфолипиды. Будучи основными компонентами живых клеток, фосфолипиды, такие как фосфотидилхолины и фосфотидилэтаноламины, обес-

печивают высокую биосовместимость липосом, минимизируя иммунный ответ, повышая устойчивость липосом и защищая их от физиологической деградации, что позволяет использовать их в медицинских целях [15, 16]. Для повышения стабильности липосомальных носителей в составе коммерческих продуктов практически всегда имеется холестерол, который дополнительно способствует упаковке липидных цепей и образованию бислоя [17, 18], а также ПЭГилированные липиды, выполняющие роль полиэтиленового покрытия, что способствует предотвращению метаболической инактивации и продлению циркуляции липосом в организме и термодинамической устойчивости (рисунок 3) [19–21].

Отдельное место в структуре некоторых липосом занимают ионизированные липиды. Ионизируемый катионный липид во время формирования частиц (при pH ~ 4) становится положительно заряженным и взаимодействует с отрицательно заряженным фосфатным остовом нуклеиновых кислот, оказывая таким образом содействие в их инкапсуляции в частицу и в последующем высвобождении в цитозоль.

Мицеллы

Мицеллы – наноразмерные саморганизирующиеся структуры амфифильной природы. В отличие от формирующих замкнутый бислой фосфолипидов липосом, мицеллы образуются за счет спонтанной агрегации в водной среде амфифильных сополимеров, в результате чего образуются частицы с выраженной ядерно-корональной структурой. Неполарные фрагменты сополимера [например, поликапролактона (ПКА), полилактида (ПЛА) или полиглутаминовой кислоты (ПГА)] формируют гидрофобное ядро – резервуар для солюбилизации липофильных соединений, в то время как гидрофильная корона стабили-

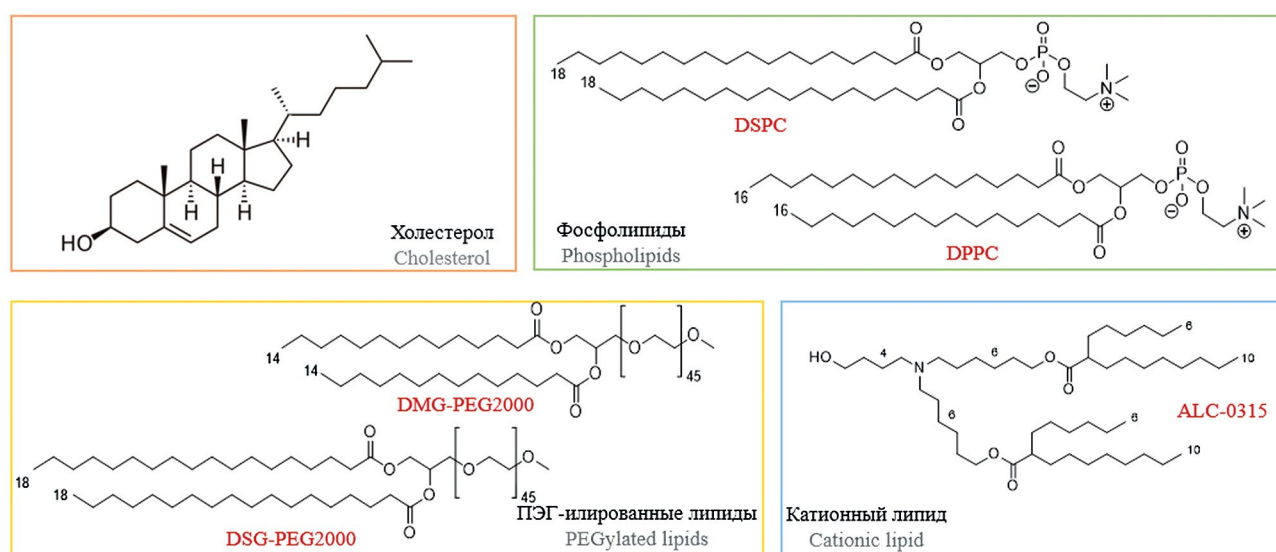


Рисунок 2. Некоторые составные компоненты липосом

Figure 2. Some components of liposomes

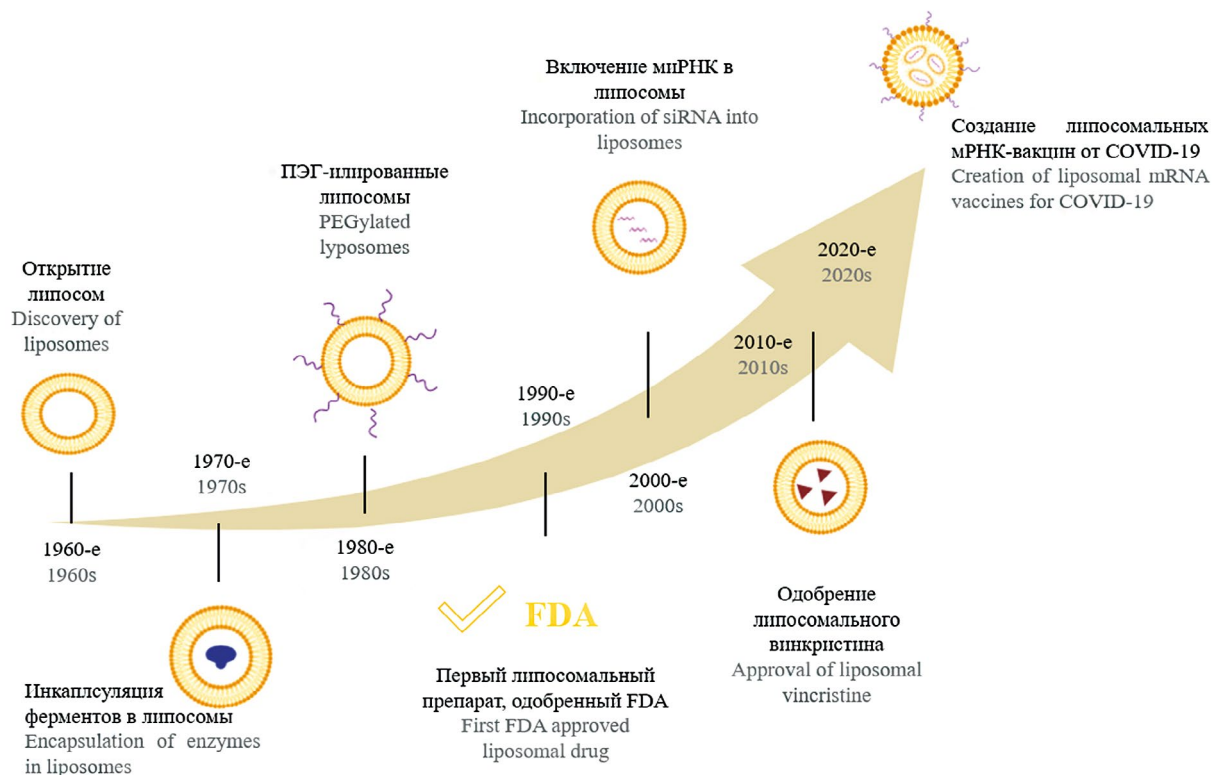


Рисунок 3. Схема истории создания липосомальных препаратов

Figure 3. A diagram of the history of liposomal preparations

зирует частицы в жидкостях и препятствует их преждевременной агрегации. Оптимизацию мицеллярных носителей обеспечивают путем химической модификации сополимеров, например ПЭГилированием. В настоящий момент данная технология реализована в препарате Genexol-PM® (Samyang Pharmaceuticals, Южная Корея), представляющем ПЭГ-ПЛА-мицеллы, нагруженные паклитаксолом. Применение препарата с инновационным носителем позволило достичь трехкратного увеличения AUC по сравнению со стандартной формой препарата при терапии рака молочной железы [22, 23].

Дендримеры

Поли(амидоаминные) дендримеры впервые были описаны в 1985 году и с конца 90-х годов прошлого века стали активно использоваться исследователями в качестве носителей лекарственных средств. Дендримеры характеризуются звездообразной трехмерной структурой с внутренним ядром и несколькими нитями. Данные макромолекулы связываются с АФС путем образования ковалентных связей, в данном случае ЛС может быть инкапсулировано во внутреннюю ветвь дендримера или прикреплено к внешним концам ветвей. Для облегчения циркуляции и нацеливания структура дендримеров может быть модифицирована путем добавления лигандов или заменой функциональных групп с целью дальнейше-

го использования их при лечении онкологических заболеваний или доставке вакцин [24, 25]. В настоящее время данная транспортная система реализована в препарате VivaGel® (Starpharma Holdings Ltd., Австралия), направленном на терапию ВИЧ и герпеса и одобренном FDA для клинического применения в 2013 году.

Биополимерные носители

Биоразлагаемые наночастицы из растительных полимеров наиболее предпочтительны из-за их высокой биосовместимости и низкой токсичности [27–29]. Наличие и возможность модификации таких функциональных групп в молекулах, как $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, способствуют появлению новых производных с разнообразными физико-химическими свойствами. К наиболее перспективным и активно изучаемым в настоящее время полимерам следует отнести полисахариды. Было установлено, что наночастицы на основе хитозана демонстрируют выраженные мукоадгезивные свойства, что, в свою очередь, способствует эффективному проникновению ЛС через слизистые оболочки. Это обусловлено наличием аминогрупп в структуре полимера, способных к протонированию и последующему электростатическому взаимодействию с отрицательно заряженными сиаловыми группами муцинов, что усиливает адгезию наночастиц хитозана [30]. Создание самоорганизующихся амфи-

фильных частиц на основе крахмала, глицирретиновой кислоты и биотина с последующей инкапсуляцией доксорубицина поспособствовало более высокому поглощению ЛС клетками и, как следствие, более высокой эффективности в отношении клеток HepG2 [31]. В свою очередь, некоторые полисахариды, такие как агароза, могут образовывать гели и микрогели, которые служат матрицей для удержания и последующего высвобождения молекулы активной фармацевтической субстанции [32]. Так, в гидрогель на основе сополимера полимолочной и гликолевой кислот (PLGA) был внедрен триамцинолона ацетонид. Полученная форма представляет собой внутрисуставную инъекцию, применяемую для лечения остеоартрита коленного сустава, и была одобрена FDA в 2017 году как Zilretta® (Flexion Therapeutics, Inc., США).

Неорганические наночастицы

Уникальные физико-химические свойства частиц неорганической природы позволяют активно применять их в направленной доставке лекарственных средств. Из всех металлических частиц наиболее значимыми являются золотые наночастицы, поскольку они могут быть использованы в качестве СД ЛС и фототермического агента (наночастицы, преобразуя поглощенный свет в тепло, способствуют нагреванию опухолевых клеток с их последующим разрушением) в терапии онкологических заболеваний [33, 34]. Мезопористые кремниевые частицы, обладающие высокой пористостью и большой площадью поверхности, используются в противоопухолевой практике для доставки гидрофобных и гидрофильных химиотерапевтических агентов [35]. Магнитные наночастицы оксидов железа, цинка, меди обладают суперпарамагнитными свойствами. При приложении внешнего магнитного поля магнитные моменты наночастиц выстраиваются вдоль направления поля, что позволяет управлять их локализацией и делает их перспективными кандидатами для доставки лекарственных средств [33, 36, 37]. Уникальность магнитных наночастиц состоит в том, что некоторые из них могут выступать как самостоятельные терапевтические агенты. Например, в 2009 году FDA одобрило препарат Feraheme® (AMAG Pharmaceuticals, США) для лечения железодефицитной анемии.

Клеточные носители лекарственных средств

Инновационным подходом в направленной доставке ЛС является использование клеточных систем. К ключевым преимуществам данных носителей следует отнести их естественную способность к таргетингу, что реализуемо благодаря их врожденной способности к избирательному взаимодействию с конкретными мишенями за счет рецепторов и хемотаксиса. Так, лейкоциты проникают через гематоэнцефалический барьер и доставляют ЛС непосредственно в патологические очаги, мезенхимальные ство-

ловые клетки мигрируют в зоны опухоли и воспаления. Использование собственных клеток пациентов (аутологичных) снижает риск иммунного отторжения. Модификация структуры клеток позволяет обеспечить пролонгированное действие лекарственного препарата за счет увеличения его циркуляции в организме [38]. Однако данный подход сопряжен с рядом трудностей: прежде всего трудоемкость культивирования клеток затрудняет масштабирование производства, а использование донорских (аллогенных) клеток способно вызвать ряд нежелательных иммунных реакций [39]. Интересным подходом является использование CAR-T-терапии (Chimeric Antigen Receptor T-cell therapy)¹, положенной в основу таких препаратов, как Yescarta® (Gilead Sciences, Inc., США), Kymriah® (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария).

Краткая характеристика препаратов на основе вышеуказанных носителей приведена в таблице 1.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НОСИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Контроль качества систем доставки лекарственных препаратов является одним из ключевых аспектов в обеспечении эффективной и безопасной терапии, который сопряжен с рядом трудностей. Они связаны прежде всего с отсутствием единых регуляторных стандартов для оценки качества СД ввиду многообразия их форм, состава и технологии получения. Ряд регуляторных органов, среди которых Европейское агентство лекарственных средств (EMA) в Европе и Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) в США, внедрили руководства для промышленности, основываясь на имеющихся научных данных, однако выделенные в них параметры не являются нормативными требованиями, а скорее носят рекомендательный характер в дополнение к руководящим принципам ICH и стандартам ISO^{2, 3, 4, 5, 6} (рисунок 4).

¹ Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Accessed: 02.02.2025.

² Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/data-requirements-intravenous-liposomal-products-developed-reference-innovator-liposomal-product-0>. Accessed: 02.02.2025.

³ Liposome Drug Products. Guidance for Industry. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070570.pdf>. Accessed: 02.02.2025.

⁴ Guideline for the Development of Liposome Drug Products. Available at: http://www.nihs.go.jp/drug/section4/160328_MHLW_liposome_guideline.pdf. Accessed: 02.02.2025.

⁵ Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/development-block-copolymer-micelle-medicinal-products>. Accessed: 02.02.2025.

⁶ Q8(R2) Pharmaceutical Development. Available at: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>. Accessed: 02.02.2025.

Таблица 1. Преимущества и недостатки некоторых препаратов, созданных с использованием носителей ЛС

Table 1. Advantages and disadvantages of some drugs created using drug carriers

Тип носителя Type of drug carrier	Наименование ЛП Name of the drug	Применение Application	Преимущества Advantages	Недостатки Disadvantages
Липосомы Liposomes	Doxil®	Рак яичников, саркома Капоши Ovarian cancer, Kaposi's sarcoma	Снижение кардиотоксичности, пролонгированное действие Reduction of cardiotoxicity, prolonged action	Высокая стоимость High cost
	AmBisome®	Грибковые инфекции Fungal infections	Снижение нефротоксичности по сравнению с классическим амфотерицином В Reduction of nephrotoxicity compared with classical amphotericin B	Высокая стоимость High cost
	Vyxeos®	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	Улучшенная эффективность комбинации цитарабин/даунорубицин Improved effectiveness of cytarabine/daunorubicin combination	Токсичность для костного мозга Bone marrow toxicity
	Marqibo®	Лейкемия, лимфома Leukemia, lymphoma	Пролонгированное высвобождение, снижение нейротоксичности Extended release, reduced neurotoxicity	Ограниченная эффективность при рецидивах Limited effectiveness in relapses
	Onpattro®	Наследственный транстиретиновый амилоидоз Hereditary transthyretin amyloidosis	Таргетинг на печень, защита мРНК от деградации Prolonged release, reduced nephrotoxicity	Высокая цена, риск инфузионных реакций High price, risk of infusion reactions
	Comirnaty®	COVID-19	Высокая эффективность доставки мРНК, быстрое производство High efficiency of mRNA delivery, fast production	Требуют сверхнизких температур хранения Require ultra-low storage temperatures
	Spikevax®	COVID-19		
Дендримеры Dendrimers	VivaGel®	Профилактика ВИЧ/герпеса Prevention of HIV/HSV	Мультивалентность, высокая активность Multivalence, high activity	Ограниченное применение (не для системной доставки) Limited use (not for system delivery)
Суперпарамагнитные наночастицы Superparamagnetic nanoparticles	Feraheme®	Железодефицитная анемия Iron deficiency anemia	Двойное применение (терапия + диагностика), быстрое введение Dual use (therapy + diagnosis), rapid administration	Риск анафилаксии, ограниченный срок хранения Risk of anaphylaxis, limited shelf life
Полимерные мицеллы Polymer micelles	Genexol-PM®	Рак молочной железы, легких Breast and lung cancer	Отсутствие токсичного кремофора, повышенная растворимость Absence of toxic cremophore, increased solubility	Риск диссоциации <i>in vivo</i> , ограниченная емкость загрузки Risk of dissociation in vivo, limited loading capacity
Полимерные наночастицы Polymer nanoparticles	Zilretta®	Остеоартрит коленного сустава Knee osteoarthritis	Пролонгированное действие (до 12 недель), снижение системной токсичности Prolonged action (up to 12 weeks), reduction of systemic toxicity	Ограниченная эффективность при тяжелых формах Limited effectiveness in severe forms

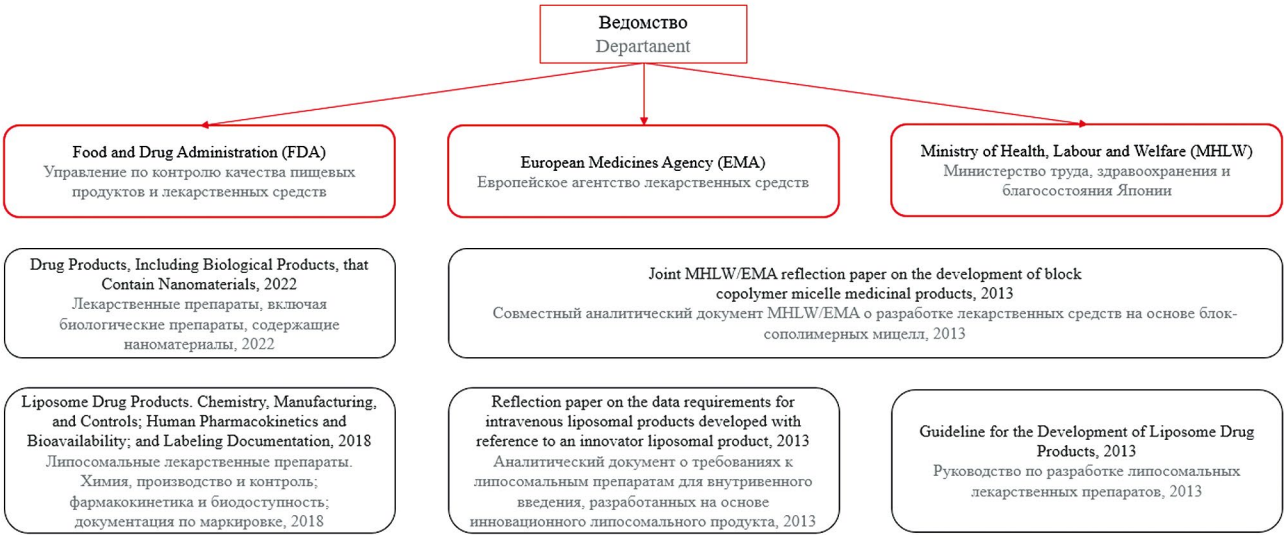


Рисунок 4. Руководства по контролю качества носителей лекарственных средств

Figure 4. Guidelines for quality control of drug carriers

**Параметры качества,
контролируемые в системах доставки
лекарственных средств**

Критические атрибуты качества (КАК) продукта – это физические, химические, биологические или микробиологические свойства или характеристики, которые могут повлиять на фармакокинетическую или фармакодинамическую эффективность готового продукта [40]. Системный анализ имеющихся на данный момент документов в области качества позволил выделить как общие КАК, характерные для всех типов носителей, так и частные (таблица 2). Стоит отметить,

что для носителей лекарственных препаратов должны быть определены физико-химические параметры и дана биологическая характеристика.

Одной из ключевых характеристик носителей является морфология частиц. Данная характеристика включает размер, форму и ламеллярность, поскольку они оказывают влияние на поглощение их клетками, биораспределение и период полураспада [41, 42]. Основные методы определения данных показателей с указанием их преимуществ и недостатков представлены в работе группы российских ученых [О. Н. Пожарицкая и др.] [42].

Таблица 2. Атрибуты качества наноносителей лекарственных средств в соответствии с основными руководствами

Table 2. Quality attributes of drug nanocarriers in accordance with the main guidelines

Атрибут качества Quality attribute	Тип носителя Type of drug carrier				
	Липосомальные ЛС Liposomal drug products		Нанокolloиды на основе железа Iron-based nano-colloidal	Блок-сополимерные мицеллы Blok copolymer mycells	
	Регулирующее агентство Regulatory agency				
	FDA	EMA	MLHW	EMA	EMA / MHLW
Общие атрибуты качества Common quality attributes					
Морфология Morphology	+	+	+	+	+
Размер частиц Particle size	+	+	+	+	+
Заряд поверхности частицы (дзета-потенциал) Particle surface charge (zeta potential)	+	+	+	+	+
Контроль основных компонентов Control of the main components	+	+	+	+	+

Атрибут качества Quality attribute	Тип носителя Type of drug carrier				
	Липосомальные ЛС Liposomal drug products			Нанокolloиды на основе железа Iron-based nano-colloidal	Блок-сополимерные мицеллы Blok copolymer mycells
	Регулирующее агентство Regulatory agency				
	FDA	EMA	MLHW	EMA	EMA / MHLW
Продукты распада Decomposition products	+	+	+	+	+
Стабильность Stability	+	+	+	+	+
Примеси Impurities	+	+	+	+	+
Частные атрибуты качества Private quality attributes					
Контроль промежуточных продуктов в процессе производства Control of intermediates in the produc- tion process	+	+	+	+	н/к n/c
Ламеллярность Lamellarity	+	н/к n/c	+	н/к n/c	н/к n/c
Характеристика поверхности Surface characteristics	+	н/к n/c	н/к n/c	н/к n/c	+
Вязкость Viscosity	+	н/к n/c	н/к n/c	н/к n/c	+
Степень насыщения ЛС Degree of drug saturation	+	н/к n/c	+	+	н/к n/c
Термодинамические свойства мембраны Thermodynamic properties of the membrane	+	н/к n/c	+	н/к n/c	н/к n/c
Высвобождение ЛС <i>in vitro</i> Drug release <i>in vitro</i>	+	н/к n/c	+	н/к n/c	+
Оценка целостности липосом в ответ на факторы Assessment of liposome integrity in response to factors	+	н/к n/c	+	н/к n/c	н/к n/c
Остаточные органические растворители Residual organic solvents	+	+	н/к n/c	н/к n/c	+
Ассоциативное число An associative number	н/к n/c	н/к n/c	н/к n/c	н/к n/c	+
Соотношение связанного углевода к железу The ratio of bound carbon to iron	н/к n/c	н/к n/c	н/к n/c	+	н/к n/c
Размер железного сердечника The size of the iron core	н/к n/c	н/к n/c	н/к n/c	+	н/к n/c
Количество лабильного железа, выде- ляющегося из продукта при введении The amount of labile iron released from the product during administration	н/к n/c	н/к n/c	н/к n/c	+	н/к n/c

Примечание. FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (США).

EMA – Европейское агентство лекарственных средств (Нидерланды).

MHLW – Министерство здравоохранения, труда и благосостояния (Япония).

«+» – данный показатель контролируется.

«н/к» – данный показатель не контролируется.

Note. FDA – Food and Drug Administration (USA).

EMA – European Medicines Agency (Netherlands).

MHLW – Ministry of Health, Labour and Welfare (Japan).

"+" – this indicator is monitored.

"n/c" – this indicator is not controlled.

Заряд поверхности мембраны носителей

Данный показатель является обязательной характеристикой качества для всех видов носителей, поскольку он отражает термодинамическую устойчивость частиц. Величина дзета-потенциала позволяет определить, будет стабильна частица или нет. Так, например, липосомы с высокими отрицательными или положительными значениями дзета-потенциала отталкиваются друг от друга, преодолевая естественную тенденцию к агрегации, и остаются монодисперсными [43].

В данный момент определение дзета-потенциала носителей можно проводить на приборах динамического светорассеяния, которые позволяют регистрировать изменения интенсивности рассеянного света из-за подвижности наночастиц под действием электрического поля, приложенного к зарядам частиц. Но, поскольку величина дзета-потенциала зависит от условий окружающей среды, значения pH и температуры, для получения достоверных и сопоставимых результатов следует уделять значительное внимание уделять валидационным параметрам, а именно робастности [44].

Контроль основных компонентов носителей

Особое внимание в анализируемых руководящих документах уделено необходимости установления и/или подтверждения структуры компонентов носителей, учитывая специфичность расположения характерных функциональных групп и боковых цепей, поскольку это влияет непосредственно на качество как самого носителя, так и лекарственного препарата в целом. В настоящее время для установления и/или подтверждения структуры молекул носителей активно используются спектральные методы анализа, среди которых спектроскопия ядерного магнитного резонанса, рамановская спектроскопия, масс-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Метод ядерного магнитного резонанса, который основан на регистрации химических сдвигов ядер, является одним из основных способов анализа структуры химических соединений. ЯМР подходит для одновременного качественного и количественного определения основных компонентов носителей, а также возможных примесей. При анализе методом ЯМР используют разные способы, которые зависят от типа изучаемых ядер, например ^1H (протон), ^{13}C (углерод), ^{15}N (азот), ^{31}P (фосфор). Так, в литературе есть сведения об использовании методов ^1H —, ^{13}C — и ^{31}P -ЯМР для установления молекулярной структуры структурных компонентов липосом [44–47], мицелл, дендримеров [48], ниосом [59].

Поскольку фосфолипиды в своей структуре имеют, как правило, одно ядро ^{31}P , для которого характерны высокое гидромагнитное отношение и вторая,

после ядра ^1H , чувствительность, то оно считается более подходящим для анализа молекул фосфолипидов [49].

Рамановская спектроскопия. Данный метод основан на неупругом рассеянии фотонов при взаимодействии с исследуемым веществом и используется для характеристики и/или регистрации изменений в структуре или свойствах различных структур, в частности углеродных нанотрубок и их композитов, образованных наночастицами титана диоксида [50], для подтверждения структуры липидных наночастиц, ниосом и полисахаридных наночастиц [51–53].

Масс-спектрометрия является наиболее используемым в последние годы инструментом для анализа липидов ввиду своей высокой чувствительности и универсальности. Данный метод основан на определении молекулярных масс исследуемых соединений и часто применяется в сочетании с хроматографическими методами [54–61].

Идентификация

и количественное определение наночастиц

Хроматографические методы анализа являются предпочтительными при качественном и количественном анализе наночастиц на основе липидов. Жидкостная хроматография нашла наиболее широкое применение в анализе липидных молекул. Согласно данным литературы (таблица 3), исследователи, как правило, прибегают к обращенно-фазовому варианту ВЭЖХ. Как представлено в таблице, после хроматографического разделения соединения могут быть идентифицированы с помощью различных детекторов: ультрафиолетового, испарительного рассеяния света, заряженных аэрозолей, а также с помощью масс-спектрометрического. Помимо этого, данными способами можно анализировать не только молекулы, являющиеся субстратами для синтеза наночастиц, но и полученные липидные носители после предварительного разрушения органическими растворителями [54].

Наряду с жидкостной хроматографией газовая хроматография также может быть использована для анализа липидов, однако после предварительной дериватизации с целью превращения аналита в метиловые эфиры. В последние десятилетия прошлого века газовая хроматография использовалась преимущественно в совокупности с пламенно-ионизационным детектором, однако в настоящее время наиболее часто исследовательские группы работают с масс-селективным детектором [60, 61].

Одним из основных преимуществ представленных в таблице методик является быстрое время записи хроматограммы, что позволяет активно использовать их при проведении рутинного анализа и при анализе промежуточных продуктов синтеза.

Таблица 3. Сравнительная характеристика некоторых методов хроматографического определения липидных компонентов наноносителей
Table 3. Comparative characteristics of some methods of chromatographic determination of lipid components of nanocarriers

Метод Method	Колонка Column	$t_{\text{колонки}}^{\circ}\text{C}$ $t_{\text{column}}^{\circ}\text{C}$	Подвижная фаза Mobile phase	Скорость потока, мл/мин Flow rate, ml/min	Соединения Compounds	Детектор Detector	Время записи хроматограммы, мин Chromatogram recording time, min	Литература References
ВЭЖХ HPLC	Hypersil Silica (Hewlett Packard), 200 × 4,6 мм, 5 мкм Hypersil Silica (Hewlett Packard), 200 × 4,6 мм, 5 μm	40	Ацетонитрил, о-фосфорная кислота (конц.), метанол (95:2:3) Acetonitrile, O-phosphorus oxugen (conc), methanol (95:2:3)	1,5	Фосфатидилхолин Phosphatidylcholine	УФ UV	10	[60]
	Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 × 4 мм 2, 5 мкм Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 × 4 мм 2, 5 μm	25	Изопропиловый спирт, вода и метанол (70:22:8) Isopropyl vancomycin alcohol, water and methanol (70:22:8)	0,5	Фосфатидилхолин Phosphatidylcholine	УФ UV	15	[61]
	Phenomenex Luna C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм Phenomenex Luna C18, 150 × 4,6 мм, 5 μm	28	Изопропанол, ацетонитрил, вода (60:30:10) Isopropanol, acetonitrile, water (60:30:10)	1,0	Холестерол Cholesterol	УФ UV	16	[62]
	Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1 × 100 мм, 3,5 мкм Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1 × 100 мм, 3,5 μm	12	Ацетонитрил, метанол (60:40) Acetonitrile, methanol (60:40)	0,5	Холестерол Cholesterol	УФ UV	7	[63]
	Hypersil BDS C8, 15 см × 4,6 мм, 5 мкм Hypersil BDS C8, 15 cm × 4,6 mm, 5 μm	60	Буферный раствор фосфата аммония (рН 2,7), метанол (15:85) Bufern extravor phosphate ammonium (aposematic 2,7), methanol (15:85)	2,0	Холестерин и ДОФХ Cholesterol and DOPA	УФ UV	20	[64]
	Inertsil GLTM , 250 × 4,6 мм, 5 мкм Inertsil GLTM , 250 × 4,6 mm, 5 μm	30	Метанол:ацетонитрил (90:10) Methanol: acetonitri (90:10)	1,0	Фосфатидилхолин Phosphatidylcholine	УФ-/испаритель- ный детектор све- торассеяния UV/ELSD	15	[65]

Окончание таблицы 3

Метод Method	Колонка Column	$t_{\text{колонки}}^{\text{°C}}$ $t_{\text{column}}^{\text{°C}}$	Подвижная фаза Mobile phase	Скорость потока, мл/мин Flow rate, ml/min	Соединения Compounds	Детектор Detector	Время записи хроматограммы, мин Chromatogram recording time, min	Литература References
ВЭЖХ HPLC	Luna C18(2), 150 × 4,6 мм, 3 мкм Luna C18(2), 150 × 4,6 mm, 3 μm	20	Элюент А (0,15 % ТФУ в H ₂ O) и элю- ент В (0,1 % ТФУ в MeOH). 0 мин 85 % В, 0,1–7,5 мин 85–100 % В, 7,5–12 мин 100 % В, 12–15 мин 85 % В Eluent A (0.15 % TFC in H ₂ O) and eluent B (0.1 % TFC in MeOH), 0 min 85 % in, 0.1–7.5 min 85–100 % in. 7.5–12 min 100 % V, 12–15 min 85 % B	2,0	1,2-диолеил-3-триме- тиламмоний пропан / ДМГ-ПЭГ-2000 / холе- стерин / ДООЭ / ДСФЕ- ПЭГ-2000 1,2-Dioleoyl-3-trimethy- lammonium propane / MG-PEG-2000 / Cho- lesterol / DFE / DFE- PEG-2000	Детектор заряжен- ных аэрозолей Charged aerosol detector	15	[66]
	НР-5МС, 30 м × 0,25 мм, 0,33 мкм НР-5МС, 30 m × 0,25 mm, 0,33 μm	0–3 мин 150, затем до 280 (20 °С/мин) 0–3 min 150, then up to 280 (20 °C/min)	Гелий Gellius	1,0	Фосфатидиламины Phosphatidylamines	Масс-селективный Mass-selective	30	[67]
ГХ GH	МХТ-1, 30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм МХТ-1, 30 m × 0,25 mm, 0,25 μm	0–3 мин 260, до 320 (10 °С/ мин), до 330 (2 °С/ мин) до 380 (30 °С/мин (30 °C/min 0–3 min 260, up to 320 (10 °C/min), up to 330 (2 °C/min), up to 380 (30 °C/min)	Гелий Gellius	1,1	Холестерин Cholesterol	Масс-селективный Mass-selective	27	[68]

Подводя итог, можно сделать вывод, что спектральные и хроматографические методы могут служить полезными инструментами при идентификации и количественном определении липидных компонентов наночастиц.

Стабильность наноносителей

В процессе хранения наночастицы должны быть как химически, так и физически стабильны, сохраняя свои размеры [15]. Некоторые липидные наночастицы во время хранения могут сливаться в большие агрегаты с изменением величины поверхностного заряда, что может быть визуализировано с использованием методов микроскопии. Химическая же стабильность носителей, в частности их компонентов, может быть определена с помощью методов, описанных ранее.

Степень загрузки наноносителя лекарственным веществом

Оценка степени насыщения носителя ЛС является одним из ключевых атрибутов качества. Именно этот параметр позволяет оценить количество препарата, включенное в носитель, и предопределить терапевтическую эффективность данной лекарственной формы. В данный момент методы оценки степени насыщения можно разделить на прямые и косвенные (таблица 4).

Таблица 4. Методы оценки степени насыщения носителей ЛС

Table 4. Methods for assessing the degree of saturation of carriers with a drug

Прямые методы Direct methods	Косвенные методы Indirect methods
Хроматографические: – ВЭЖХ; – ГХ Chromatographic: – HPLC; – GC	Определение свободного ЛС Definition of a free drug
Спектроскопические: – УФ-спектроскопия; – Флуоресцентная спектроскопия; – ЯМР-спектроскопия; – Масс-спектрометрия; Spectroscopic: – UV spectroscopy; – Fluorescence spectroscopy; – NMR spectroscopy; – Mass spectrometry	Метод разрушения носителя The method of destruction of the carrier

Выбор метода анализа следует осуществлять в соответствии с характеристиками действующего вещества и носителя. Хроматографические методы анализа могут быть применены после экстракции действующего вещества из СД или после разрушения по-

следней. Метод УФ-спектроскопии подходит для анализа АФС, имеющих характерные спектры поглощения, а флуоресцентная спектроскопия применяется при анализе флуоресцентных или меченых соединений. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса позволяет оценить загрузку, а также взаимодействие носителя и действующего вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре представлена системная характеристика подходов к контролю качества систем доставки и их компонентов, которые существуют в настоящее время. Показано, что отсутствие единых стандартизованных подходов к контролю качества затрудняет анализ ряда общих и частных атрибутов качества носителей из-за вариативности методов оценки стабильности носителя, степени инкапсуляции ЛС, характеристики мембраны и ее термодинамических свойств и т.д. Это зачастую приводит к неоднозначности результатов исследования и сложности сравнения данных. Помимо этого, отсутствие единых стандартов усложняет процесс регистрации новых препаратов ввиду сложности предоставления четких воспроизводимых данных о качестве и безопасности из-за методологической неоднородности.

Следовательно, разработка аналитических подходов, которые могут иметь широкое практическое применение, а также алгоритмизация процесса стандартизации различных систем доставки является одним из векторных направлений фармацевтической аналитики.

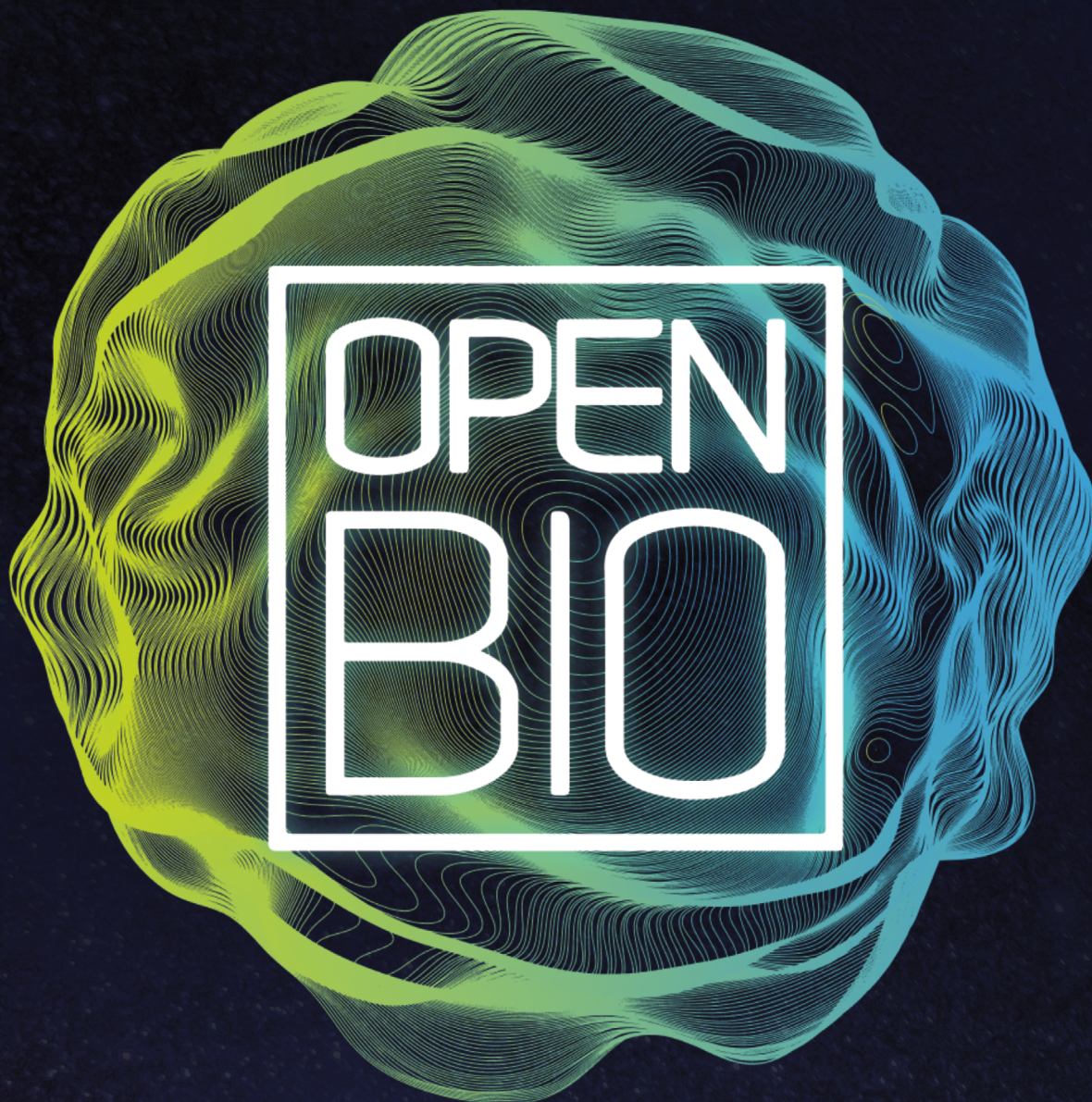
Гармонизация российских стандартов с международными нормами, а также унификация критериев приемлемости для ключевых показателей качества позволит минимизировать риски, связанные с производством и использованием носителей ЛС, а также обеспечит высокие стандарты качества на всех этапах жизненного цикла препарата – от разработки до непосредственного применения пациентом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wen H., Jung H., Li X. Drug delivery approaches in addressing clinical pharmacology-related issues: opportunities and challenges. *The AAPS Journal*. 2015;17:1327–1340. DOI: 10.1208/s12248-015-9814-9.
2. Franzè S., Musazzi U. M., Minghetti P., Cilurzo F. Drug-in-micelles-in-liposomes (DiMiL) systems as a novel approach to prevent drug leakage from deformable liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;130:27–35. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.01.013.
3. Li C., Wang Y., Du Y., Qian M., Jiang H., Wang J., Murthy N., Huang R. Side effects-avoided theranostics achieved by biodegradable magnetic silica-sealed mesoporous polymer-drug with ultralow leakage. *Biomaterials*. 2018;186:1–7. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.039.
4. Niu M., Lu Y., Hovgaard L., Guan P., Tan Y., Lian R., Qi J., Wu W. Hypoglycemic activity and oral bioavailability of insulin-loaded liposomes containing bile salts in rats: The effect of cholate type, particle size and administered dose.

- European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012;81(2):265–272. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.02.009.
5. Li C., Zhang Y., Wan Y., Wang J., Lin J., Li Z., Huang P. STING-activating drug delivery systems: Design strategies and biomedical applications. *Chinese Chemical Letters*. 2021;32(5):1615–1625. DOI: 10.1016/j.cclet.2021.01.001.
6. Atanase L. I. Micellar drug delivery systems based on natural biopolymers. *Polymers*. 2021;13(3):477. DOI: 10.3390/polym13030477.
7. Jaferník K., Ładniak A., Blicharska E., Czarnek K., Ekiert H., Wiącek A. E., Szopa A. Chitosan-based nanoparticles as effective drug delivery systems—a review. *Molecules*. 2023;28(4):1963. DOI: 10.3390/molecules28041963.
8. Guimarães D., Cavaco-Paulo A., Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;601:120571. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120571.
9. Song Z., Lin Y., Zhang X., Feng C., Lu Y., Gao Y., Dong C. Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system for targeted oral apatinib administration: enhanced cellular uptake and improved therapeutic effects. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:1941–1958. DOI: 10.2147/IJN.S125573.
10. Nehal N., Rohilla A., Sartaj A., Baboota S., Ali J. Folic acid modified precision nanocarriers: charting new frontiers in breast cancer management beyond conventional therapies. *Journal of Drug Targeting*. 2024;32(8):855–873. DOI: 10.1080/1061186X.2024.2356735.
11. Gagliardi A., Giuliano E., Venkateswararao E., Fresta M., Bulotta S., Awasthi V., Cosco D. Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:601626. DOI: 10.3389/fphar.2021.601626.
12. Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*. 2015;33(9):941–951. DOI: 10.1038/nbt.3330.
13. Wang N., Wang T., Li T., Deng Y. Modulation of the physicochemical state of interior agents to prepare controlled release liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;69(2):232–238. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.11.033.
14. Nogueira E., Gomes A. C., Preto A., Cavaco-Paulo A. Design of liposomal formulations for cell targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;136:514–526. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.09.034.
15. Mali A. D., Bathe R. S. An updated review on liposome drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*. 2015;5(3):151–157. DOI: 10.5958/2231-5691.2015.00023.4.
16. Tam Y., Chen S., Cullis P. Advances in lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Pharmaceutics*. 2013;5(3):498–507. DOI: 10.3390/pharmaceutics5030498.
17. Pastore M. N., Kalia Y. N., Horstmann M., Roberts M. S. Transdermal patches: history, development and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*. 2015;172(9):2179–2209. DOI: 10.1111/bph.13059.
18. Damjanović J., Nakano H., Iwasaki Y. Simple and efficient profiling of phospholipids in phospholipase D-modified soy lecithin by HPLC with charged aerosol detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2013;90:951–957. DOI: 10.1007/s11746-013-2236-x.
19. Shirane D., Tanaka H., Nakai Y., Yoshioka H., Akita H. Development of an alcohol dilution-lyophilization method for preparing lipid nanoparticles containing encapsulated siRNA. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2018;41(8):1291–1294. DOI: 10.1248/bpb.b18-00208.
20. Schoenmaker L., Witzigmann D., Kulkarni J. A., Verbeke R., Kersten G., Jiskoot W., Crommelin D. J. A. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;601:120586. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586.
21. Smith M. C., Crist R. M., Clogston J. D., McNeil S. E. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017;409:5779–5787. DOI: 10.1007/s00216-017-0527-z.
22. Jiang G.-B., Quan D., Wang H., Liao K. Preparation of polymeric micelles based on chitosan bearing a small amount of highly hydrophobic groups. *Carbohydrate Polymers*. 2006;66(4):514–520.
23. Li J., Li Z., Zhou T., Zhang J., Xia H., Li H., He J., He S., Wang L. Positively charged micelles based on a triblock copolymer demonstrate enhanced corneal penetration. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;10:6027–6037. DOI: 10.2147/IJN.S90347.
24. Li J., Liang H., Liu J., Wang Z. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimer mediated delivery of drug and pDNA/siRNA for cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;546(1–2):215–225. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.045.
25. Yellepeddi V. K., Ghandehari H. Poly(amido amine) dendrimers in oral delivery. *Tissue Barriers*. 2016;4(2):e1173773. DOI: 10.1080/21688370.2016.1173773.
26. Pires P. C., Mascarenhas-Melo F., Pedrosa K., Lopes D., Lopes J., Macário-Soares A., Peixoto D., Giram P. S., Veiga F., Paiva-Santos A. C. Polymer-based biomaterials for pharmaceutical and biomedical applications: A focus on topical drug administration. *European Polymer Journal*. 2023;187:111868. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2023.111868.
27. Sharma R. Biodegradable Polymer Nanoparticles: Therapeutic Applications and Challenges. *Oriental Journal of Chemistry*. 2022;38(6):1419–1427. DOI: 10.13005/ojc/380612.
28. Sung Y. K., Kim S. W. Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research*. 2020;24(1):12. DOI: 10.1186/s40824-020-00190-7.
29. Matalqah S. M., Aiedeh K., Mhaidat N. M., Alzoubi K. H., Bustanji Y., Hamad I. Chitosan nanoparticles as a novel drug delivery system: a review article. *Current Drug Targets*. 2020;21(15):1613–1624. DOI: 10.2174/1389450121666200711172536.
30. Idrees H., Zaidi S. Z. J., Sabir A., Khan R. U., Zhang X., Hassan S. A review of biodegradable natural polymer-based nanoparticles for drug delivery applications. *Nanomaterials*. 2020;10(10):1970. DOI: 10.3390/nano10101970.
31. Chen X., Han W., Wang G., Zhao X. Application prospect of polysaccharides in the development of anti-novel coronavirus drugs and vaccines. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164:331–343. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.106.
32. Mandava K. Biological and non-biological synthesis of metallic nanoparticles: Scope for current pharmaceutical research. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;79(4):501–512.
33. Vangijzegem T., Stanicki D., Laurent S. Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2019;16(1):69–78. DOI: 10.1080/17425247.2019.1554647.
34. Ojea-Jiménez I., Comenge J., García-Fernández L., Megson Z. A., Casals E., Puentes V. F. Engineered inorganic nanoparticles for drug delivery applications. *Current Drug Metabolism*. 2013;14(5):518–530. DOI: 10.2174/13892002113149990008.

35. Hu X., Zhang Y., Ding T., Liu J., Zhao H. Multifunctional gold nanoparticles: a novel nanomaterial for various medical applications and biological activities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:990. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00990.
36. Xie W., Guo Z., Gao F., Gao Q., Wang D., Liaw B.-S., Cai Q., Sun X., Wang X., Zhao L. Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics. *Theranostics*. 2018;8(12):3284–3307. DOI: 10.7150/thno.25220.
37. Ries C.H., Cannarile M.A., Hoves S., Benz J., Wartha K., Runza V., Rey-Giraud F., Pradel L.P., Feuerhake F., Klamann I., Jones T., Jucknischke U., Scheiblich S., Kaluza K., Gorr I.H., Walz A., Abiraj K., Cassier P.A., Sica A., Gomez-Roca C., de Visser K.E., Italiano A., Le Tourneau C., Delord J.-P., Levitsky H., Blay J.-Y., Rüttinger D. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(6):846–859. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.05.016.
38. Mitchell M.J., Billingsley M.M., Haley R.M., Wechsler M.E., Peppas N.A., Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(2):101–124. DOI: 10.1038/s41573-020-0090-8.
39. Sterner R.C., Sterner R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal*. 2021;11(4):69. DOI: 10.1038/s41408-021-00459-7.
40. Tam Y.Y.C., Chen S., Cullis P.R. Advances in lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Pharmaceutics*. 2013;5(3):498–507. DOI:10.3390/pharmaceutics5030498.
41. Sydow K., Nikolenko H., Lorenz D., Müller R.H., Dathe M. Lipopeptide-based micellar and liposomal carriers: Influence of surface charge and particle size on cellular uptake into blood brain barrier cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;109:130–139. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.09.019.
42. Pozharitskaya O.N., Kozur Yu.M., Osochuk S.S., Flisyuk E.V., Smekhova I.E., Malkov S.D., Zarifi K.O., Titovich I.A., Krasova E.K., Shikov A.N. Liposomes – metabolically active drug transport systems: visualization and pharmacokinetic. Part 2 (review). *Drug development & registration*. 2024;13(4):78–98. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1919.
43. Fischer K., Schmidt M. Pitfalls and novel applications of particle sizing by dynamic light scattering. *Biomaterials*. 2016;98:79–91. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.05.003.
44. Forero Ramirez L.M., Rihouey C., Chaubet F., Le Cerf D., Picton L. Characterization of dextran particle size: How frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation (FI-AF4) coupled online with dynamic light scattering (DLS) leads to enhanced size distribution. *Journal of Chromatography A*. 2021;1653:462404. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462404.
45. Sitterberg J., Özçetin A., Ehrhardt C., Bakowsky U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(1):2–13. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.005.
46. Akhtar K., Khan S.A., Khan S.B., Asiri A.M. Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization. In: Sharma S.K., editor. *Handbook of Materials Characterization*. Cham: Springer; 2018. P. 113–145. DOI: 10.1007/978-3-319-92955-2_4.
47. Yang Y., Chen Y., Li D., Lin S., Chen H., Wu W., Zhang W. Linolenic acid conjugated chitosan micelles for improving the oral absorption of doxorubicin via fatty acid transporter. *Carbohydrate Polymers*. 2023;300:120233. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.120233.
48. Dehghani B., Mirzaei M., Lohrasbi-Nejad A. Characterization of Thermoresponsive Poly(N-vinylcaprolactam) Polymer Containing Doxorubicin-Loaded Niosomes: Synthesis, Structural Properties, and Anticancer Efficacy. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2025;20(1):7.
49. Silva K.C., Corio P., Santos J.J. Characterization of the chemical interaction between single-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanoparticles by thermogravimetric analyses and resonance Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 2016;86:103–108.
50. Xiong X., Wang Y., Zou W., Duan J., Chen Y. Preparation and characterization of magnetic chitosan microcapsules. *Journal of Chemistry*. 2013;2013:585613. DOI: 10.1155/2013/585613.
51. Luo G., Yang Q., Yao B., Tian Y., Hou R., Shao A., Li M., Feng Z., Wang W. Slp-coated liposomes for drug delivery and biomedical applications: potential and challenges. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:1359–1383. DOI: 10.2147/IJN.S189935.
52. Li Y., Driver M., Decker E., He L. Lipid and lipid oxidation analysis using surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) coupled with silver dendrites. *Food Research International*. 2014;58:1–6. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.056.
53. Jangle R.D., Galge R.V., Patil V.V., Thorat B.N. Selective HPLC method development for soy phosphatidylcholine fatty acids and its mass spectrometry. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;75(3):339–345. DOI: 10.4103/0250-474X.117435.
54. Singh R., Bharti N., Madan J., Hiremath S.N. A rapid isocratic high-performance liquid chromatography method for determination of cholesterol and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in liposome-based drug formulations. *Journal of Chromatography A*. 2015;1073(1–2):347–353.
55. Son H.-H., Moon J.-Y., Seo H.S., Kim H.H., Chung B.C., Choi M.H. High-temperature GC-MS-based serum cholesterol signatures may reveal sex differences in vasospastic angina. *Journal of Lipid Research*. 2014;55(1):155–162. DOI: 10.1194/jlr.D040790.
56. Scherer M., Böttcher A., Liebisch G. Lipid profiling of lipoproteins by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011;1811(11):918–924. DOI: 10.1016/j.bbalip.2011.06.016.
57. Marifova Z.A., Azizov I.K. Determination of phosphatidylcholine and α -tocopherol in the seed oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) growing in Uzbekistan. *Pharmacy*. 2018;67(1):19–23. (Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2018-01-04.
58. Paulazo M.A., Sodero A.O. Analysis of cholesterol in mouse brain by HPLC with UV detection. *PLOS One*. 2020;15(1):e0228170. DOI: 10.1371/journal.pone.0228170.
59. Kolarić L., Šimko P. Determination of cholesterol content in butter by HPLC: Up-to-date optimization, and in-house validation using reference materials. *Foods*. 2020;9(10):1378. DOI: 10.3390/foods9101378.
60. Jing Z., Xianmei H., Tianxin W., Hao L., Qipeng Y. HPLC analysis of egg yolk phosphatidylcholine by evaporative light scattering detector. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2012;20(4):665–672.
61. Bender V., Fuchs L., Süß R. RP-HPLC-CAD method for the rapid analysis of lipids used in lipid nanoparticles derived from dual centrifugation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2024;7:100255. DOI: 10.1016/j.ijpx.2024.100255.



ХII РОССИЙСКИЙ ФОРУМ БИОТЕХНОЛОГИЙ

23 - 26 СЕНТЯБРЯ 2025, наукоград КОЛЬЦОВО

БИЗНЕС- ФОРУМ

ДЛЯ БИЗНЕСА,
НАУКИ, ВЛАСТИ
И ИНФРАСТРУКТУРЫ

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

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

ОТРАСЛЕВАЯ ВЫСТАВКА

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ
КОМПАНИЙ

OPENBIO.RU





Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения

Р. Э. Ермаченков¹✉, А. Л. Марков¹, М. М. Агаев¹, А. М. Алиев²,
М. Н. Пovyдыш¹, И. И. Тернинко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Горный ботанический сад Дагестанского научного центра Российской академии наук (Горный ботанический сад ДНЦ РАН). 367000, Россия, Республика Дагестан, г. Махачкала, ул. Ярагского, д. 75

✉ Контактное лицо: Ермаченков Роман Энверович. E-mail: ermachenkov.roman@pharminnotech.com

ORCID: Р. Э. Ермаченков – <https://orcid.org/0009-0006-7785-7143>;

А. Л. Марков – <https://orcid.org/0009-0006-4995-8529>;

М. М. Агаев – <https://orcid.org/0009-0007-8026-2981>;

А. М. Алиев – <https://orcid.org/0000-0002-2181-1801>;

М. Н. Пovyдыш – <https://orcid.org/0000-0002-7768-9059>;

И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Статья поступила: 16.06.2025

Статья принята в печать: 22.07.2025

Статья опубликована: 25.07.2025

Резюме

Введение. Сведения о сезонной вариабельности эфирных масел имеют ключевое значение при определении сезонов заготовки: вариации компонентного состава должны быть минимальны, а диапазоны концентраций должны соответствовать установленным в нормативной документации, при этом должен наблюдаться максимально возможный выход эфирного масла. Розмарин лекарственный произрастает на юге Российской Федерации (Республика Крым, Кавказ), при этом хроматографический профиль его эфирного масла не закреплен в нормативной документации, а в русскоязычной научной литературе отсутствуют исследования сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла несмотря на то, что в Республике Дагестан розмарин лекарственный цветет практически круглогодично.

Цель. Изучение сезонных вариаций эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения.

Материалы и методы. Оценка содержания эфирного масла проводилась в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи 11 издания путем гидродистилляции с использованием аппарата Клевенджера. Газохроматографический анализ проводился с использованием газового хроматографа «Кристалл 5000.2», оснащенного пламенно-ионизационным детектором, разделение проводилось на колонках с неподвижной фазой различной полярности: HP-5MS UI и DB-WAX. Идентификация компонентов проводилась путем сравнения расчетных линейных индексов удерживания, полученных на двух колонках различной полярности, со справочными значениями.

Результаты и обсуждение. Содержание эфирного масла розмарина лекарственного в растительном сырье составляет от 2,06 до 2,24 %. Статистический анализ не выявил значимых различий между результатами, полученными в течение эксперимента. По итогам газохроматографического анализа удалось установить α -пиненовый хемотип эфирного масла дагестанского происхождения. В образцах эфирных масел было идентифицировано 30 соединений, составляющих не менее 95 % от их состава. При интерпретации результатов статистической обработки содержания компонентов в зависимости от даты сбора сырья для большинства мажоритарных компонентов отмечены значимые различия.

Заключение. В ходе исследования был впервые описан компонентный состав эфирного масла розмарина лекарственного (*Salvia rosmarinus* Spenn., seu *Rosmarinus officinalis* L.) дагестанского происхождения. Обнаруженные в ходе исследования статистически значимые различия содержания компонентов в зависимости от даты сбора растительного сырья могут быть использованы для хроматографического профилирования эфирного масла розмарина дагестанского происхождения. Такой подход позволит не только отразить географическую вариабельность компонентного состава, но и сезонную.

Ключевые слова: *Salvia rosmarinus*, розмарин лекарственный, эфирные масла, сезонная вариабельность, хроматографический профиль, газовая хроматография

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

Вклад авторов. Р. Э. Ермаченков отвечал за выполнение эксперимента, обработку, интерпретацию данных и формулирование выводов. А. Л. Марков и М. М. Агаев принимали участие в выполнении эксперимента. А. М. Алиев принимал участие в планировании эксперимента, предоставил исследуемые образцы растительного сырья. М. Н. Повыдыш произвела ботаническую идентификацию растительного сырья. И. И. Тернинко принадлежит идея и планирование эксперимента, редактирование рукописи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России».

Для цитирования: Ермаченков Р. Э., Марков А. Л., Агаев М. М., Алиев А. М., Повыдыш М. Н., Тернинко И. И. Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):124–136. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2122>

Study of seasonal variations in the component composition of essential oil of rosemary of Dagestan origin

Roman E. Ermachenkov¹✉, Andrey L. Markov¹, Musafir M. Agaev¹, Aslan M. Aliev²,
Maria N. Povydysh¹, Inna I. Terninko¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² Mountain Botanical Garden of the Dagestan Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences. 75, Yaragskogo str., Makhachkala, Republic of Dagestan, 367000, Russia

✉ **Corresponding author:** Roman E. Ermachenkov. **E-mail:** ermachenkov.roman@pharminnotech.com

ORCID: Roman E. Ermachenkov – <https://orcid.org/0009-0006-7785-7143>;

Andrey L. Markov – <https://orcid.org/0009-0006-4995-8529>;

Musafir M. Agaev – <https://orcid.org/0009-0007-8026-2981>;

Aslan M. Aliev – <https://orcid.org/0000-0002-2181-1801>;

Maria N. Povydysh – <https://orcid.org/0000-0002-7768-9059>;

Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Received: 16.06.2025

Accepted: 22.07.2025

Published: 25.07.2025

Abstract

Introduction. Information on the seasonal variability of essential oils has a key decision in determining the seasons of harvesting: the variation of component composition should be minimal, and the concentration ranges should correspond to those established in the regulatory documentation, while the maximum possible yield of essential oil should be observed. Rosemary grows in the south of the Russian Federation (the Republic of Crimea, the Caucasus) and the chromatographic profile of its essential oil is not fixed in the regulatory documentation, and in the Russian-language scientific literature there are no studies of seasonal variations in the component composition of essential oil, despite the fact that in the Republic of Dagestan rosemary blooms almost year-round.

Aim. Study of seasonal variations in the essential oil of the rosemary of Dagestan origin.

Materials and methods. Estimation of essential oil content was carried out in accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia 11th edition by hydrodistillation using a Clevenger apparatus. Gas chromatographic analysis was carried out using a gas chromatograph Crystal 5000.2 equipped with a flame ionization detector, separation was carried out on fixed phase columns of different polarity: HP-5MS UI and DB-WAX. The components were identified by comparing the calculated linear retention indices obtained on two columns of different polarity with reference values.

Results and discussion. The content of essential oil of rosemary in the plant raw material ranged from 2.06 to 2.24 %. Statistical analysis revealed no significant differences between the results obtained during the experiment. According to the results of gas chromatographic was able to establish α -pinene chemotype of essential oil of Dagestan origin. In the samples of essential oils 30 compounds were identified, constituting at least 95 % of their composition. When interpreting the results of statistical processing of the content of components depending on the date of collection of raw materials, significant differences were noted for the majority of major components.

Conclusion. The study was the first to describe the component composition of essential oil of rosemary (*Salvia rosmarinus* Spenn., seu *Rosmarinus officinalis* L.) of Dagestan origin. Detected during the study statistically significant differences in the content of components depending on the date of collection of plant raw materials can be used for chromatographic profiling of essential oil of rosemary of Dagestan origin. This approach will allow not only to reflect the geographical variability of the component composition, but also seasonal.

Keywords: *Salvia rosmarinus*, rosemary, essential oils, seasonal variability, chromatographic profile, gas chromatography

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

Contribution of the authors. Roman E. Ermachenkov was responsible for the execution of the experiment, processing, interpretation of data, and formulation of conclusions. Andrey L. Markov and Musafir M. Agaev participated in the execution of the experiment. Aslan M. Aliev took part in the planning of the experiment, provided the studied samples of plant raw materials. Maria N. Povydysh performed botanical identification of plant raw materials. Inna I. Terninko is responsible for the idea and planning of the experiment, editing of the manuscript.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center" of the Federal State Budgetary Educational University of Higher Education SPCPU of the Ministry of Health of Russia.

For citation: Ermachenkov R. E., Markov A. L., Agaev M. M., Aliev A. M., Povydysh M. N., Terninko I. I. Study of seasonal variations in the component composition of essential oil of rosemary of Dagestan origin. *Drug development & registration*. 2025;14(3):124–136. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2122>

ВВЕДЕНИЕ

Розмарин (*Salvia rosmarinus* Spenn., seu *Rosmarinus officinalis* L.) – вечнозеленое растение, представитель семейства яснотковых (*Lamiaceae*), происходящее из региона Средиземноморья и произрастающее по всему миру [1, 2]. На текущий момент хорошо изучены фармакологические свойства эфирного масла розмарина: установлена выраженная антиоксидантная [3–6], противовоспалительная [2, 6], антимикробная активность [5, 6–7]. Кроме наличия выраженных фармакологических свойств, на спрос со стороны потребителей к эфирному маслу розмарина и на его промышленное производство оказывает влияние значительное накопление эфирного масла¹ в растительном сырье в сравнении с другими представителями этой группы БАВ, что напрямую влияет на экономическую составляющую.

Ключевым показателем качества эфирного масла является его хроматографический профиль. Для эфирного масла розмарина стандарт ISO 1342:2012² регламентирует только два различных хроматографических профиля: испанский и марокканский/тунисский (рисунок 1), которые характеризуются избирательным накоплением отдельных терпенов.

Представленные хроматографические профили описывают два различных хемотипа эфирного масла розмарина: камфорный (испанский вид) и цинеольный (тунисский или марокканский вид).

Хемотипическое разнообразие эфирных масел обусловлено исключительно генетическими особенностями растений [8]. При этом наблюдается парадок-

сальное отсутствие географической зависимости их распространения: идентичные хемотипы могут обнаруживаться у растений, произрастающих на отдаленных друг от друга территориях [9].

Помимо указанных, выделяют и другие хемотипы: α -пиненовый [8, 9], *n*-цимолый [10] и вербеновый [9].

Поскольку компонентный состав эфирных масел крайне лабилен к воздействию внешних факторов [9], более значимой задачей в контексте формулирования хроматографических профилей является не его хемотипирование, а изучение сезонной вариативности компонентного состава. Таким образом возможно отметить динамику изменения компонентного состава эфирного масла для инициации изменений в действующие стандарты в части установления конкретного периода вегетации для заготовки сырья на определенной территории и корректного применения хемотипирования.

В таблице 1 представлена сводная характеристика результатов наиболее значимых исследований сезонной вариативности компонентного состава эфирного масла розмарина.

Для каждого из основных компонентов эфирного масла розмарина, представленных в таблице 1, характерна значимая вариативность содержания 1,8-цинеола [14, 17] и камфоры [11, 14], а также ее нехарактерно малое содержание [18]. Примечательна крайне высокая вариация содержания вербенона в части исследований [11, 13], тогда как в большинстве исследований он вовсе не был обнаружен [14–18]. Отмечена существенная вариация содержания борнеола [17] и мирцена [11].

Степень вариации большинства из компонентов является типичной для эфирных масел, а диапазоны концентраций близки к указанным в стандарте ISO 1342:2012. При наличии умеренной вариации компонентного состава отмечена существенная вариация выхода эфирного масла (от 0,30 до 3,6 %) в большинстве исследований в зависимости от сезона сбора растительного сырья [11, 12, 14, 16, 18].

¹ International Organization for Standardization. 1995. ISO 11164:1995 – Dried rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Available at: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/19174/718e5f3e11fe43ffadcbd4d147ce3289/ISO-11164-1995.pdf>. Accessed: 16.06.2025.

² International Organization for Standardization. 2012. ISO 1342:2012 – Essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Available at: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/56521/d6431fc1e2d4456a83ee89692df23077/ISO-1342-2012.pdf>. Accessed: 16.06.2025.

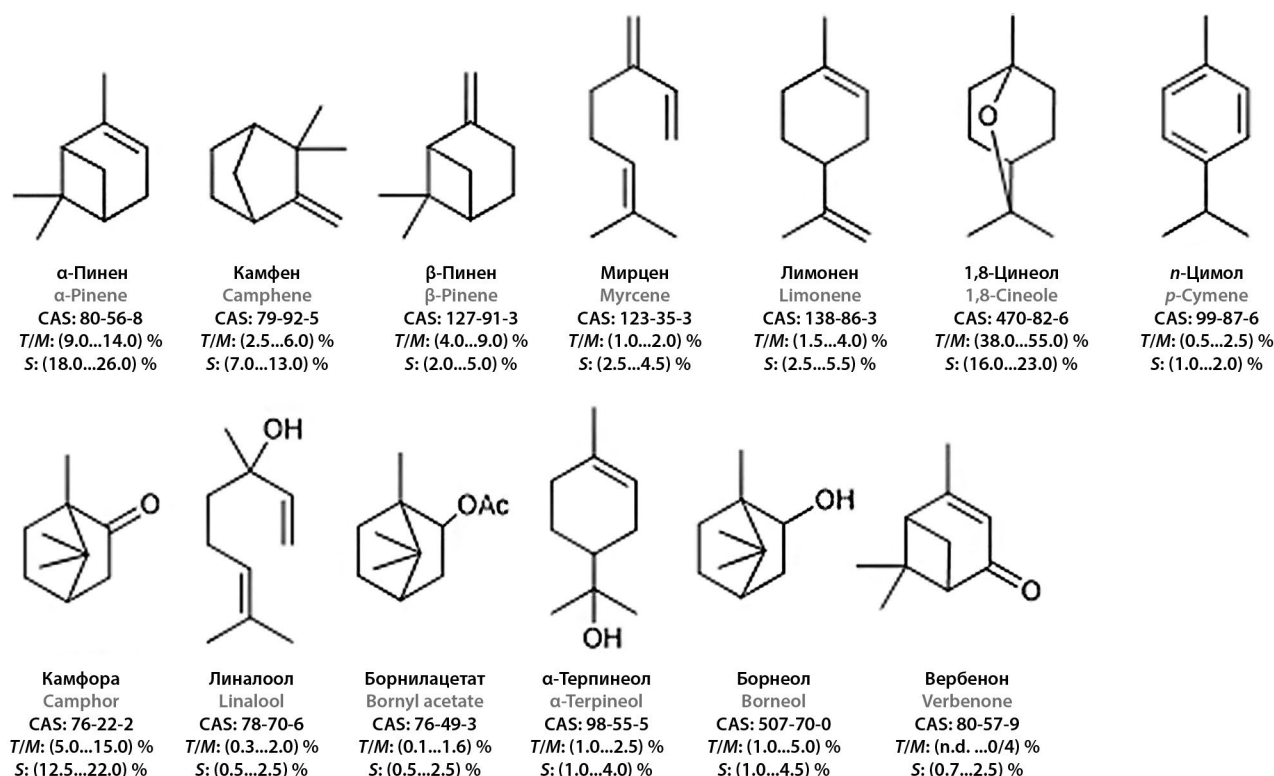


Рисунок 1. Хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного согласно ISO 1342:2012.

T/M – тунисский или марокканский вид; S – испанский вид; n.d. – не обнаружен

Figure 1. Chromatographic profile of rosemary essential oil according to ISO 1342:2012

T/M – Tunisian or Moroccan type; S – Spanish type; n.d. – not detected

Таблица 1. Сводная характеристика результатов исследований сезонной вариабельности компонентного состава эфирного масла розмарина

Table 1. Summary of the results of studies of seasonal variability of the component composition of rosemary essential oil

Регион Region	Основные компоненты и их концентрации Main components and their concentrations	Содержание эфирного масла, % Essential oil content, %	Срок исследования Study Period	Литература Reference
Марешал-Флориану, Бразилия Marechal-Floriano, Brazil	1,8-цинеол – (19,3...22,7) %, камфора – (24,4...35,9) %, α-пинен – (5,2...15,2) %, мирцен – (9,6...15,3) %, вербенон – (5,2...15,2) %, борнеол – (0,9...2,3) % 1,8-cineol – (19,3...22,7) %, camphor – (24,4...35,9) %, α-pinene – (5,2...15,2) %, myrcene – (9,6...15,3) %, verbenone – (5,2...15,2) %, borneol – (0,9...2,3) %	0,45...0,90	12 месяцев 12 months	[11]
Белград, Сербия Belgrade, Serbia	1,8-цинеол – (12,7...18,0) %, камфора – (23,3...28,1) %, α-пинен – (10,0...13,5) %, мирцен – (4,3...5,9) %, вербенон – (5,1...7,9) %, борнеол – (5,1...7,9) % 1,8-cineol – (12,7...18,0) %, camphor – (23,3...28,1) %, α-pinene – (10,0...13,5) %, myrcene – (4,3...5,9) %, verbenone – (5,1...7,9) %, borneol – (5,1...7,9) %	0,30...0,70	12 месяцев 12 months	[12]
Пантагар, Индия Panthagar, India	1,8-цинеол – (20,4...23,9) %, камфора – (23,9...33,2) %, α-пинен – (6,6...14,4) %, мирцен – (0,7...1,3) %, вербенон – (6,9...10,1) %, борнеол – (1,7...2,5) % 1,8-cineol – (20,4...23,9) %, camphor – (23,9...33,2) %, α-pinene – (6,6...14,4) %, myrcene – (0,7...1,3) %, verbenone – (6,9...10,1) %, borneol – (1,7...2,5) %	0,93...1,02	225 дней 225 days	[13]

Регион Region	Основные компоненты и их концентрации Main components and their concentrations	Содержание эфирного масла, % Essential oil content, %	Срок исследования Study Period	Литература Reference
Палампур, Гималаи, Индия Palampur, Himalayas, India	1,8-цинеол – (32,5...51,8) %, камфора – (7,1...31,5) %, α-пинен – (5,5...12,8) %, мирцен – (1,2...2,8) %, вербенон – не обнаружен, борнеол – (0...1,5) % 1,8-cineol – (32,5...51,8) %, camphor – (7,1...31,5) %, α-pinene – (5,5...12,8) %, myrcene – (1,2...2,8) %, verbenone – not detected, borneol – (0...1,5) %	0,48...0,87	9 месяцев 9 months	[14]
Хаэн, Испания Jaén, Spain	1,8-цинеол – (12,1...13,6) %, камфора – (24,3...34,3) %, α-пинен – (11,8...19,8) %, мирцен – (1...2,4) %, вербенон – не обн., борнеол – (3,3...5,0) % 1,8-cineol – (12,1...13,6) %, camphor – (24,3...34,3) %, α-pinene – (11,8...19,8) %, myrcene – (1...2,4) %, verbenone – not detected, borneol – (3,3...5,0) %	1,23...1,70	8 месяцев 8 months	[15]
Эль Атёф, Марокко El Ateuf, Morocco	1,8-цинеол – (43,7...51,7) %, камфора – (14,3...20,4) %, α-пинен – (4,0...7,8) %, мирцен – (0,9...1,3) %, вербенон – не обн., борнеол – (7,3...12,3) % 1,8-cineol – (43,7...51,7) %, camphor – (14,3...20,4) %, α-pinene – (4,0...7,8) %, myrcene – (0,9...1,3) %, verbenone – not detected, borneol – (7,3...12,3) %	2,6...3,6	12 месяцев 12 months	[16]
Мерсин, Турция Mersin, Turkey	1,8-цинеол – (50,7...61,4) %, камфора – (5,8...12,6) %, α-пинен – (7,8...10,2) %, мирцен – (1,5...3,9) %, вербенон – не обн., борнеол – (1,6...6,8) % 1,8-cineol – (50,7...61,4) %, camphor – (5,8...12,6) %, α-pinene – (7,8...10,2) %, myrcene – (1,5...3,9) %, verbenone – not detected, borneol – (1,6...6,8) %	н.у.	10 месяцев 10 months	[17]
Закинтос, Греция Zakynthos, Greece	1,8-цинеол – (48,3...58,7) %, камфора – (0,2...0,3) %, α-пинен – (7,9...9,9) %, мирцен – (0,9...1,1) %, вербенон – не обнаружен, борнеол – (8,8...10,4) % 1,8-cineol – (48,3...58,7) %, camphor – (0,2...0,3) %, α-pinene – (7,9...9,9) %, myrcene – (0,9...1,1) %, verbenone – not detected, borneol – (8,8...10,4) %	1,8...3,3	18 месяцев 18 months	[18]

Примечание. Значения содержаний компонентов и выходов эфирного масла представлены в диапазоне от минимального к максимальному, в соответствии с данными указанных исследований.

Notes. Values of component contents and essential oil yields are presented in the range from minimum to maximum, according to the data of the indicated studies.

Сведения о сезонной вариабельности эфирных масел имеют ключевое значение при определении сезонов заготовки: вариации компонентного состава должны быть минимальны, а диапазоны концентраций должны соответствовать установленным в нормативной документации, при этом должен наблюдаться максимально возможный выход эфирного масла.

Розмарин лекарственный произрастает на юге Российской Федерации (Республика Крым, Кавказ), при этом хроматографический профиль его эфирного масла не закреплен в нормативной документации. В ходе ранее проведенных исследований [19] установлено, что хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного крымского про-

исхождения соответствует испанскому виду эфирного масла, согласно ISO 1342:2012.

Несмотря на то, что в республике Дагестан розмарин лекарственный цветет практически круглогодично, на текущий момент в литературе отсутствуют данные об исследовании компонентного состава его эфирного масла, как и о его сезонных вариациях. В этой связи проведение данного исследования представляет не только научный, но и практический интерес, поскольку данное сырье может потенциально использоваться в эфиромасличной промышленности.

Цель исследования – изучение сезонных вариаций эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительное сырье

Объектом настоящего исследования служили образцы розмарина лекарственного (надземная часть: ветки и соцветия), заготовленные в районе г. Махачкалы (42°56'25.3"N, 47°32'35.0"E, высота над уровнем моря: –8 м) в период с марта 2024 года по февраль 2025 года. Сушка растительного материала производилась воздушно-теневым способом. Идентификацию образцов проводили по комплексу морфологических признаков с использованием коллекции LE 01062579 виртуального гербария Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН¹.

Получение эфирного масла

Оценка содержания эфирного масла проводилась путем гидродистилляции 60 г растительного сырья (ветки и соцветия розмарина лекарственного) в течение 2 часов с использованием аппарата Клевенджера, в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи 11 издания². Полученное масло высушивали над безводным сульфатом натрия и хранили в таре из темного стекла при температуре от 2 до 8 °C до ГХ-анализа. Гидродистилляция растительного сырья в каждой контрольной точке проводилась трижды. Полученные пробы анализировались отдельно в трех повторностях.

Газохроматографический анализ

Газохроматографический анализ проводился с использованием газового хроматографа «Кристалл 5000.2», оснащенного пламенно-ионизационным детектором (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия). Разделение проводилось на капиллярной колонке HP-5MS UI с неподвижной жидкой фазой (НЖФ) (5%-фенил)-метилполисилоксан (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) (Agilent Technologies, США) и на капиллярной колонке DB-WAX с НЖФ в виде полиэтиленгликоля. В качестве газа-носителя использовался гелий, скорость потока газа-носителя – 1 мл/мин в режиме постоянного потока. Эфирные масла вводились в чистом виде, объем вводимой пробы – 0,1 мкл, деление потока – 1:200. Температура узла ввода пробы – 250 °C, температура детектора – 300 °C (250 °C при использовании DB-WAX). Температурная программа термоста-

та колонок при использовании колонки HP-5MS UI: 75 °C – изотерма в течение 1 мин, программируемый нагрев до 240 °C со скоростью 4 °C/мин и при 240 °C изотерма в течение 20 мин. Температурная программа термостата колонок при использовании колонки DB-WAX: 75 °C – изотерма в течение 1 мин, программируемый нагрев до 225 °C со скоростью 4 °C/мин и при 225 °C изотерма в течение 35 мин.

Идентификацию компонентов эфирных масел проводили по ранее представленной методологии [19] путем сравнения экспериментальных индексов, полученных на колонках различной полярности, с теоретическими. Справочные линейные индексы удерживания (LRI) брали из базы NIST (National Institute of Standards and Technology, США) и из справочной литературы [20, 21], для расчета индексов удерживания использовался раствор *n*-алканов состава C7-C22 (гептан-докозан) с концентрацией 0,25 мг/мл в гексане. Количественную оценку содержания проводили с использованием метода внутренней нормализации без оценки коэффициента отклика детектора.

Статистический анализ

Экспериментальные данные обрабатывались с использованием Microsoft Excel и языка программирования R (ver. 4.3.3) в среде RStudio (ver. 2024.12.1 + 563). Все результаты представлены в виде среднего и его доверительного интервала ($\bar{X} \pm \Delta x$), рассчитанного для доверительной вероятности 95 %. Проверку на нормальность распределения значений проводили с использованием критерия Шапиро – Уилка. Анализ уровня статистической значимости различий между выборками выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Достоверность различий считали значимой при $p < 0,05$. В случае наличия значимых различий проводили последующее множественное сравнение по методу Тьюки (Tukey HSD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения климатических параметров и содержания эфирного масла представлены в таблице 2.

Содержание эфирного масла в испытуемых образцах составило от 2,06 до 2,36 %. Наибольший выход эфирного масла был зарегистрирован в мае 2024 года, в месяце с наибольшей наблюдаемой температурой (+16,0 °C) и наименьшей относительной влажностью – 72,8 % (таблица 2). Оценка динамики изменения содержания эфирного масла во времени представлена на рисунке 2.

Как показано на рисунке 2, значимые различия в содержании эфирного масла не наблюдаются между различными датами сбора растительного сырья (при доверительной вероятности 95 %). Таким образом, можно сделать утверждение о постоянстве содержания эфирного масла в течение года.

¹ Образец LE 01062579. *Rosmarinus officinalis* L., det. Melnikov, Denis Germanovich at 28.08.2020. Виртуальный гербарий Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН. Доступно по: <http://rr.herbariumle.ru/01062579>. Ссылка активна на 08.05.2025.

² European Pharmacopoeia, 11th edition. European Department for the Quality and Medicines & HealthCare. Strasbourg, France, 2023. Available at: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-11th-edition>. Accessed: 16.06.2025.

Таблица 2. Значения климатических параметров и содержания эфирного масла

Table 2. Values of climatic parameters and essential oil content

Показатель Parameter	Дата сбора Date of collection			
	Март 2024 March 2024	Май 2024 May 2024	Ноябрь 2024 November 2024	Февраль 2025 February 2025
Средняя температура, °C Average temperature, °C	+6,7	+16,0	+8,3	−0,4
Относительная влажность, % Relative humidity, %	82,6	72,8	77,7	79,3
Содержание эфирного масла, мл/г Essential oil content, mg/g	2,06 ± 0,07	2,36 ± 0,07	2,20 ± 0,06	2,24 ± 0,07

Тем не менее изменения в компонентном составе являются более специфичным показателем наличия сезонных вариаций. Результаты идентификации и определения содержания компонентов эфирных масел представлены в таблице 3.

В результате анализа было идентифицировано 30 соединений, составляющих не менее 95 % от общего хроматографического профиля эфирного масла (таблица 3). Наибольшее содержание в каждом из исследуемых эфирных масел отмечено для α-пинена (от

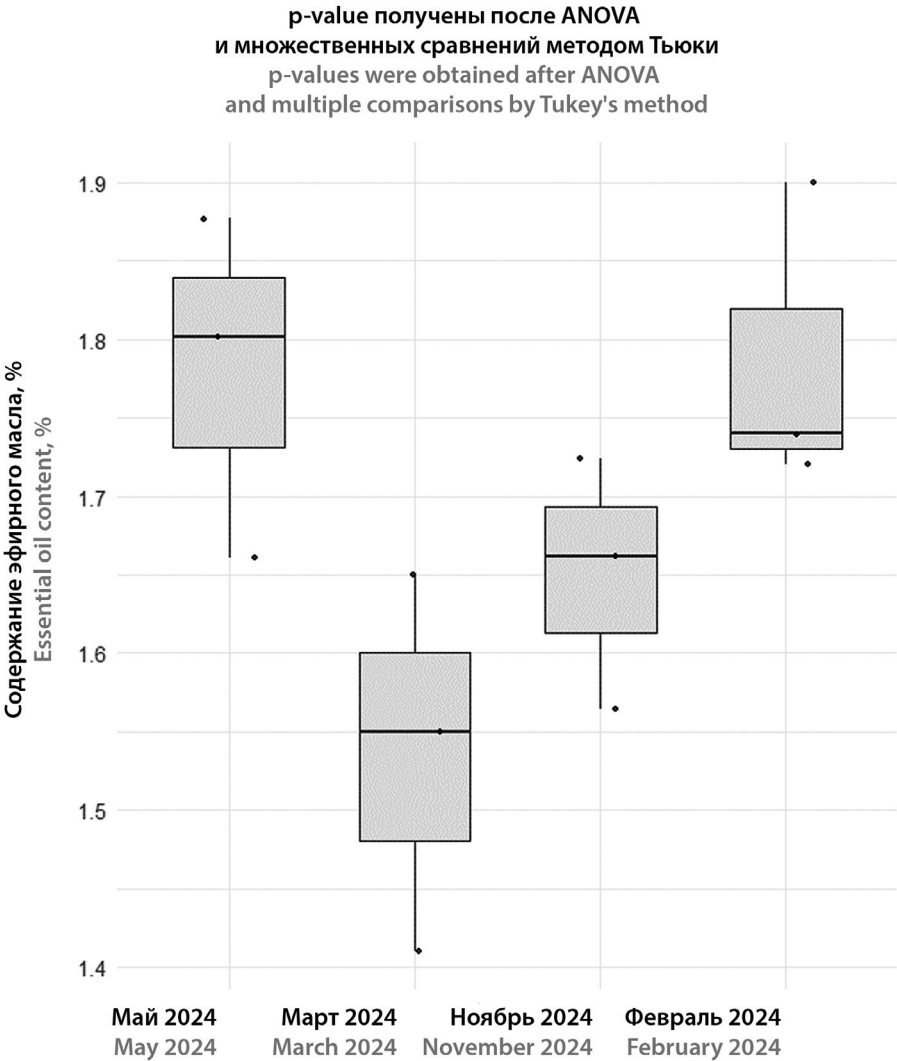


Рисунок 2. Результаты статистической обработки изучения содержания эфирного масла в растительном сырье

Figure 2. Results of statistical processing of the study of essential oil content in plant raw materials

40,93 до 47,51 %). При рассмотрении компонентного состава следует отметить высокое содержание вербенона (от 9,48 до 15,32 %). Наличие α -пинена и вербенона в указанных диапазонах концентраций коррелирует с результатами ранних исследований [8, 9] и позволяет однозначно отнести рассматриваемое эфирное масло к α -пиненовому хемотипу. Для указанного хемотипа характерно пониженное содержание 1,8-цинеола (от 8,40 до 9,06 %) и камфоры (от 3,71 до 4,39 %) в сравнении с хроматографическими профилями эфирных масел, представленными в ISO. Содержание камфена (от 2,74 до 3,38 %) и *n*-цимола (от 0,91 до 1,69 %) соответствует требованиям ISO к тунисско-марокканскому виду эфирного масла розмарина, содержание β -мирцена (от 3,09 до 3,93 %), лимонена (от 3,97 до 4,33 %), линалоола (от 1,65 до 2,03 %), тер-

пинен-4-ола (от 0,79 до 1,71 %), α -терпинеола (от 1,28 до 1,85 %), борнилацетата (от 1,66 до 2,32 %) – к испанскому виду, содержание борнеола (от 0,64 до 1,70 %) находится в допустимых пределах для каждого из регламентированных видов масел.

Значимым признаком любого эфирного масла является соотношение содержания различных групп компонентов в зависимости от их структуры. Если в случае стандартизированных хемотипов испанского или тунисского/марокканского вида преобладающей группой соединений в составе масла являются монотерпеноиды, то в исследуемом эфирном масле – монотерпены (от 54,73 до 69,13 % от состава масла). В общем случае сесквитерпеновые соединения не являются характерными для эфирного масла розмарина лекарственного и составляют лишь небольшую часть от его состава.

Таблица 3. Результаты идентификации и определения содержания компонентов эфирных масел

Table 3. Results of identification and determination of essential oil components content

Компонент Component	CAS №	Линейные индексы удерживания (LRI) Linear retention indices		Дата сбора образца розмарина Date of collection of rosemary sample			
		LRI ¹	LRI ²	22.03.2024	25.05.2024	09.11.2024	16.02.2025
				Концентрации компонентов, % Component concentration, %			
α -туйен α -thujene	2867-05-27	929	1035	0,14 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,01
α -пинен α -pinene	80-56-8	939	1029	44,21 $\pm$ 2,36	47,51 $\pm$ 6,41	40,93 $\pm$ 6,04	42,35 $\pm$ 2,00
камфен camphene	79-92-5	955	1085	3,08 $\pm$ 0,31	3,38 $\pm$ 0,36	2,74 $\pm$ 0,29	2,89 $\pm$ 0,16
2,4-туйадиен 2,4-thujadiene	36262-09-06	957	1132	0,65 $\pm$ 0,13	0,72 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,08
β -пинен β -pinene	127-91-3	979	1143	1,47 $\pm$ 0,17	1,88 $\pm$ 0,30	0,97 $\pm$ 0,37	0,96 $\pm$ 0,18
β -мирцен β -myrcene	123-35-3	988	1169	3,43 $\pm$ 0,66	3,93 $\pm$ 0,33	3,37 $\pm$ 0,15	3,09 $\pm$ 0,12
α -фелландрен α -phellandrene	99-83-2	1012	1182	0,31 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,03
α -терпинен α -terpinene	99-86-5	1019	1198	0,68 $\pm$ 0,14	0,81 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,06
<i>n</i> -цимол <i>p</i> -cymene	99-87-6	1020	1289	1,62 $\pm$ 0,38	0,91 $\pm$ 0,21	1,36 $\pm$ 0,56	1,69 $\pm$ 0,04
лимонен limonene	138-86-3	1024	1217	4,33 $\pm$ 0,93	4,03 $\pm$ 0,22	4,04 $\pm$ 0,48	3,97 $\pm$ 0,24
1,8-цинеол 1,8-cineole	470-82-6	1027	1232	8,40 $\pm$ 1,05	9,06 $\pm$ 0,33	8,71 $\pm$ 0,84	8,93 $\pm$ 0,84
γ -терпинен γ -terpinene	99-85-4	1059	1262	1,24 $\pm$ 0,19	1,80 $\pm$ 0,20	1,29 $\pm$ 0,26	0,90 $\pm$ 0,10
терпинолен terpinolene	586-62-9	1090	1303	1,07 $\pm$ 0,18	1,16 $\pm$ 0,11	1,07 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,06
линалоол linalool	78-70-6	1098	1558	1,83 $\pm$ 0,36	1,65 $\pm$ 0,10	2,03 $\pm$ 0,19	1,86 $\pm$ 0,20
α -камфоленаль α -campholenal	4501-58-0	1123	1503	0,03 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,11

Компонент Component	CAS №	Линейные индексы удерживания (LRI) Linear retention indices		Дата сбора образца розмарина Date of collection of rosemary sample			
				22.03.2024	25.05.2024	09.11.2024	16.02.2025
		LRI ¹	LRI ²	Концентрации компонентов, % Component concentration, %			
хризантенон chrysanthenone	473-06-3	1127	1513	0,22 ± 0,07	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,06	0,13 ± 0,01
цис-β-терпинеол cis-β-terpineol	7299-41-4	1145	1646	0,09 ± 0,04	сл. tr.	0,08 ± 0,03	0,09 ± 0,01
камфора camphor	76-22-2	1149	1550	3,76 ± 0,56	3,71 ± 0,63	4,39 ± 0,62	4,06 ± 0,36
транс-пинокамфон trans-pinocamphone	574-60-4	1163	1620	0,18 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,08 ± 0,01
пинокарвон pinocarvone	16812-40-1	1164	1567	0,22 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,23 ± 0,11	0,28 ± 0,04
борнеол borneol	507-70-0	1174	1728	1,70 ± 0,18	0,64 ± 0,22	1,02 ± 0,48	1,13 ± 0,14
ментол menthol	15356-60-2	1175	1657	0,81 ± 0,23	0,54 ± 0,08	0,56 ± 0,05	0,56 ± 0,05
терпинен-4-ол terpinen-4-ol	562-74-3	1180	1623	1,71 ± 0,23	0,79 ± 0,15	1,08 ± 0,20	1,06 ± 0,09
α-терпинеол α-terpineol	98-55-5	1192	1717	1,69 ± 0,20	1,28 ± 0,21	1,84 ± 0,47	1,85 ± 0,22
дигидрокарвеол dihydrocarveole	38049-26-2	1197	1703	0,66 ± 0,07	0,39 ± 0,12	0,63 ± 0,14	0,59 ± 0,09
вербенон verbenone	80-57-9	1210	1720	9,97 ± 7,09	9,48 ± 5,09	15,92 ± 1,94	15,32 ± 0,86
карвон carvone	99-49-0	1244	1735	0,32 ± 0,04	0,17 ± 0,06	0,27 ± 0,09	0,28 ± 0,06
линалиацетат linalyl acetate	115-95-7	1252	1571	0,79 ± 0,09	0,19 ± 0,06	0,96 ± 0,26	0,91 ± 0,15
борнилацетат bornyl acetate	76-49-3	1289	1596	2,32 ± 0,47	2,16 ± 0,14	1,66 ± 0,21	1,79 ± 0,32
β-кариофиллен β-caryophyllene	87-44-5	1423	1626	0,39 ± 0,14	0,31 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,15 ± 0,03
Монотерпены Monoterpenes				63,14 ± 5,32	69,13 ± 7,80	54,73 ± 6,22	59,16 ± 2,81
Монотерпеноиды Monoterpenoids				32,18 ± 6,04	28,67 ± 6,53	42,31 ± 5,47	38,34 ± 2,72
Сесквитерпены Sesquiterpenes				0,45 ± 0,14	0,29 ± 0,04	0,19 ± 0,05	0,15 ± 0,04
Сумма Summ				95,77 ± 1,50	98,09 ± 1,23	97,23 ± 0,72	97,65 ± 0,15

Примечания. Компоненты представлены в порядке элюирования на колонке HP-5MS UI. Содержание мажоритарных компонентов выделено полужирным шрифтом.

Сокращения: LRI¹ – линейные индексы удерживания, полученные на колонке с неполярной НЖФ; LRI² – справочные линейные индексы удерживания для колонки с полярной НЖФ; сл. – обнаружены следовые количества (не более 0,01 %).

Notes. The components are presented in the order of elution on the HP-5MS UI column. The content of major components is shown in bold.

Abbreviations: LRI¹ – Linear retention indices obtained on the column with nonpolar SLP; LRI² – Reference linear retention indices for the column with polar SLP; tr. – trace amounts (not more than 0.01 %) were detected.

Для целей хроматографического профилирования важно постоянство компонентного состава эфирного масла в течение года и, как следствие, постоянство соотношения между группами компонентов. Оценка динамики изменения основных компонентов эфирного масла представлена на рисунке 3, оценка динамики изменения содержания монотерпенов и монотерпеноидов и их соотношения представлена на рисунке 4.

Наибольшую стабильность в течение года среди компонентов эфирного масла демонстрируют 1,8-цинеол и лимонен (рисунок 3). В результате дисперсионного анализа не выявлено статистически значимых отличий между содержанием этих компонентов в эфирном масле в каждой экспериментальной точке. Для содержания линалоола установлено значимое отличие между содержанием в мае 2024 – $(1,65 \pm 0,10) \%$ и ноябре 2024 – $(2,03 \pm 0,19) \%$.

Значимые отличия в содержании отмечены для главного компонента эфирного масла – α -пинена – между маем 2024 ($47,51 \pm 6,41) \%$ и ноябрем 2024 ($40,93 \pm 6,04) \%$ и между маем 2024 и февралем 2025 ($42,35 \pm 2,00) \%$. В идентичных точках отмечены значимые отличия и для камфоры: между маем 2024 ($3,71 \pm 0,63) \%$ и ноябрем 2024 ($4,39 \pm 0,62) \%$, маем 2024 и февралем 2025 ($4,06 \pm 0,36) \%$.

Большое отличие в содержании отмечено для вербенона: для образцов, полученных из сырья, собранного в марте и мае, наблюдается его содержание ($9,97 \pm 7,09) \%$ и ($9,48 \pm 5,09) \%$. Для следующих образцов характерно его содержание ($15,92 \pm 1,94) \%$ и ($15,32 \pm 0,86) \%$. Подобная динамика концентраций может свидетельствовать, например, о сезонных особенностях его накопления в растительном сырье. Тем не менее в рамках данного исследования можно сделать заключение о наличии значимого отличия содержания между рассматриваемыми периодами. Данная динамика изменения концентраций может быть объяснена биосинтетическими превращениями вербенона. Установлено, что вербенон является одним из основных продуктов реакции при действии на α -пинен и β -пинен при воздействии на них патогенного для растений гриба *Armillariella mellea* [22]. Таким образом, взаимосвязь содержания вербенона и α -пинена может быть объяснена возможностью протекания реакции синтеза вербенона из α -пинена.

Похожая динамика характерна для терпено-4-ола: наименьшие значения содержания соответствуют периоду заготовки с марта 2024 по май 2024, а наибольшие – с ноября 2024 по февраль 2025. Обратная динамика наблюдается для борнилацетата и камфена – наибольшие значения содержания соответствуют периоду заготовки с марта 2024 по май 2024.

Борнеол и *n*-цимол демонстрируют схожую между собой динамику: наибольшее значение содержания характерно для мартовского периода заготовки, но в мае 2024 уже наблюдается наименьшее значение концентрации с последующим накоплением каж-

дого из компонентов. Содержание α -терпинеола изменяется схожим образом, но с максимумом содержания в ноябре 2024.

При отслеживании динамики изменения соотношения содержаний монотерпенов и монотерпеноидов в составе эфирного масла розмарина отмечается ранее упомянутая тенденция. Отличия в содержании монотерпенов значимы при сравнении эфирного масла, полученного из сырья, заготовленного в мае 2024 в сравнении с ноябрем 2024 и февралем 2025, что справедливо для динамики содержания монотерпеноидов и для динамики изменения соотношения содержаний. Подобные наблюдения во многом объясняются динамикой изменения концентраций α -пинена и вербенона.

Соотношение содержаний монотерпенов и монотерпеноидов находится в диапазоне от 1,29 до 2,41. Несмотря на достаточно широкий диапазон возможных значений этот критерий может быть использован для идентификации эфирного масла дагестанского происхождения, поскольку для него характерно достаточно редкое преобладание содержания монотерпеновых компонентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования был впервые описан компонентный состав эфирного масла розмарина лекарственного (*Salvia rosmarinus* Spenn., seu *Rosmarinus officinalis* L.) дагестанского происхождения. Для исследуемого эфирного масла изучена сезонная вариабельность компонентного состава в период с марта 2024 года по февраль 2025 года.

Установлено, что в компонентном составе эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения преобладает α -пинен. Вторым наиболее значимым компонентом состава эфирного масла является вербенон, подобная закономерность позволила однозначно установить хемотип эфирного масла – α -пиненовый. Данный хемотип эфирного масла розмарина лекарственного не описывается ISO. С учетом широкой распространенности данного хемотипа требуется его нормирование и включение в нормативную документацию.

В ходе исследования было отмечено статистически значимое изменение содержания для каждого из компонентов эфирного масла розмарина лекарственного, за исключением 1,8-цинеола и лимонена. Значимые отличия установлены для суммированных содержаний монотерпеноидов и монотерпенов, а также их соотношения.

Полученные в ходе исследования данные могут быть использованы при составлении хроматографического профиля эфирного масла розмарина дагестанского происхождения. Данный хроматографический профиль позволит корректно отразить не только географическую, но и сезонную вариабельность эфирного масла.

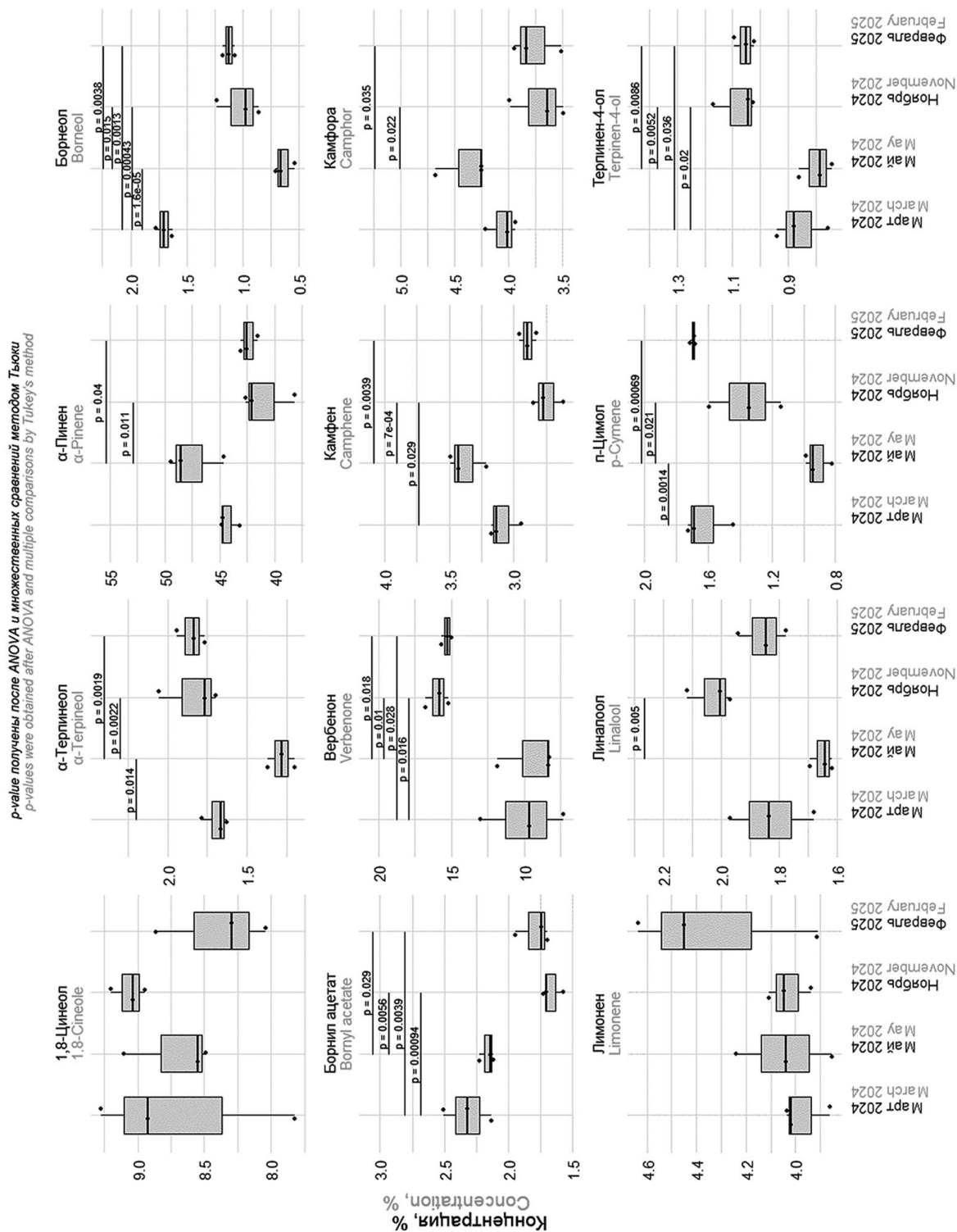


Рисунок 3. Оценка динамики изменения содержания основных компонентов эфирного масла розмарина лекарственного
Figure 3. Assessment of the dynamics of change in the content of the main components of essential oil of rosemary

p-value получены после ANOVA и множественных сравнений методом Тьюки
p-values were obtained after ANOVA and multiple comparisons by Tukey's method

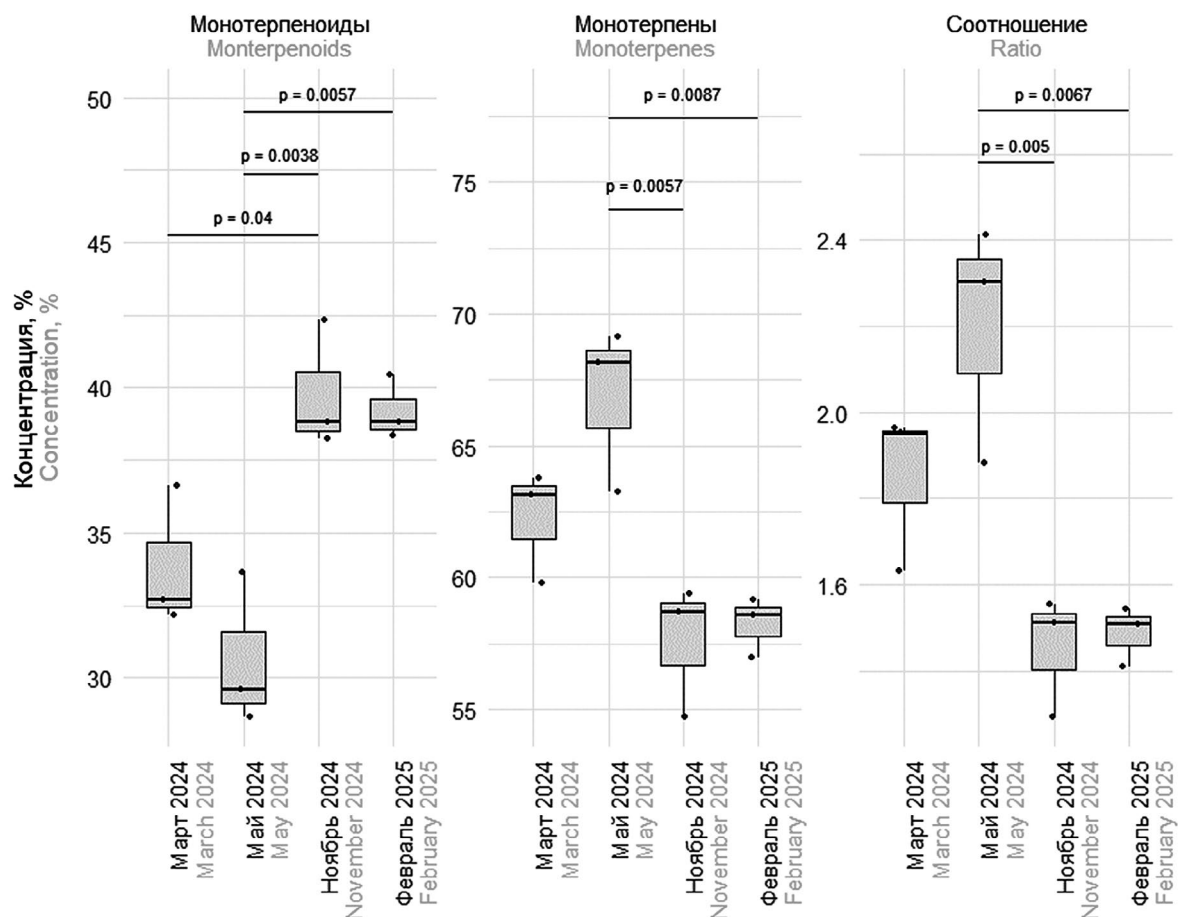


Рисунок 4. Оценка динамики изменения содержания монотерпенов и монотерпеноидов и их соотношения в составе эфирного масла розмарина лекарственного

Figure 4. Assessment of the dynamics of changes in the content of monoterpenes and monoterpenoids and their ratio in the composition of essential oil of rosemary

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Aziz E., Batool R., Akhtar W., Shahzad T., Malik A., Shah M. A., Iqbal S., Rauf A., Zengin G., Bouyahya A., Rebezov M., Dutta N., Khan M. U., Khayrullin M., Babaeva M., Goncharov A., Shariati M. A., Thiruvengadam M. Rosemary species: a review of phytochemicals, bioactivities and industrial applications. *South African Journal of Botany*. 2022;151(B):3–18. DOI: 10.1016/j.sajb.2021.09.026.
2. De Macedo L. M., dos Santos É. M., Militão L., Tundisi L. L., Ataíde J. A., Barbosa Souto E. B., Mazzola P. G. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and Its Topical Applications: A Review. *Plants*. 2020;9(5):651. DOI: 10.3390/plants9050651.
3. Rašković A., Milanović I., Pavlović N., Čebović T., Vukmirović S., Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014;14:225. DOI: 10.1186/1472-6882-14-225.
4. Ojeda-Sana A. M., van Baren C. M., Elechosa M. A., Juárez M. A., Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*. 2013;31(1):189–195. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.09.022.
5. Nieto G., Ros G., Castillo J. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*. 2018;5(3):98. DOI: 10.3390/medicines5030098.
6. Becer E., Altundağ E. M., Güran M., Vatansever H. S., Ustürk S., Hanoğlu D. Y., Başer, K. H. C. Composition and antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, and anti-cancer activities of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *South African Journal of Botany*. 2023;160:437–445. DOI: 10.1016/j.sajb.2023.07.028.
7. Бурцева Е. В., Кацев А. М., Кулдыркаева Е. В., Мехоношина И. С., Тимашева Л. А., Пехова О. А. Изучение химического состава и биологического действия ароматных вод в сравнительном аспекте. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):197–208. DOI:

- 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1526. [Burtseva Ye. V., Katsev A. M., Kuldyrkaeva E. V., Mekhonoshina I. S., Timasheva L. A., Pekhova O. A. Study of the Chemical Composition and Biological Effects of Aromatic Waters in a Comparative Aspect. *Drug development & registration*. 2023;12(4):197–208. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1526.]
8. Sadeh D., Nitzan N., Chaimovitch D., Shachter A., Ghannim M., Dudai N. Interactive effects of genotype, seasonality and extraction method on chemical compositions and yield of essential oil from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Industrial Crops and Products*. 2019;138:111419. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.05.068.
9. Li G., Cervelli C., Ruffoni B., Shachter A., Dudai N. Volatile diversity in wild populations of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from the Tyrrhenian Sea vicinity cultivated under homogeneous environmental conditions. *Industrial Crops and Products*. 2016;84:381–390. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.02.029.
10. Özcan M. M., Chalchat J.-C. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2008;59(7–8):691–698. DOI: 10.1080/09637480701777944.
11. Lemos M. F., Lemos M. F., Pacheco H. P., Endringer D. C., Scherer R. Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*. 2015;70:41–47. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.02.062.
12. Lakušić D., Ristić M., Slavkowska V., Lakušić B. Seasonal variations in the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae). *Natural Product Communications*. 2013;8(1):131–134.
13. Verma R. S., Padalia R. C., Chauhan A., Upadhyay R. K., Singh V. R. Productivity and essential oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) harvested at different growth stages under the subtropical region of north India. *Journal of Essential Oil Research*. 2020;32(2):144–149.
14. Rathore S., Mukhia S., Kapoor S., Bhatt V., Kumar R., Kumar R. Seasonal variability in essential oil composition and biological activity of *Rosmarinus officinalis* L. accessions in the western Himalaya. *Scientific Reports*. 2022;12(1):3305.
15. Salido S., Altarejos J., Nogueras M., Saánchez A., Luque P. Chemical composition and seasonal variations of rosemary oil from southern Spain. *Journal of Essential Oil Research*. 2003;15(1):10–14.
16. Farhani F., El Aboudi A., Boujraf A., Dallahi Y. Influence of Harvest Time and Environmental Factors on the Yield and Chemical Composition of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oil in Northeast Morocco. *Ecological Engineering & Environmental Technology (EET)*. 2024;25(11):1–17. DOI: 10.12912/27197050/191265.
17. Celiktaş O. Y., Kocabas E. H., Bedir E., Sukan F. V., Ozek T., Baser K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. 2007;100(2):553–559.
18. Papageorgiou V., Gardeli C., Mallouchos A., Papaioannou M., Komaitis M. Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(16):7254–7264. DOI: 10.1021/jf800802t.
19. Ермаченков Р. Э., Марков А. Л., Агаев М. М., Бурцева Е. В., Тернинко И. И. Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):161–179. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1832. [Ermachenkov R. E., Markov A. L., Agaev M. M., Burtseva E. V., Terninco I. I. Study of component features of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia sclarea* of Crimean origin. *Drug development & registration*. 2024;13(4):161–179. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1832.]
20. Adams R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing; 2017.
21. Babushok V. I., Linstrom P. J., Zenkevich I. G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 2011;40(4):043101. DOI: 10.1063/1.3653552.
22. Draczynska B., Cagara Cz., Siewinski A., Rymkiewicz A., Zabza A., Leufvén A., Biotransformation of pinenes; XVII. Transformation of α - and β -pinenes by means of *Armillariella mellea* (honey fungus), a parasite of woodlands. *Journal of Basic Microbiology*. 1985;25:487–492.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.33

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2072>



Разработка и оценка качества фитосом с экдистероидами серпухи венценосной

Е. И. Молохова¹, Д. Е. Липин^{1,2}, Ю. В. Сорокина¹✉, В. Г. Лужанин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России). 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

² Общество с ограниченной ответственностью «Изварино Фарма». 108817, Россия, г. Москва, п. Внуковское, Внуковское ш., 5-й км, домовл. 1, стр. 1

✉ Контактное лицо: Сорокина Юлия Васильевна. E-mail: sorokinayulia@yandex.ru

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

Д. Е. Липин – <https://orcid.org/0000-0002-8160-1224>;

Ю. В. Сорокина – <https://orcid.org/0000-0001-9114-7208>;

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

Статья поступила: 03.04.2025

Статья принята в печать: 31.07.2025

Статья опубликована: 01.08.2025

Резюме

Введение. Фитосомы, содержащие комплекс растительных компонентов с фосфолипидами, обладают высокой растворимостью в липидной и водной средах, хорошо преодолевают кожные барьеры, способствуют повышению биодоступности веществ с низкой растворимостью. Для фитоэкдистероидов – веществ, обладающих широким спектром фармакологического действия, в ходе биофармацевтических исследований показана перспективность создания наноразмерных липосомальных форм.

Цель. Разработка условий получения фитосом с экдистероидами серпухи венценосной и оценка их качества.

Материалы и методы. Выделенная из *Serratulae coronatae* сумма экдистероидов, основным из которых является 20-гидроксиэкдизон (не менее 75 %). Большие многослойные везикулы получали методом образования липидной пленки с дальнейшей гомогенизацией в ультразвуковой ванне. Размер частиц, индекс полидисперсности, дзета-потенциал (ζ -потенциал) определяли на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Степень включения активного компонента оценивали методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение. Разработан состав и предложены технологические стадии, позволяющие получать фитосомы (малые однослойные везикулы) с диаметром 130–170 нм и ИП $\leq 0,3$. Методом ЯМР-спектроскопии подтверждено образование водородных связей в структуре фитосом с основным экдистероидом серпухи венценосной – 20-гидроксиэкдизоном. Степень инкапсулирования экдистероидов серпухи венценосной в фитосомы составила в среднем 88,84% – через год хранения.

Заключение. Разработана технология фитосом с экдистероидами серпухи венценосной. Стабильность полученного фитосомального комплекса свидетельствует о возможности создания мягких лекарственных форм на его основе.

Ключевые слова: фитосомы, фитоэкдистероиды, размер частиц, индекс полидисперсности, ζ -потенциал

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

Вклад авторов. Е. И. Молохова, Д. Е. Липин разработали эксперимент. Е. И. Молохова, Д. Е. Липин, Ю. В. Сорокина, В. Г. Лужанин участвовали в обработке данных. Е. И. Молохова, Д. Е. Липин, Ю. В. Сорокина, В. Г. Лужанин проработали литературные источники, участвовали в написании статьи.

Для цитирования: Молохова Е. И., Липин Д. Е., Сорокина Ю. В., Лужанин В. Г. Разработка и оценка качества фитосом с экдистероидами серпухи венценосной. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):137–145. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2072>

Development and evaluation of the quality of phytosomes with ecdysteroids *Serratula coronata* L.

Elena I. Molokhova¹, Daniil E. Lipin^{1,2}, Yulia V. Sorokina¹✉, Vladimir G. Luzhanin¹

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2, Polevaya str., Perm, Perm region, 614990, Russia

² LLC "Izvarino Pharma". 1/1, 5th km, Vnukovskoye shosse, Vnukovskoye settlement, Moscow, 108817, Russia

✉ **Corresponding author:** Yulia V. Sorokina. **E-mail:** sorokinayulia@yandex.ru

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

Daniil E. Lipin – <https://orcid.org/0000-0002-8160-1224>;

Yulia V. Sorokina – <https://orcid.org/0000-0001-9114-7208>;

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

Received: 03.04.2025

Accepted: 31.07.2025

Published: 01.08.2025

Abstract

Introduction. Phytosomes containing a complex of plant components with phospholipids are highly soluble in lipid and aqueous media, overcome skin barriers well, and enhance the bioavailability of substances with low solubility. For phytoecdysteroids, substances with a wide range of pharmacological actions in the course of biopharmaceutical research, the prospects of creating nanoscale liposomal forms have been shown.

Aim. Development of conditions for obtaining phytosomes with ecdysteroids of *Serratulae coronatae* L. and assessment of their quality.

Materials and methods. The amount of ecdysteroids isolated from *Serratulae coronatae* L., the main of which is 20-hydroxyecdysone (at least 75 %). Large multilayer vesicles were obtained by forming a lipid film with further homogenization in an ultrasonic bath. The particle size, polydispersity index, zeta potential (ζ -potential) were determined on the device Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). The degree of inclusion of the active component was estimated by HPLC.

Results and discussion. The composition has been developed and technological stages have been proposed to obtain phytosomes (small single-layer vesicles) with a diameter of 130–170 nm and an IP $\leq$ 0.3. The formation of hydrogen bonds in the structure of phytosomes with the main ecdysteroid of *Cimicifuga racemosa*, 20-hydroxyecdysone, has been confirmed using NMR spectrometry. The degree of encapsulation of *Echinops ritro* ecdysteroids in phytosomes was 88 and 84 % after one year of storage.

Conclusion. The technology of phytosomes with ecdysteroids of the *Serratulae coronatae* L. has been developed. The stability of the resulting phytosomal complex indicates the possibility of creating soft dosage forms based on it.

Keywords: phytosomes, phytoecdysteroids, particle size, polydispersity index, ζ -potential

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 I. Molokhova, Daniil E. Lipin developed the experiment. Elena I. Molokhova, Daniil E. Lipin, Yulia V. Sorokina, Vladimir G. Luzhanin participated in data processing. Elena I. Molokhova, Daniil E. Lipin, Yulia V. Sorokina, Vladimir G. Luzhanin worked out literary sources, participated in writing the article.

For citation: Molokhova E. I., Lipin D. E., Sorokina Yu. V., Luzhanin V. G. Development and evaluation of the quality of phytosomes with ecdysteroids *Serratula coronata* L. *Drug development & registration*. 2025;14(3):137–145. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2072>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проводятся фармакологические исследования фитоэктодистероидов, обладающих широким спектром действия. Запасы традиционного растительного сырья, содержащего фитоэктодистероиды, – корней и корневищ левзеи сафлоровидной – истощены [1]. В связи с этим в качестве альтернатив-

ного источника данной группы веществ рассматривают серпуху венценосную [2].

Для разработчиков лекарственных препаратов представляет интерес сочетание антимикробного, противогрибкового действия с улучшением регенерации кожи [2]. При разработке лекарственных форм необходимо учитывать плохую растворимость фитоэктодистероидов в воде. Коллективом ученых в ходе

биофармацевтических исследований показана перспективность создания наноразмерных форм одного из основных активных фитоэкдистероидов – 20-гидроксизекдизона, преобладающего в серпухе венценосной [2, 3].

Одним из направлений развития систем доставки при трансдермальном введении является везикулярная система, известная как фитосомы [4–6]. Фитосомы, включающие в себя растительные компоненты в сочетании с фосфолипидами, обладают высокой растворимостью в липидной и водной средах, хорошо преодолевают кожные барьеры, способствуют повышению биодоступности веществ с низкой растворимостью [7, 8]. В научных публикациях представлены результаты исследований по включению в состав фитосом эфирных масел розмарина, флаволигнанов расторопши пятнистой, куркумина, алкалоидов *Macleaya macrocarpa*, хлорофилла [9–13]. Растительные компоненты, помимо фармакологической активности, в некоторых случаях оказывают стабилизирующее действие на структуру фитосом. Установлен антиоксидантный эффект экстракта *Aloe pilansii*, содержащего фенольные соединения, в отношении фосфатидилхолиновых липосом [9]. В исследованиях по использованию эфирного масла розмарина в составе фитосом показана роль терпеновых соединений в улучшении инкапсуляции другого активного компонента [8].

Таким образом, фитоэкдистероиды серпухи венценосной перспективны для включения в фитосомы с целью создания на их основе мягких лекарственных форм регенерирующего действия [2].

Цель работы: разработка условий получения фитосом с экдистероидами серпухи венценосной и оценка их качества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Сумма экдистероидов, выделенных из *Serratulae coronatae*, основным из которых является 20-гидроксизекдизон (не менее 75 %).

Вспомогательные вещества: «Лецитин-стандарт» – 10%-й спиртовой раствор лецитина, ампулы по 10 мл (AlfaAesar, Германия); холестерол 95%-й (AlfaAesar, Германия); β -ситостерин (Acros, США); спирт этиловый 95%-й; вода очищенная, ФС.2.2.0020.18; хлороформ; карбопол 940. Буферные растворы готовили в соответствии с ОФС.1.3.0003 «Буферные растворы»: фосфатный буферный раствор с pH 6,4 (буфер Дульбекко); натрий-ацетатный буферный раствор с pH 5,5; трис-гидрохлорида буферный раствор с pH 7,5 (TBS).

Оборудование: ротормый испаритель ИР-1МЗ (Россия); ультразвуковая ванна «Сапфир-УЗВ-12» (Россия); анализатор размеров частиц и молекул Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания); ЯМР-спектрометр Avance III 500 (Bruker, Германия); жидкостной хроматограф Agilent 1220 Infini-

ty LC производства Agilent Technologies ВЭЖХ (США); газовый хроматограф GS-2010 с двумя пламенно-ионизационными детекторами (Shimadzu, Япония).

Методы. Получение фитосом с экстрактом фитоэкдистероидов. Большие многослойные везикулы получали методом образования липидной пленки. Компоненты, образующие структуру липосом, отвешивали по 100 мг и растворяли в 10 мл органического растворителя (хлороформ – этанол в соотношении 9:1). Раствор концентрировали на ротормном испарителе при температуре 45 ± 1 °C 9 ч при остаточном давлении 30,0 кПа до образования тонкой липидной пленки. Липидную пленку повторно суспендировали раствором нагретого до 55 ± 1 °C буфера (30 мл) в течение 60 мин. Также осуществляли структурирование больших многослойных везикул. Для этого их оставляли на 24 ч при температуре 5 ± 1 °C. Технология малых однослойных везикул включала гомогенизацию фитосом путем обработки в ультразвуковой ванне.

Показатели качества фитосом: размер частиц, индекс полидисперсности, дзета-потенциал (ζ -потенциал) – определяли на приборе Zetasizer Nano ZS фирмы (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) с использованием кювет из полиметилметакрилата с номинальным размером 10 мм.

Содержание остаточных органических растворителей устанавливали с использованием метода газовой хроматографии. Хроматографические данные регистрировали с использованием программы «Хроматэк Аналитик» (Россия) [12].

Степень включения активного компонента оценивали методом ВЭЖХ. Для этого путем центрифугирования при ускорении 15000g отделяли фитосомы от неинкапсулированных фитоэкдистероидов серпухи венценосной. Надосадочную жидкость хроматографировали и вычисляли содержание в ней активного компонента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка фитосом включала получение больших многослойных везикул с последующей гомогенизацией, что наиболее приемлемо для масштабирования в опытно-промышленных условиях. При выборе состава мембраны фитосом с комплексом фитоэкдистероидов учитывали гидрофобность действующего компонента. В качестве формирующей мембрану фитосомы компонента использовали яичный лецитин. Для стабилизации и уплотнения липидного слоя применяли холестерин. Дополнительно в состав композиции вводили β -ситостерин как структурообразующий компонент, обладающий дополнительно антиоксидантными свойствами [14].

В работе использовали органические растворители: хлороформ и спирт этиловый в соотношении 9:1 по 10 мл и буферные растворы: трис-HCl, ацетатный и фосфатный. Получено девять экспериментальных составов липосом (таблица 1).

Таблица 1. Составы липосом

Table 1. Liposome compositions

Состав / компонент Composition / component	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Лецитин Lecithin	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Холестерол Cholesterol	–	20	–	20	–	–	–	2–	–
β-Ситостерин β-Sitosterol	–	–	5	–	–	5	–	–	5
TBS	30	30	30	–	–	–	–	–	–
Натрий-ацетатный буфер Sodium acetate buffer	–	–	–	30	30	30	–	–	–
Буфер Дульбекко Dulbecco's buffer	–	–	–	–	–	–	30	30	30

Большие многослойные везикулы всех составов гомогенизировали в ультразвуковой ванне.

Однородность полученных модельных композиций оценивали по индексу полидисперсности (ИП) в интервале от 0 (гомогенные системы) до 1 (гетерогенные системы). Полученные результаты представлены в таблице 2.

Составы 1 и 2, являясь гетерогенными с ИП больше 0,9, довольно быстро расслаивались. Модельные композиции везикул составов 3–6 и 9 показали себя неоднородными системами со значениями ИП в диапазоне от 0,5 до 0,7. Наилучшими показателями ИП (от 0,3 и менее) обладали везикулы составов 7 (0,3) и 8 (0,2), они демонстрировали высокую седиментационную стабильность.

Одним из показателей стабильности липосом также является ζ-потенциал. Значение ζ-потенциала у устойчивых липосомальных суспензий составляет 30 мВ или более (абсолютная величина числа). Данные эксперимента по изучению стабильности с использованием ζ-потенциала липосом представлены в таблице 3.

Самыми нестабильными оказались составы 1, 5, 6, у которых ζ-потенциал не смогли определить. Нестабильными показали себя также липосомы составов 2, 3, 4 со значением ζ-потенциала 3 мВ. ζ-потенциал у составов 7 и 9 – 7 мВ, у состава 8 – 40 мВ. Такое существенное увеличение показателя у состава 8, возможно, связано с образованием стабильной композиции, включающей холестерин и фосфатный буфер.

Составы 7, 8, 9 выбраны для дальнейшего исследования влияния гомогенизации, как более стабильные. Для этих композиций определяли оптимальное время ультразвуковой обработки. Для этого в начале и через каждые 5 мин ультразвуковой обработки отбирали пробы, в которых определяли показатели качества липосом: диаметр везикул, ИП и ζ-потенциал.

На рисунке 1 представлена зависимость влияния времени обработки ультразвуком на размер везикул.

Из данных рисунка видно, что липосомы достигают минимального размера после 30 мин обработки ультразвуком (от 100 до 150 нм), а потом начинают увеличиваться. При исследовании размера малых однослойных липосом наименьшие размеры по-

Таблица 2. Индекс полидисперсности модельных композиций везикул

Table 2. Polydispersity index of model vesicle compositions

Показатель Indicator	№ состава Composition No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ИП IP	1,000	0,909	0,457	0,578	0,563	0,657	0,267	0,223	0,597

Таблица 3. Определение ζ-потенциала модельных везикул

Table 3. Determination of the ζ-potential of model vesicles

Состав Compound	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ζ-потенциал, мВ ζ-potential, mV	–	–3	–3	+3	–	–	–7	–40	–7

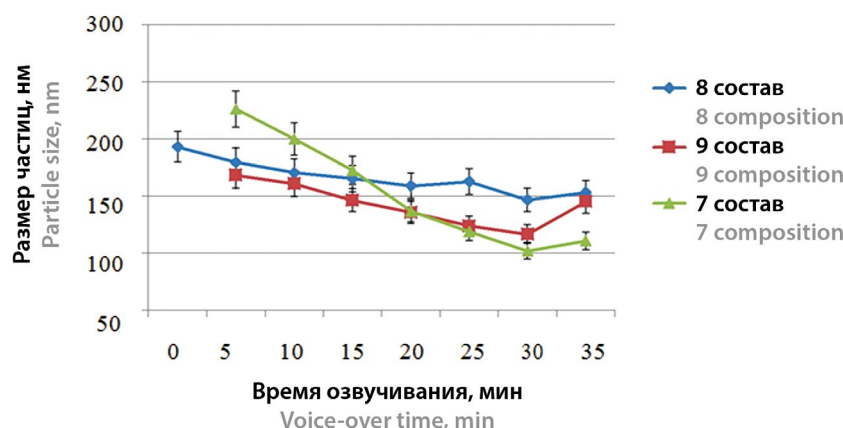


Рисунок 1. Влияние времени ультразвуковой обработки на размер везикул

Figure 1. Effect of ultrasonic treatment time on vesicle size

казали составы, полученные с использованием фосфатного буферного раствора. Наименьший диаметр везикул составил 102 нм (7 состав).

Зависимость изменения показателя ИП от времени ультразвуковой обработки представлена на рисунке 2. Установлено, что ультразвуковое воздействие повышает стабильность везикул. Наблюдали уменьшение показателя ИП для состава 7 в течение 20 мин обработки, состава 9 – в интервалах 0–10 и 25–30 мин, состава 8 – на протяжении всего времени озвучивания.

Динамика изменения ζ -потенциала подтвердила стабильность состава 8 (рисунок 3).

По результатам предложены следующие технологические стадии, позволяющие получать фитосомы (малые однослойные везикулы) с диаметром 130–170 нм и ИП $\leq 0,3$:

- 1) растворение лецитина или композиции лецитина с холестерином / β -ситостерином в растворителе «хлороформ – этиловый спирт» (9:1);
 - 2) введение в раствор субстанции фракции экдистероидов серпухи в количестве 0,02 % (20 мг);
 - 3) сгущение раствора на испарителе роторном до образования тонкой липидной пленки и удаления растворителя (44–46 °C, 9 ч, разряжение 30 кПа);
 - 4) растворение липидной пленки в фосфатном буферном растворе (54–55 °C, 1 ч);
 - 5) структурирование эмульсии путем выдержки при 2–8 °C в течение 24 ч;
 - 6) гомогенизация путем обработки в ультразвуковой ванне в течение 30 мин при комнатной температуре, частоте 35 кГц, мощности 200 Вт.
- Составы 7, 8, 9 с введенной фракцией экдистероидов серпухи обозначили номерами 10, 11 и 12.

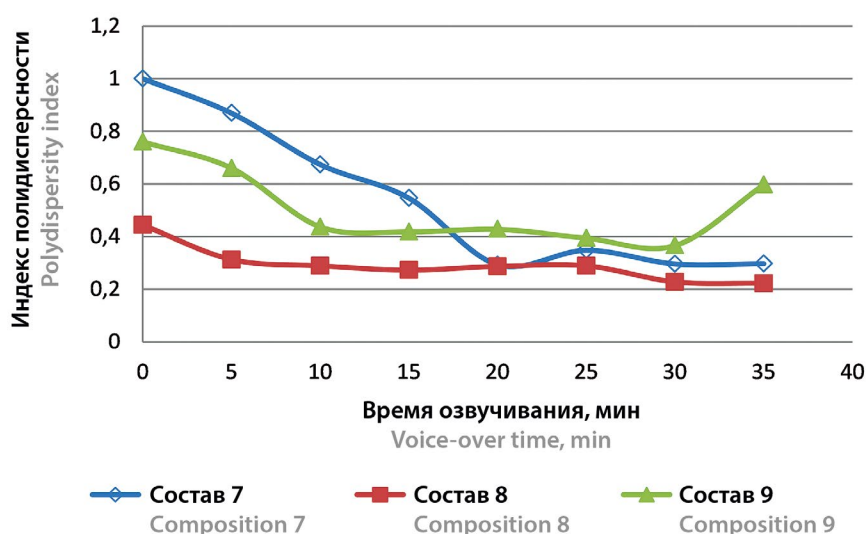


Рисунок 2. Влияние времени ультразвуковой обработки на индекс полидисперсности

Figure 2. Effect of ultrasonic treatment time on the polydispersity index

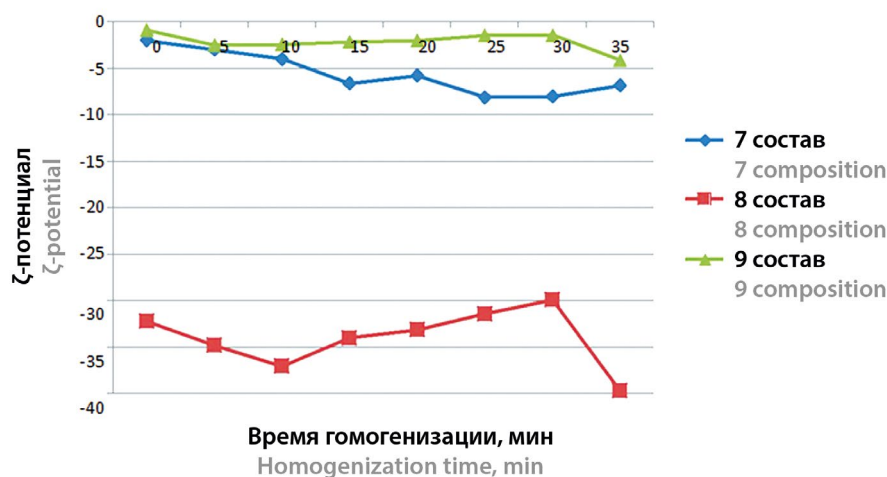


Рисунок 3. Динамика изменения ζ-потенциала

Figure 3. Dynamics of ζ-potential change

При изучении изменения ИП при обработке ультразвуком фитосомальных композиций после 20 и 25 мин гомогенизации однородности достигали составы 10 и 11 (рисунок 4).

Фитосомальная композиция с β-ситостерином (состав 12) при данном режиме гомогенизации оказалась нестабильной. В ходе гомогенизации фитосомальных композиций значение ζ-потенциала у композиции 12 практически не изменялось, что свидетельствует о ее нестабильности. Наиболее устойчивым оказался состав 11, модуль ζ-потенциала составил ≥ 30 мВ (таблица 4).

Для состава 11 и лецитина получены спектры ^{31}P -ЯМР в дейтерированном хлороформе и дейтери-

рованном диметилсульфоксиде (ДМСО) с целью подтвердить образование водородных связей. На спектре, снятом в ДМСО, нет смещения основного пика фосфатидилхолина (рисунок 5). Спектр, полученный на дейтерированном хлороформе, демонстрирует смещение пика на 0,15 м. д. (рисунок 6).

Полученные результаты подтверждают образование водородных связей в структуре фитосом с основным экдистероидом серпухи венценосной – 20-гидроксиэкдизоном.

В соответствии с ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» определяли содержание хлороформа и этилового спирта в исходной эмульсии больших многослойных везикул, а также в образ-

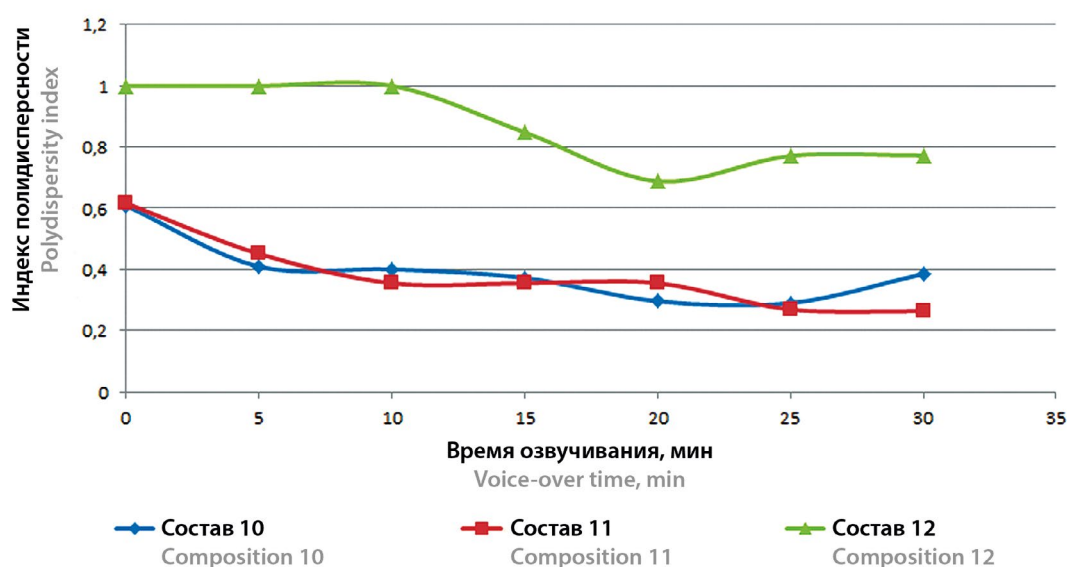


Рисунок 4. Определение индекса полидисперсности фитосомальных композиций в ходе гомогенизации

Figure 4. Determination of the polydispersity index of phytosomal compositions during homogenization

Таблица 4. Определение ζ -потенциала при гомогенизации композиций фитосом

Table 4. Determination of ζ -potential during homogenization of phytosome compositions

Состав Compound	ζ -потенциал, мВ ζ -potential, mV						
	0 мин 0 min	5 мин 5 min	10 мин 10 min	15 мин 15 min	20 мин 20 min	25 мин 25 min	30 мин 30 min
10	-13	-16	-17	-19	-21	-20	-18
11	-17	-39	-37	-38	-35	-30	-35
12	0	0	-1	2	-1	2	0

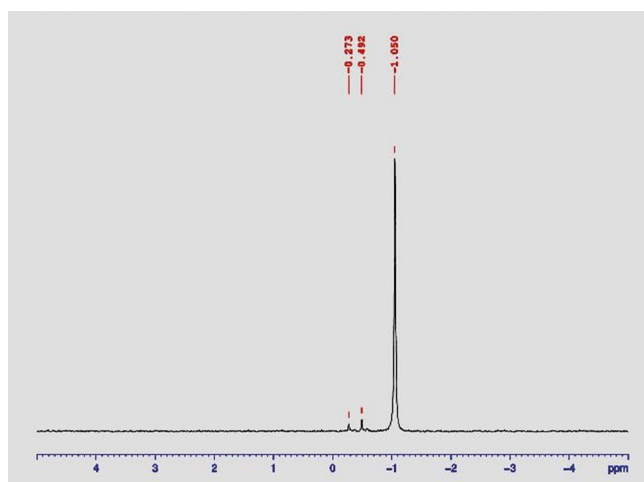


Рисунок 5. ^{31}P -ЯМР-спектр лецитина в дейтерированном хлороформе

Figure 5. ^{31}P -NMR spectrum of lecithin in deuterated chloroform

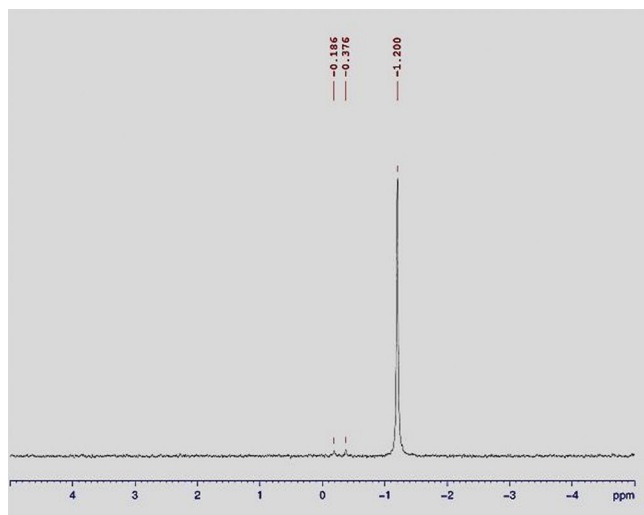


Рисунок 6. ^{31}P -ЯМР-спектр тонкой липидной пленки с экдистероидами

Figure 6. ^{31}P -NMR spectrum of a thin lipid film with ecdysteroids

це, полученном после растворения липидной пленки в фосфатном буферном растворе. Остаточное содержание хлороформа составило 0,498 мг/мл, этанола – 4,961 мг/мл, что соответствует норме¹.

На следующем этапе исследовали степень инкапсуляции активного компонента в фитосомы в ходе технологии и при хранении. Результаты расчетов представлены в таблице 5.

Степень инкапсулирования экдистероидов серпухи составила в среднем 88 %.

При изучении степени инкапсулирования фитосом после года хранения при температурном режиме 2–8 °С получены результаты, представленные в таблице 6.

Количество включенных в фитосомы фракций экдистероидов серпухи составило в среднем 84 % через год хранения. На графике, полученном при измерении размера частиц, отмечено появление еще одного пика в пределах размеров 4 мкм, что может указывать на процесс агломерации, происходящий в ходе хранения. В данном случае размер фитосом составил 85 нм (рисунок 7).

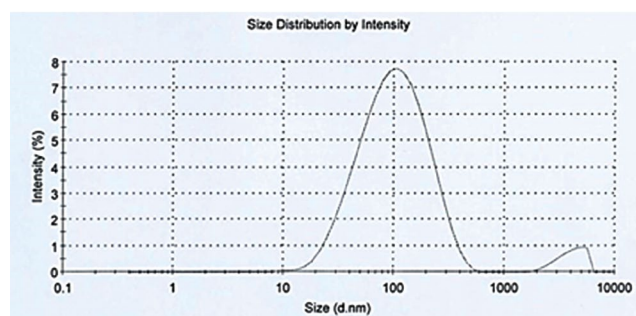


Рисунок 7. Средний размер фитосом через год хранения

Figure 7. Average size of phytosomes after one year of storage

¹ ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/ostatochnye-organicheskie-rastvoriteli/?ysclid=m6t2fawf71721285260>. Ссылка активна на 23.06.2025.

Таблица 5. Определение степени инкапсуляции активного компонента в фитосомы

Table 5. Determination of the degree of encapsulation of the active component in phytosomes

Инкапсулировано СФЭС в фитосомы, мг Encapsulated SFES in phytosomes, mg	Концентрация СФЭС в НЖ, мг/мл Concentration of SFES in NF, mg/ml	Обнаружено СФЭС в НЖ, мг Detected SPES in NF, mg	Степень инкапсулирования СФЭС в фитосомы, % Degree of encapsulation of SFES in phytosomes, %	Метрологические данные (n = 5) Metrological data (n = 5)
20	0,0752	2,256	88,72	$X_{\text{средн.}} = 88,75$ $S^2 = 0,015$ $S_x = 0,054$ $\Delta X = 0,15$ $\epsilon = 0,17 \%$ $X_{\text{avg.}} = 88.75$ $S^2 = 0.015$ $S_x = 0.054$ $\Delta X = 0.15$ $\epsilon = 0.17 \%$
	0,0763	2,289	88,56	
	0,0744	2,232	88,84	
	0,0743	2,229	88,86	
	0,0748	2,244	88,78	

Примечание. СФЭС – сумма фракции экидистероидов серпухи. НЖ – надосадочная жидкость.

Note. SFES – sum of ecdysteroid fraction of Serpukha. NF – supernatant fluid.

Таблица 6. Определение степени инкапсуляции активного компонента в фитосомы через год

Table 6. Determination of the degree of encapsulation of the active component in phytosomes after one year

Инкапсулировано СФЭС в фитосомы, мг Encapsulated SFES in phytosomes, mg	Концентрация СФЭС в НЖ, мг/мл Concentration of SFES in NF, mg/ml	Обнаружено СФЭС в НЖ, мг Detected SPES in NF, mg	Степень инкапсулирования СФЭС в фитосомы, % Degree of encapsulation of SFES in phytosomes, %	Метрологические данные (n = 5) Metrological data (n = 5)
20	0,1031	3,093	84,54	$X_{\text{средн.}} = 84,51$ $S^2 = 0,003$ $S_x = 0,026$ $\Delta X = 0,07$ $\epsilon = 0,08 \%$ $X_{\text{avg.}} = 84.51$ $S^2 = 0.003$ $S_x = 0.026$ $\Delta X = 0.07$ $\epsilon = 0.08 \%$
	0,1028	3,084	84,58	
	0,1035	3,105	84,48	
	0,1038	3,114	84,43	
	0,1032	3,096	84,52	

Примечание. СФЭС – сумма фракции экидистероидов серпухи. НЖ – надосадочная жидкость.

Note. SFES – sum of the ecdysteroid fraction of the serratula. NF – supernatant fluid.

Фитосомы состава 11 вводили в состав геля на основе карбопола 940. Для трех серий композиций геля проводили исследование по высвобождению экидистероидов методом диализа по Кривчинскому. Установлено, что количество активного компонента в пермеате составило примерно 15 %. Эти данные практически совпадают с результатами определения степени включения фитоэкидистероидов в фитосомы. Это свидетельствует об образовании стабильной гелевой композиции с фитосомами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология получения фитосом с экидистероидами серпухи венценосной с использованием лецитина, холестерина и фосфатного буферного

раствора. Предложены приемы, позволяющие получать стабильные фитосомы, определены показатели качества (размер частиц, ИП, дзета-потенциал). Для состава 12 доказано образование водородных связей между 20-гидроксиэкидистероном серпухи венценосной и фосфатидилхолином методом ЯМР-спектроскопии. Степень инкапсуляции фитоэкидистероидов в везикулы составила 88 % и сохранялась в течение года. Стабильность полученного фитосомального комплекса свидетельствует о возможности создания мягких лекарственных форм на его основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соловьева А. Г., Еримбетов К. Т., Обвинцева О. В., Федорова А. В., Михайлов В. В. Физиологические механизмы действия и перспективы применения фитоэкидестеро-

- идов в медико-биологических технологиях. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2021;1:26–40. DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.1.26-40.
- Молохова Е. И., Липин Д. Е., Сорокина Ю. В. Основные направления фармацевтической разработки препаратов фитоэкдистероидов (обзор). *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2022;25(8):3–9. DOI: 10.29296/25877313-2022-08-01.
 - Еримбетов К. Т., Федорова А. В., Гончарова А. Я., Бондаренко Е. В. Создание наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона и исследование ее биологической доступности. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2020;3:106–113. DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.3.106-113.
 - Новикова А. А., Кезимана П., Станишевский Я. М. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;2(19):134–138.
 - Горбик В. С., Шпрах З. С., Козлова Ж. М., Салова В. Г. Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор). *Российский биотерапевтический журнал*. 2021;20(1):33–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-33-41.
 - Aini P. N., Muhammad D., Eko P. G., Rachmat M., Fahmi E. Formulation, Characterization and Antioxidant Myricetin Nanophytosome for Topical Delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2020;8(3):09–13. DOI: 10.22270/ajprd.v8i3.718.
 - Зверев Я. Ф., Рыкунова А. Я. Современные наноносители как фактор повышения биодоступности и фармакологической активности флавоноидов. *Биотехнология*. 2022;38(1):47–68. DOI: 10.56304/S0234275822010100.
 - Петришина Т. В., Чернова И. Д., Восканян О. С. Использование липосом эфирного масла розмарина для транспортировки биологически активных молекул в косметические изделия для волос. *Тенденции развития науки и образования*. 2019;55(4):37–40. DOI: 10.18411/lj-10-2019-63.
 - Сажина Н. Н., Лапшин П. В., Загоскина Н. В., Пальмина Н. П. Ингибирование окисления липосом фосфатидилхолина фенольными соединениями экстрактов *Aloe: A. arborescens*, *A. pillansii* и *A. squarrosa*. *Химия растительного сырья*. 2019;2:83–90. DOI: 10.14258/jcprm.2019024885.
 - Полтавец Ю. И., Кузнецов С. Л., Тубашева И. А., Муравьева А. И., Гукасова Н. В. Нано- и микроразмерные формы силимарина и силибина. *Российские нанотехнологии*. 2021;16(2):149–174. DOI: 10.1134/S1992722321020102.
 - Фельдман Н. Б., Орехов С. Н., Чакалева И. И., Мучкинова Е. А., Седякина Н. Е., Луценко С. В. Получение липосомального сангвинарина и изучение его цитотоксического действия на опухолевые клетки предстательной железы. *Российские нанотехнологии*. 2020;15(2):231–237. DOI: 10.1134/S1992722320020077.
 - Соловьева Н. Л., Сокуренок М. С., Зырянов О. А. Биодоступность куркумина и методы ее повышения (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;3(3):46–53.
 - Зорина Т. Е., Янковский И. В., Яковец И. В., Кравченко И. Е., Ермилова Т. И., Шман Т. В., Белевцев М. В., Зорин В. П. Внутриклеточная локализация и механизмы фототоксичности производных хлороина E₆ и их липосомальных форм. *Биофизика*. 2019;4:674–685. DOI: 10.1134/S0006302919040057.
 - Валитова Ю. Н., Ренкова А. Г., Минибаева Ф. В. β-ситостерин – природный антиоксидант. *Экобиотех*. 2020;3(2):150–156. DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-2-150-156.

REFERENCES

- Solovieva A. G., Erimbetov K. T., Obvintseva O. V., Fedorova A. V., Mikhailov V. V. Physiological mechanisms of action and the prospects for the use of phytoecdysteroids in biomedical technologies. *Problems of Productive Animal Biology*. 2021;1:26–40. (In Russ.) DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.1.26-40.
- Molohova E. I., Lipin D. E., Sorokina Yu. V. The main directions of pharmaceutical development of phytoecdysteroid preparations (review). *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2022;25(8):3–9. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2022-08-01.
- Ermbetov K. T., Fedorova A. V., Goncharova A. Ya., Bondarenko E. V. Creation of a nanoscale form of 20-hydroxyecdysone and research of its biological availability. *Problems of Productive Animal Biology*. 2020;3:106–113. (In Russ.) DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.3.106-113.
- Novikova A. A., Kezimana P., Stanishevskiy Ya. M. Methods for obtaining liposomes, used as drug delivery systems (review). *Drug development & registration*. 2017;(2):134–138. (In Russ.)
- Gorbik V. S., Shprakh Z. S., Kozlova Z. M., Salova V. G. Liposomes as a targeted delivery system of drugs (review). *Russian Journal of Biotherapy*. 2021;20(1):33–41. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-33-41.
- Aini P. N., Muhammad D., Eko P. G., Rachmat M., Fahmi E. Formulation, Characterization and Antioxidant Myricetin Nanophytosome for Topical Delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2020;8(3):09–13. DOI: 10.22270/ajprd.v8i3.718.
- Zverev Ya. F., Rykunova A. Ya. Modern nanocarriers as a factor in increased bioavailability and pharmacological activity of flavonoids. *Biotechnology*. 2022;38(1):47–68. (In Russ.) DOI: 10.56304/S0234275822010100.
- Petrishina T. V., Chernova I. D., Voskanjan O. S. The use of rosemary essential oil liposomes to transport biologically active molecules into cosmetic hair products. *Trends in the development of science and education*. 2019;55(4):37–40. (In Russ.) DOI: 10.18411/lj-10-2019-63.
- Sazhina N. N., Lapshin P. V., Zagoskina N. V., Palmina N. P. Inhibition of phosphatidylcholine liposomes oxidation by phenolic compounds of aloe extracts: *A. arborescens*, *A. pillansii* and *A. squarrosa*. *Chemistry of plant raw materials*. 2019;2:83–90. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019024885.
- Poltavec Yu. I., Kuznecov S. L., Tubasheva I. A., Muraveva A. I., Gukasova N. V. Nano- and micro-sized forms of silymarin and silybin. *Russian nanotechnology*. 2021;16(2):149–174. (In Russ.) DOI: 10.1134/S1992722321020102.
- Feldman N. B., Orekhov S. N., Chakaleva I. I., Muchkino-va E. A., Sedyakina N. E., Lutsenko S. V. Preparation of liposomal sanguinarine and study of its cytotoxic effect against prostate cancer cells. *Russian nanotechnology*. 2020;15(2):231–237.
- Soloveva N. L., Sokurenko M. S., Zyryanov O. A. Bioavailability of curcumin and methods of its enhancement (review). *Drug development & registration*. 2018;(3):46–53. (In Russ.)
- Zorina T. E., Yankovsky I. V., Yakovets I. V., Kravchenko I. E., Ermilova T. I., Shman T. V., Belevtsev M. V., Zorin V. P. Intracellular localization and phototoxicity mechanisms of chlorin E₆ derivatives and their liposomal formulations. *Biophysics*. 2019;4:674–685. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0006302919040057.
- Valitova Ju. N., Renkova A. G., Minibayeva F. V. β-sitosterin – natural antioxidant. *Ecobiotech*. 2020;3(2):150–156. (In Russ.) DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-2-150-156.



биопром

6–7 ОКТЯБРЯ 2025
ГЕЛЕНДЖИК, РОССИЯ
«ГЕЛЕНДЖИК АРЕНА»

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ БИОПРОМ: ПРОМЫШЛЕННОСТЬ И ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА

Масштабная платформа для профессионального диалога разработчиков технологий, институтов развития, производителей, органов власти и деловых сообществ

В ФОКУСЕ БИОПРОМ'25

БИОТЕХМЕД

ИННОФУД

КОСМЕТИК
КОМПОНЕНТ

ЭКОБИО



Фармацевтика



Медицинские изделия
и оборудование



Медицинская
реабилитация



Персонализированная
медицина



Биотехнологии
для медицины



Геномная
медицина



Новые материалы
и технологии в медицине



IT в медицине



СРЕДИ СЕССИЙ ДЕЛОВОЙ ПРОГРАММЫ:

Инвестиции в биоэкономику
— инвестиции в будущее

Биомишени будущего:
приоритетные направления
для разработок в области
медицины и ориентиры
для промышленности

Биоэкономика в основе
счастливой жизни

**Полная версия деловой
программы уже доступна
на сайте**

WWW.BIOPROMFORUM.RU

Реклама 12+



Оригинальная статья / Research article

УДК 613.632.2; 614.35; 615.013

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2090>



Разработка и валидация методики количественного определения эзомерпазола магния тригидрата в воздухе рабочей зоны методом ВЭЖХ-МС/МС

А. Ю. Савченко¹, П. А. Жильцов², И. И. Картамышев³✉, Д. Ф. Гуранда⁴, М. В. Никулин⁴

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

² Обнинский институт атомной энергетики – филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (ИАТЭ НИЯУ МИФИ). 249039, Россия, Калужская область, г. Обнинск, тер. Студгородок, д. 1

³ Общество с ограниченной ответственностью «Фармацевтический научный центр «ИННОФАРМАТЕХ». 115419, Россия, г. Москва, ул. Орджоникидзе, д. 11, стр. 11

⁴ Общество с ограниченной ответственностью «Фарм Иннтех». 121596, Россия, г. Москва, ул. Горбунова, д. 2, стр. 11

✉ Контактное лицо: Картамышев Илья Игоревич. E-mail: ikartamyshev@mail.ru

ORCID: А. Ю. Савченко – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;

П. А. Жильцов – <https://orcid.org/0000-0002-4322-3568>;

И. И. Картамышев – <https://orcid.org/0000-0001-5498-527X>;

Д. Ф. Гуранда – <https://orcid.org/0000-0001-7500-6122>;

М. В. Никулин – <https://orcid.org/0000-0002-8710-6291>.

Статья поступила: 30.04.2025

Статья принята в печать: 15.08.2025

Статья опубликована: 15.08.2025

Резюме

Введение. Эзомерпазол, относящийся к ингибиторам протонного насоса, широко применяется для терапии «кислотозависимых» заболеваний верхних отделов желудочно-кишечного тракта. При ингаляционном воздействии относится к веществам первого класса опасности, что обуславливает необходимость контроля его концентрации в воздухе рабочей зоны на фармацевтических предприятиях. Несмотря на наличие в научной литературе методик количественного анализа эзомерпазола в разных матрицах, отсутствуют методы для анализа данного вещества в воздухе производственных помещений.

Цель. Разработка методики количественного определения эзомерпазола магния тригидрата в воздухе рабочей зоны методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материал и методы. Пробы воздуха отбирались на мембранные фильтры диаметром 25 мм при 5,0 л/мин. Анализ проводили с использованием стандартных образцов эзомерпазола магния тригидрата и карбамазепина. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке C18, 100 × 4,6 мм, 2,5 мкм. Детектирование проводилось на масс-селективном детекторе в положительном режиме ионизации с помощью электроспрея путем мониторинга множественных реакций. MRM-переходы: 346,1 → 198,1 m/z (эзомерпазол), 237,1 → 194,1 m/z (карбамазепин).

Результаты и обсуждение. Методика валидирована по следующим параметрам: пригодность хроматографической системы (число теоретических тарелок N для эзомерпазола – не менее 13170, для карбамазепина – не менее 5617), фактор асимметрии пиков (A_s) для обоих веществ не превышает 1,36 и 1,41 соответственно; предел обнаружения – 17 нг/мл; нижний предел количественного определения – 50 нг/мл; специфичность (интерферирующие пики для эзомерпазола – не более 1,2 %, для карбамазепина – не более 0,25 %); линейность в интервале 50–5000 нг/мл (коэффициент детерминации (R^2) – не менее 0,9995, точность в интервале от 92,8 до 106,1 % и относительное стандартное отклонение (RSD, %) – не более 4,2 %); внутрилабораторная правильность (точность от 99,6 до 102,2 %), межлабораторная (от 100,5 до 101,6 %); внутрилабораторная прецизионность (RSD не более 4,3 %), межлабораторная (RSD не более 5,8 %). Все параметры валидации соответствуют критериям приемлемости. Кроме того, установлена стабильность эзомерпазола магния тригидрата на фильтрах при хранении до трех месяцев.

Заключение. Разработка и внедрение методики позволили провести количественный анализ эзомерпазола в воздухе рабочей зоны и оценить безопасность производственного процесса в соответствии с гигиеническими требованиями.

Ключевые слова: эзомерпазол, воздух рабочей зоны, методика анализа, валидация, стабильность

© Савченко А. Ю., Жильцов П. А., Картамышев И. И., Гуранда Д. Ф., Никулин М. В., 2025

© Savchenko A. Yu., Zhiltcov P. A., Kartamyshev I. I., Guranda D. T., Nikulin M. V., 2025

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

Вклад авторов. И. И. Картамышеву принадлежит концепция, планирование и структура работы, а также отбор проб воздуха на производстве. Д. Ф. Гуранда, М. В. Никулин и И. И. Картамышев участвовали в анализах с использованием ВЭЖХ-МС/МС. И. И. Картамышев и П. А. Жильцов оценивали предельно допустимые уровни воздействия и потенциальные риски для работников на производственной площадке. А. Ю. Савченко выполняла общее руководство, научное консультирование и редактирование статьи. Все авторы участвовали в написании статьи и обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование финансировалось за счет ООО «АстраЗенека Индастриз».

Для цитирования: Савченко А. Ю., Жильцов П. А., Картамышев И. И., Гуранда Д. Ф., Никулин М. В. Разработка и валидация методики количественного определения эзомепразола магния тригидрата в воздухе рабочей зоны методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):147–159. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2090>

Development and validation of esomeprazole magnesium trihydrate determination in workplace air using HPLC-MS/MS

Alla Yu. Savchenko¹, Pavel A. Zhiltcov², Ilya I. Kartamyshev³✉,
Dorel T. Guranda⁴, Maksim V. Nikulin⁴

¹ National Research Nuclear University MEPhI. 31, Kashirskoe shosse, Moscow, 115409, Russia

² Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, a branch of National Research Nuclear University MEPhI (IATE MEPhI). 1, Studgorodok territory, Kaluga region, Obninsk, 249039, Russia

³ Limited Liability Company "InnoPharmaTech", 11/11, Ordzhonikidze str., Moscow, 115419, Russia

⁴ Limited Liability Company "Farm Innovation Technologies", 2/11, Gorbunova str., Moscow, 121596, Russia

✉ **Corresponding author:** Ilya I. Kartamyshev. **E-mail:** ikartamyshev@mail.ru

ORCID: Alla Yu. Savchenko – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;

Pavel A. Zhiltcov – <https://orcid.org/0000-0002-4322-3568>;

Ilya I. Kartamyshev – <https://orcid.org/0000-0001-5498-527X>;

Dorel T. Guranda – <https://orcid.org/0000-0001-7500-6122>;

Maksim V. Nikulin – <https://orcid.org/0000-0002-8710-6291>.

Received: 30.04.2025

Accepted: 15.08.2025

Published: 15.08.2025

Abstract

Introduction. Esomeprazole is a proton pump inhibitor widely used in the treatment of acid-related diseases of the upper gastrointestinal tract. Upon inhalation exposure, it is classified as a substance of the highest hazard class, which requires monitoring its concentration in the workplace air at pharmaceutical enterprises. Despite the availability of methods for the quantitative analysis of esomeprazole in various matrices in the scientific literature, there are currently no methods for analyzing this substance in workplace or industrial air.

Aim. To develop a method for the quantitative determination of esomeprazole magnesium trihydrate in workplace air using HPLC-MS/MS.

Materials and methods. Air samples were collected using membrane filters with a diameter of 25 mm at a flow rate of 5,0 L/min. The analysis was performed using reference standards of esomeprazole magnesium trihydrate and carbamazepine. Chromatographic separation was carried out on a C18 column (2,5 µm, 100 × 4,6 mm). Detection was performed using a mass-selective detector in positive electrospray ionization mode by multiple reaction monitoring. MRM transitions were: 346,1 → 198,1 m/z for esomeprazole and 237,1 → 194,1 m/z for carbamazepine.

Results and discussion. The method was validated according to the following parameters: suitability of the chromatographic system (the number of theoretical plates, N, for esomeprazole is at least 13170 and for carbamazepine, at least 5617), the asymmetry factor (A_s) for both substances does not exceed 1,36 and 1,41, respectively; limit of detection: 17 ng/mL; lower limit of quantification: 50 ng/mL; specificity (the response of interfering peaks for esomeprazole at most 1,2 % and for carbamazepine at most 0,25 %); linearity in the range of 50–5000 ng/mL (determination coefficient (R²) of at least 0,9995, accuracy from 92,8 to 106,1 %, and relative standard deviation (RSD, %) at most 4,2 %); intralaboratory accuracy (from 99,6 to 102,2 %) and interlaboratory accuracy (from 100,5 to 101,6 %); intralaboratory precision (RSD at most 4,3 %) and interlaboratory precision (RSD at most 5,8 %). All validation parameters met the acceptance criteria. The stability of esomeprazole on filters was confirmed for up to three months of storage.

Conclusion. The development and implementation of the method enabled quantitative analysis of esomeprazole in workplace air and the assessment of the safety of the production process in accordance with hygienic requirements.

Keywords: esomeprazole, workplace air, analytical method, validation, stability

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

Contribution of the authors. Ilya I. Kartamyshev owns the idea, concept, planning and structure of work, and conducted air sampling at the production site. Dorel F. Guranda, Maksim V. Nikulin, and Ilya I. Kartamyshev participated in the HPLC-MS/MS analyses. Ilya I. Kartamyshev and Pavel A. Zhiltcov assessed occupational exposure limits and potential risks to workers at the production site. Alla Yu. Savchenko provided overall supervision, scientific consultation, and editorial assistance. All authors contributed to writing the manuscript and to the discussion of the results.

Funding. The study was funded by LLC "Astrazeneca Industries".

For citation: Savchenko A. Yu., Zhiltcov P. A., Kartamyshev I. I., Guranda D. T., Nikulin M. V. Development and validation of esomeprazole magnesium trihydrate determination in workplace air using HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2025;14(3):147–159. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2090>

ВВЕДЕНИЕ

Эзомепразол – (S)-5-метокси-2-[(4-метокси-3,5-диметилпирдин-2-ил)метилсульфинил]бензимидазол (рисунок 1) (S-изомер омепразола) – первый ингибитор протонного насоса, созданный в виде чистого оптического изомера, применяющийся в качестве средства терапии первой линии для лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, а также в комплексной терапии эрадикации *Helicobacter pylori* [1–5]. Благодаря оптической изомерии обладает более высокой биодоступностью, что во многом определяет его эффективность по сравнению с рацемическим омепразолом [6–7]. Большая распространенность «кислотозависимых» заболеваний верхних отделов ЖКТ во всем мире обеспечивает потребность на рынке, а значит, и устойчивый рост объемов производства лекарственного средства эзомепразола [8].

Эзомепразол является высокоопасным веществом при ингаляционном пути поступления (ГОСТ 12.1.007-76¹), его ориентировочный безопасный уровень воздействия (ОБУВ) в воздухе рабочей зоны составляет 10,0 мкг/м³ (МУК 4.1.3429-17²). По результатам исследований на различных видах лабораторных животных (мыши, крысы, кролики) и на людях показано негативное влияние эзомепразола на показатели репродуктивной функции и развитие плода в дозах, значительно превышающих терапевтические. Эзомепразол существенно снижает подвижность и общее ко-

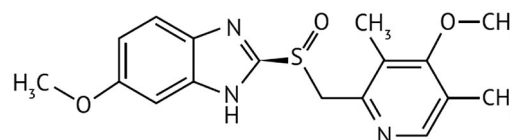


Рисунок 1. Структурная формула эзомепразола

Figure 1. Structural formula of esomeprazole

личество сперматозоидов в эякуляте [9]. Также к нежелательным явлениям относится повышение гастрина, повышение риска желудочно-кишечных инфекций и задержки опорожнения желудка при долгосрочном применении [5, 10].

В промышленности необходимо создавать и поддерживать безопасные условия труда. Согласно Федеральному закону № 52 «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»³, одним из инструментов достижения этой цели является организация и проведение производственного контроля по химическому фактору, который позволяет оценить и предотвратить негативное воздействие на здоровье сотрудников.

В научной литературе описано множество методик количественного определения эзомепразола в различных объектах: плазме крови, готовых лекарственных средствах, в целях определения изомерной чистоты, в фармакопейном анализе, а также в объектах окружающей среды – почве и речных отложениях [11–15]. Однако существующие методики в первую очередь ориентированы на фармацевтические, биологические объекты окружающей среды и недостаточно адаптированы для анализа воздуха рабочей зоны.

³ Федеральный закон № 52-ФЗ (ред. от 26.12.2024) «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30.03.1999 Доступно по: <https://cloud.consultant.ru/cloud/cgi/online.cgi?req=doc&base=LAW&n=495713&cacheid=7652E5291AB50A69DE3FABC77683C514&mode=splus&rnd=um2sQ#zX78FqUmqQik2d061>. Ссылка активна на 07.07.2025.

¹ ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». Доступно по: <https://cloud.consultant.ru/cloud/cgi/online.cgi?req=doc&base=STR&n=3&dst=1000000001&cacheid=7DCB7EB258620F67A74CF9784CBE98C4&mode=splus&rnd=bNmxxg#PcP7FqUQFYDLB45R1>. Ссылка активна на 07.07.2025.

² МУК 4.1.3429-17 «Методы контроля. Химические факторы». Доступно по: <https://cloud.consultant.ru/cloud/cgi/online.cgi?req=doc&base=OTN&n=17814&cacheid=3AC6673F773B7918E05AA19FDBA2F373&mode=splus&rnd=bNmxxg#uxo7FqUsnbehbYMr>. Ссылка активна на 07.07.2025.

Таким образом, возникает практическая и научная потребность в разработке специализированного метода количественного определения этого вещества именно в воздухе рабочей зоны. В качестве наиболее перспективного и чувствительного направления для решения данной задачи был выбран метод ВЭЖХ-МС/МС, обладающий высокой селективностью и возможностью определения низких концентраций аналита в сложных по составу пробах воздуха.

Цель исследования – разработка методики количественного определения эзомепразола магния тригидрата в воздухе рабочей зоны методом ВЭЖХ-МС/МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Стандартные образцы

Для приготовления исходных растворов аналита и внутреннего стандарта использовали следующие стандартные образцы:

- эзомепразола магния тригидрат (субстанция порошок, содержание эзомепразола 99,0%-го, Евр. фарм., ЕС, серия 2, годен до 09.2025);
- карбамазепин, (субстанция порошок, содержание карбамазепина 99,8%-го, «Супелко», США, серия ВССН4703, годен до 03.2026).

Реактивы

Пробоподготовку и анализ исследуемых образцов проводили при использовании следующих химических реактивов: ацетонитрила для масс-спектрометрии (Thermo Fisher Scientific, Германия); формиата аммония для масс-спектрометрии (Scharlau, Испания); воды для масс-спектрометрии с удельным сопротивлением 18,2 МОм·см; аммиака водного раствора 25%-го для масс-спектрометрии (PALLAV Chemicals & Solvents Pvt. Ltd., Индия).

Приготовление растворов

Растворитель готовили смешиванием воды, ацетонитрила и аммиака водного раствора 25%-го в соотношении 1:1:0,001 с последующей дегазацией на химической вакуумной станции PC 3012 VARIO (серия 31090903-310910; VACUUBRAND GmbH + Co KG, Германия). Исходный раствор внутреннего стандарта (ВС) с концентрацией карбамазепина 1000 мкг/мл готовили, растворяя навеску стандартного образца (СО) карбамазепина в растворителе. Рабочий раствор ВС с концентрацией карбамазепина 50,0 мкг/мл готовили разведением исходного раствора ВС растворителем. Исходный раствор аналита с концентрацией эзомепразола магния тригидрата 1000 мкг/мл готовили, растворяя навеску СО эзомепразола магния тригидрата в растворителе. Рабочий раствор аналита с концентрацией эзомепразола магния тригидрата 100 мкг/мл готовили разведением исходного раствора аналита в растворителе. Холостой, ну-

левой и калибровочные растворы готовили разведением рабочих растворов аналита и ВС растворителем согласно таблице 1.

Таблица 1. Концентрации эзомепразола и карбамазепина в калибровочных растворах

Table 1. Concentrations of esomeprazole and carbamazepine in calibration solutions

№ раствора № solution	Концентрация аналита, нг/мл Concentration of analyte, ng/mL	Концентрация ВС, нг/мл Concentration of carbamazepine, ng/mL
Холостой Blank	0	0
Нулевой Zero	0	500
1	50	500
2	100	500
3	250	500
4	500	500
5	1000	500
6	2000	500
7	3000	500
8	4000	500
9	5000	500

Оборудование для отбора проб воздуха

Отбор проб воздуха осуществляли с помощью насоса GilAir Plus (Sensidyne, LP, США) с концентрированием на аналитические аэрозольные ПВХ-фильтры диаметром 25,0 мм с размером пор 5,0 мкм (Merck KGaA, Германия), помещенные в фильтродержатели IOM (Zefon International, Inc., США) [16–17]. Калибровку насосов осуществляли с помощью калибратора расхода воздуха TSI-149 (TSI Incorporated, США).

Хроматографическое разделение и детектирование

Хроматографическое разделение и детектирование проводилось на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, США) с tandemным масс-селективным детектором с тройным квадруполем 6490 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, США). Хроматограф был оснащен термостатом колонок и образцов, дегазатором, насосом и автосемплером. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения MassHunter WorkStation (Agilent Technologies, США).

Для хроматографического разделения использовалась колонка Kromasil Eternity XT C18, 2,5 мкм, 100 × 4,6 мм (AkzoNobel, Нидерланды). Разделение осуществлялось при рабочем давлении не ниже 600 бар с использованием изократического режима элюирования. В качестве подвижной фазы применялась смесь двух элюентов в соотношении 50/50 (элюент А: 0,02%-й раствор формиата аммония в

смеси ацетонитрила и воды в соотношении 4:1 по объему; элюент Б: 0,02%-й раствор формиата аммония в смеси ацетонитрила и воды в соотношении 19:1 по объему).

Объем вводимой пробы составил 2,0 мкл. Общее время регистрации хроматограммы – 1,7–3,0 мин. Время удерживания эзомерпазола составило около 1,9 мин, время удерживания карбамазепина – около 2,3 мин. Скорость подвижной фазы – 0,6 мл/мин.

Для масс-спектрометрического детектирования был выбран источник ионизации электроспрей. Ионизация проводилась в положительном режиме. Детектирование проводилось путем мониторинга множественных реакций MRM (Multiple Reaction Monitoring). Были подобраны следующие MRM-переходы: 346,1 → 198,1 m/z (эзомерпазол), 237,1 → 194,1 m/z (карбамазепин). Параметры источника ионизации: осушающий газ (азот) – 18 л/мин, распыляющий газ (азот) – 10 л/мин, линия десольватации – 260 °C, напряжение на источнике +4,0 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор условий отбора проб

Воздух аспирировали через фильтр при 5,0 л/мин и отбирали не менее 1000 л. Нижний предел количественного определения массовых концентраций установлен на уровне 10 % ОБУВ ($\leq 0,5$ мкг/м³), что соответствует нормативным требованиям (ГОСТ Р 8.563–2009¹, ГОСТ 12.1.016–79²). Таким образом, рассчитанный диапазон анализа массовых концентраций эзомерпазола магния тригидрата в воздухе рабочей зоны составляет 0,5–50,0 мкг/м³.

Валидация аналитической методики

В качестве внутреннего стандарта выбран карбамазепин, не взаимодействующий с эзомерпазолом, обеспечивающий высокую селективность и чувствительность, а также относительно невысокую стоимость СО. Подобраны условия хроматографического разделения и детектирования. Нижний предел количественного определения эзомерпазола магния тригидрата в хроматографируемом объеме раствора пробы – 0,005 мкг. Рассчитаны значения градуировочной характеристики: 0,05–5,0 мкг/мл.

Валидацию методики количественного определения эзомерпазола магния тригидрата на аэрозольных

фильтрах проводили в соответствии с Государственной фармакопеей РФ XV издания (ГФ РФ XV), ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»³; ГОСТ Р ИСО 5725–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений»⁴ и ICH Q2(R1) «Validation of analytical procedures: Text and methodology»⁵ по следующим характеристикам: пригодности хроматографической системы; нижнему пределу количественного определения и оценке предела обнаружения; специфичности; калибровочной зависимости; правильности; прецизионности; долгосрочной стабильности исследуемых образцов в условиях хранения.

Проверка пригодности хроматографической системы

Испытание включало в себя: испытание эффективности хроматографической колонки, испытание постоянства условий хроматографирования, испытание пригодности дозирующего устройства. Результаты представлены в таблице 2.

Эффективность хроматографической системы оценивали через число теоретических тарелок, рассчитанных по пикам эзомерпазола и карбамазепина, количество которых составляет не менее 13170 и не менее 5617 соответственно, что удовлетворяет критериям приемлемости (не менее 2000 теоретических тарелок).

Фактор асимметрии пиков эзомерпазола и карбамазепина составляет не более 1,36 и 1,41, что соответствует критериям приемлемости (не более 2,0).

Значение квадрата коэффициента корреляции R² отношения площади пика эзомерпазола к площади пика ВС на хроматограмме калибровочного раствора от отношения концентрации эзомерпазола магния тригидрата к концентрации ВС в калибровочном растворе для интервала концентраций эзомерпазола магния тригидрата от 50,0 нг/мл до 5000 нг/мл составляет величину не менее 0,9995, что соответствует критериям приемлемости (не менее 0,9970).

Таким образом, хроматографическая система является пригодной для проведения анализа.

³ ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-13/1/1-1/1-1-12/validatsiya-analiticheskikh-metodik/>. Ссылка активна на 07.07.2025.

⁴ ГОСТ Р ИСО 5725–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». Доступно по: <https://cloud.consultant.ru/cloud/cgi/online.cgi?req=doc&base=OTN&n=27181&cacheid=94FA00363243004711F0C6AA69964E6A&mode=splus&rnd=bNmxxg#a6QJFqUVIMazkzn4>. Ссылка активна на 07.07.2025.

⁵ ICH guideline Q2 (R1) «Validation of analytical procedures: Text and methodology». Available at: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpccajpcglclefindmkaj/https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf). Accessed: 07.07.2025.

¹ ГОСТ Р 8.563–2009 «Методики (методы) измерений». Доступно по: <https://cloud.consultant.ru/cloud/cgi/online.cgi?req=doc&base=OTN&n=24678&dst=1000000001&cacheid=EE9097D2EC2CB397C7C56F4618E3FD49&mode=splus&rnd=bNmxxg#EBeHFqUDJealmyVI>. Ссылка активна на 07.07.2025.

² ГОСТ 12.1.016–79 «Воздух рабочей зоны. Требования к методикам измерения концентраций вредных веществ». Доступно по: <https://cloud.consultant.ru/cloud/cgi/online.cgi?req=doc&base=LAW&n=136189&cacheid=EE2DB048A2F5741617FCF8538BC6AF2A&mode=splus&rnd=bNmxxg#kSciFqUMQVsOKoBr>. Ссылка активна на 07.07.2025.

Таблица 2. Проверка пригодности хроматографической системы

Table 2. Testing the suitability of the chromatographic system

Параметр пика Parameter peak	Эзомерпазол Esomeprazole			Карбамазепин Carbamazepine		
	1	2	3	1	2	3
Число теоретических тарелок Theoretical plate numbers	17100	13170	20400	7854	5617	7890
Factor As	1,36	1,34	1,30	1,25	1,41	1,29
R ²	0,9995	0,9999	0,9997	–	–	–

Нижний предел количественного определения
и оценка предела обнаружения

На примере растворов с низким уровнем (500 нг) содержания аналита оценили величину НПКО равной концентрации эзомерпазола магния тригидрата, при которой отношение сигнал/шум не менее 10 (см. таблицу 3 и рисунок 3). Величину предела обнаружения оценили на уровне около 17 нг/мл, при котором отношение сигнал/шум на хроматограмме соответствующего раствора не менее 3,3 (в эксперименте получено значение сигнал/шум в интервале 5,9–11,1).

Таблица 3. Нижний предел количественного определения эзомерпазола магния тригидрата

Table 3. Limit of quantification
of esomeprazole magnesium trihydrate

Метрологический параметр Metrological parameter	1	2	3
Сигнал/Шум S/N	16	16	38
НПКО, нг/мл LLOQ, ng/mL	50	50	50

Методика удовлетворяет критерию пригодности по показателю «нижний предел количественного определения», предел обнаружения – около 17 нг/мл.

Специфичность

Специфичность – это способность достоверно идентифицировать и количественно определять содержание данного вещества в исследуемом образце в присутствии сопутствующих веществ, например используемого ВС, компонентов матрицы и других компонентов, присутствующих в образце. Для валидации методики по показателю «специфичность» были приготовлены следующие растворы: 3 холостых раствора; 3 нулевых раствора; растворы с содержанием эзомерпазола магния тригидрата на уровне НПКО.

Для трех холостых растворов площадь интерферирующих пиков на полученных хроматограммах ВС составляет не более 0,25 % от средней площади пика ВС на хроматограмме ВС для нулевого раствора, равной приблизительно 1689,3, что соответствует

критериям пригодности (отклик сигнала интерферирующих пиков ВС должен составлять не более 5,0 %). Хроматограммы холостого и нулевого растворов карбамазепина изображены на рисунке 2. Результаты селективности определения ВС представлены в таблице 4.

Для трех нулевых растворов площадь интерферирующих пиков на полученных хроматограммах эзомерпазола магния тригидрата составляет менее 1,2 % от средней площади пика эзомерпазола на хроматограмме аналита для раствора с содержанием эзомерпазола магния тригидрата на уровне НПКО, равной приблизительно 87,449, что соответствует критериям пригодности (отклик сигнала интерферирующих пиков должен составлять не более 15 %). Хроматограммы нулевого и на уровне НПКО растворов эзомерпазола изображены на рисунке 3. Результаты селективности определения аналита представлены в таблице 4.

Таким образом, методика анализа является селективной, величина аналитического сигнала зависит только от концентрации аналита, материал аналитического фильтра и другие компоненты матрицы не оказывают какого-либо влияния на специфичность определения эзомерпазола магния тригидрата и ВС.

Калибровочная зависимость

Калибровочная зависимость – уравнение, адекватно описывающее зависимость аналитического сигнала (отклика инструмента) от концентрации аналита в калибровочных образцах, приготовленных на основе холостых образцов. В ходе валидации в разные дни были получены 3 калибровочные зависимости.

Калибровочная зависимость отношения площади пика эзомерпазола к площади пика ВС от величины отношения концентрации эзомерпазола магния тригидрата к концентрации ВС в калибровочном растворе для 1 аналитического цикла представлена на рисунке 4.

Линейность калибровочной зависимости в интервале 50–5000 нг/мл была оценена в трех сериях калибровочных образцов, она характеризовалась значением квадрата коэффициента линейной корреляции (R²) между аналитическим сигналом и концент-

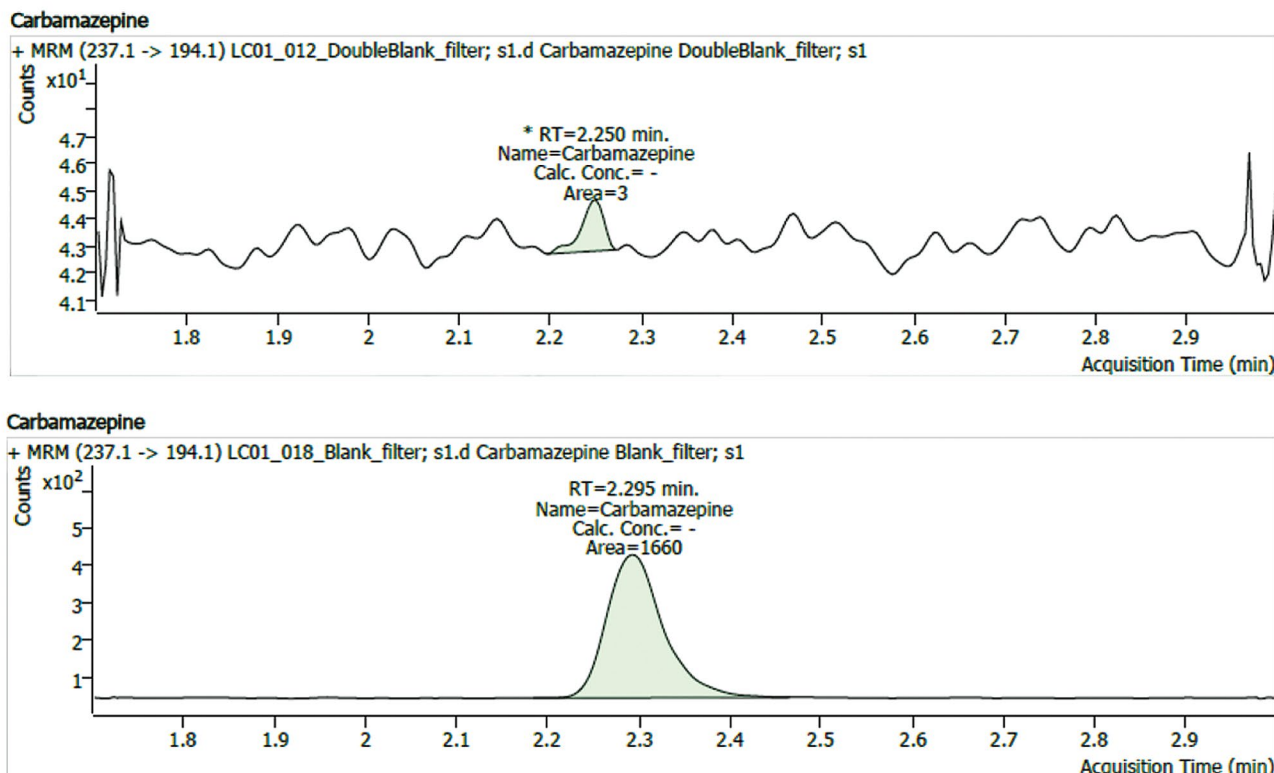


Рисунок 2. Хроматограммы холостого и нулевого растворов карбамазепина

Figure 2. Chromatograms of a blank and zero solutions of carbamazepine

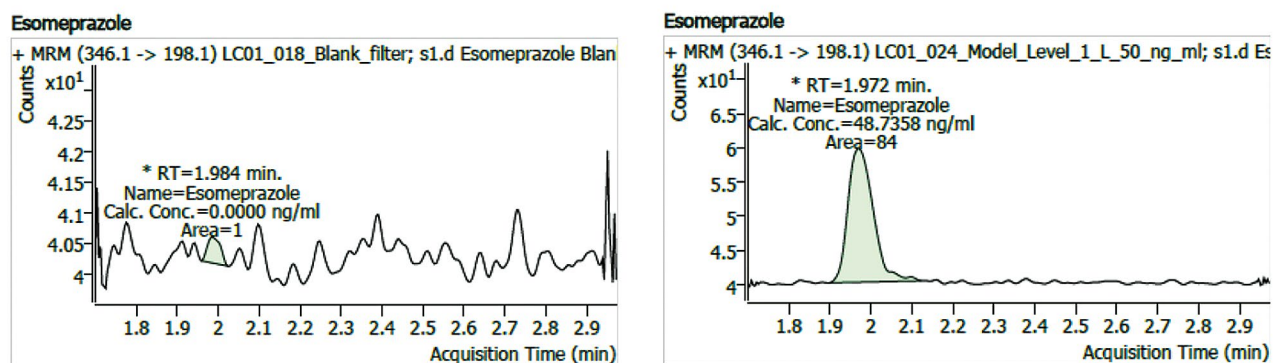


Рисунок 3. Хроматограммы нулевого и на уровне НПКО растворов эзомепразола

Figure 3. Chromatograms of zero and LLOQ solutions of esomeprazole

рацией аналита, составляющим не менее 0,9995, что соответствует критерию приемлемости (не менее 0,9970). Параметры линеаризации калибровочной зависимости представлены в таблице 5.

В трех аналитических циклах для всех уровней концентраций определяли точность и относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации – RSD, %). Результаты калибровки для трех циклов представлены в таблице 6. Точность – степень близости

результатов к «истинному» значению – находится в интервале от 92,8 до 106,1 %, что соответствует критерию приемлемости (не менее 85 % и не более 115 %). Оценочное значение RSD – степени разброса результатов – составляет не более 4,2 %, что соответствует критерию приемлемости (не более 15 %).

Таким образом, методика удовлетворяет критерию пригодности по показателю «линейная калибровочная зависимость».

Таблица 4. Селективность определения ВС и аналита
Table 4. Selectivity for carbamazepine and esomeprazole determination

Карбамазепин Carbamazepine				
№	S (Int. blank)	<S> (zero)	S(Int. blank) / <S>(zero)	Критерий пригодности Suitability criteria
1	3,275	1689,3	0,19 %	не более 5,0 % no more than 5.0 %
2	0,398		0,02 %	не более 5,0 % no more than 5.0 %
3	4,250		0,25 %	не более 5,0 % no more than 5.0 %
Эзомепразол Esomeprazole				
№	S(Int. zero)	<S> (LLOQ)	S(Int. zero) / <S>(LLOQ)	Критерий пригодности Suitability criteria
1	0,868	87,449	1,0 %	не более 15,0% no more than 15.0 %
2	1,026		1,2 %	не более 15,0% no more than 15.0 %
3	0,909		1,0 %	не более 15,0% no more than 15.0 %

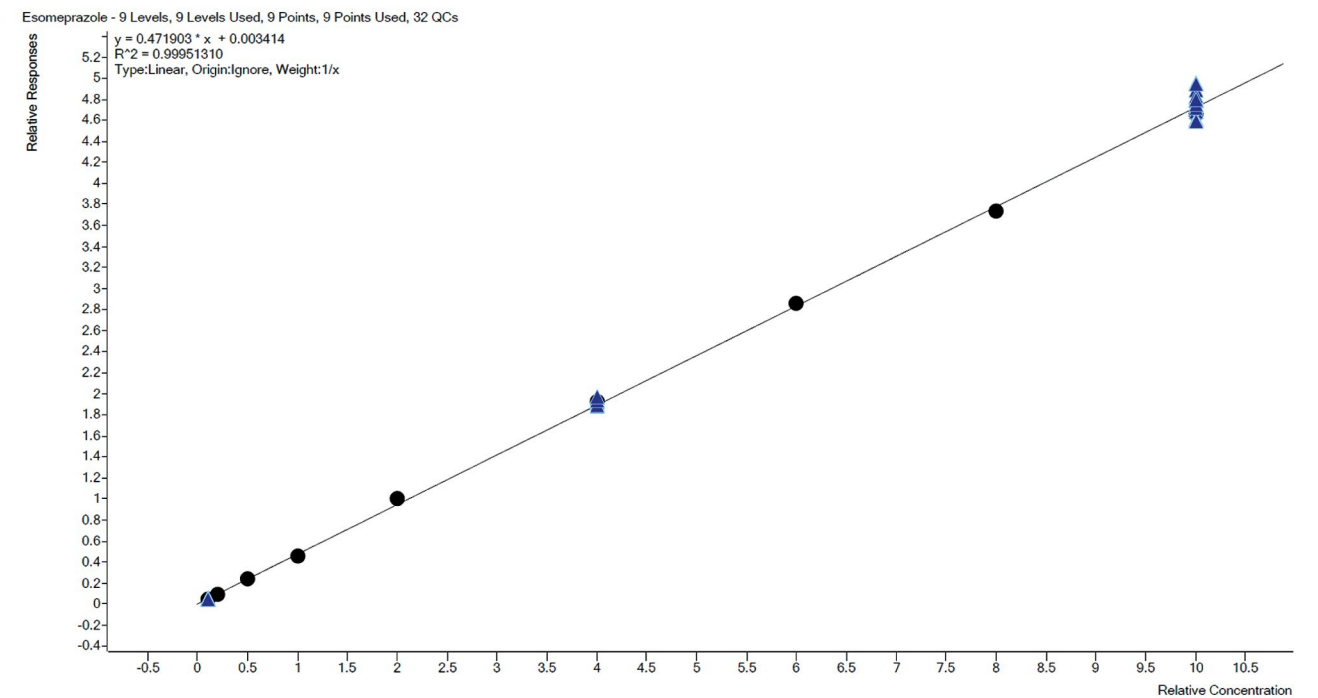


Рисунок 4. Калибровочный график для первого аналитического цикла
Figure 4. Calibration curve for the first analytical cycle

Правильность и прецизионность

Правильность аналитической методики отражает сходимость результатов анализа к действительному значению содержания аналита в исследуемом образце. Для характеристики правильности использовали параметр «точность».

Прецизионность отражает сходимость результатов параллельных определений аналита. Для характеристики прецизионности использовали коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение) результатов анализа испытуемого раствора.

Таблица 5. Параметры линейаризации калибровочной зависимости

Table 5. Parameters of calibration curve linearization

№	Интервал линейности, нг/мл Linearity interval, ng/mL	Уравнение калибровочной зависимости Calibration equation	R ²
1	50 ÷ 5000	$y = 0,471903 \cdot x + 0,003414$	0,99951310
2	50 ÷ 5000	$y = 0,674350 \cdot x + 0,000142$	0,99994638
3	50 ÷ 5000	$y = 0,582050 \cdot x - 0,000854$	0,99969906

Таблица 6. Результаты калибровки для трех циклов

Table 6. Calibration results for three cycles

№	Введено, нг/мл Inject, ng/mL	Среднее, n = 3, нг/мл Mean, n = 3, ng/mL	Точность, % Accuracy, %			RSD, %
			Цикл 1 Cycle 1	Цикл 2 Cycle 2	Цикл 3 Cycle 3	
1	50	50,9674	100,6	101,7	103,5	1,4
2	100	96,1605	96,3	99,4	92,8	3,5
3	250	253,1262	99,9	100,3	103,6	2,0
4	500	496,6344	96,5	98,4	103,1	3,4
5	1000	1014,3140	106,1	100,1	98,2	4,1
6	2000	2010,4970	102,0	100,1	99,5	1,3
7	3000	2998,6171	100,9	100,6	98,4	1,3
8	4000	3964,7066	99,0	99,1	99,3	0,2
9	5000	5014,9769	98,7	100,5	101,7	1,5

Правильность и прецизионность методики в каждом аналитическом цикле на трех хроматографических системах двумя группами в разные дни определяли методом добавок путем анализа растворов с введенным точным количеством эзомепразола магния тригидрата на низком (НПКО), среднем и высоком (ВПКО) уровне.

Внутрилабораторная правильность находится в интервале от 99,6 до 102,2 %, а межлабораторная – от 100,5 до 101,6 %, что соответствует критерию приемлемости (не менее 85 и не более 115 %). Внутрилабораторная прецизионность – не более 4,3 %, а межлабораторная – не более 5,8 %, что соответствует критерию приемлемости (не более 15 %). Результаты представлены в таблице 7.

Найденные значения точности и коэффициента вариации эзомепразола магния тригидрата в раст-

ворах в рамках одного аналитического цикла и между аналитическими циклами свидетельствуют о том, что методика дает правильные результаты и является прецизионной во всем аналитическом диапазоне методики.

Долгосрочная стабильность исследуемых образцов в условиях хранения

Оценку стабильности эзомепразола магния тригидрата на аналитическом фильтре в сухом виде в условиях продолжительного хранения при комнатной температуре (+25 °C), +(2–8) °C, –10 °C и –20 °C проводили при низком, среднем и высоком уровне содержания эзомепразола магния тригидрата в исследуемом образце. Результаты анализа представлены в таблице 8 как раскрываемость относительно соответствующих свежеприготовленных растворов.

Таблица 7. Внутри- и межлабораторная правильность и прецизионность

Table 7. Intra- and interlaboratory accuracy and precision

Введено, нг/мл Inject, ng/mL	Внутри цикла, n = 5 Intra-cycle, n = 5			Между циклами, n = 15 Inter-cycle, n = 15		
	Среднее, нг/мл Mean, ng/mL	Точность, % Accuracy, %	RSD, %	Среднее, нг/мл Mean, ng/mL	Точность, % Accuracy, %	RSD, %
50,0	50,3020	100,6	4,3	50,4413	100,9	5,8
2000,0	2044,6957	102,2	1,4	2009,4175	100,5	2,2
5000,0	4982,0501	99,6	3,3	5077,6627	101,6	2,7

Таблица 8. Стабильность при хранении
в течение 3 месяцев

Table 8. Stability during storage for 3 months

Введено, нг/мл Inject, ng/mL	Температура хранения, °C Storage temperature, °C	Точность, % Accuracy, %		
		1 месяц 1 month	2 месяца 2 months	3 месяца 3 months
50	плюс (25 ± 3) plus (25 ± 3)	104,9	114,5	102,9
	плюс (5 ± 3) plus (5 ± 3)	101,8	110,5	108,1
	минус (10 ± 3) minus (10 ± 3)	113,6	101,9	104,1
	минус (20 ± 3) minus (20 ± 3)	105,0	96,2	109,7
2000	плюс (25 ± 3) plus (25 ± 3)	104,2	103,9	103,2
	плюс (5 ± 3) plus (5 ± 3)	104,3	102,9	104,1
	минус (10 ± 3) minus (10 ± 3)	103,5	102,1	100,1
	минус (20 ± 3) minus (20 ± 3)	99,8	103,6	101,7
5000	плюс (25 ± 3) plus (25 ± 3)	101,2	97,9	97,1
	плюс (5 ± 3) plus (5 ± 3)	95,6	99,3	97,6
	минус (10 ± 3) minus (10 ± 3)	96,4	97,4	96,9
	минус (20 ± 3) minus (20 ± 3)	96,1	98,1	96,6

Раскрываемость полученных результатов соответствует критерию приемлемости (не менее 85 и не более 115 %) при хранении:

- 1 месяц находится в интервале от 95,6 до 113,6 %;
- 2 месяца находится в интервале от 96,2 до 114,5 %;
- 3 месяца находится в интервале от 96,6 до 109,7 %.

Таким образом, эзомепразола магния тригидрат при хранении на аналитических фильтрах в сухом виде стабилен в интервале температур от $-(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ до $+(25 \pm 3)^\circ\text{C}$ в течение трех месяцев.

Применение разработанной методики

На основе разработанной методики был проведен анализ 20 проб воздуха рабочей зоны. Пробы отбирались при производстве твердых лекарственных форм эзомепразола в виде таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Расчет концентраций проводили по градуировочной зависимости $y = 0,8236x + 0,0077$, которая представлена на рисунке 5.

Результаты и контроль соответствия гигиеническому нормативу (ОБУВ = 10 мкг/м³) приведены в таблице 9.

Таблица 9. Результаты анализа эзомепразола
в пробах воздуха

Table 9. Results of esomeprazole analysis in air samples

№	Концентрация в анализируемой пробе, нг/мл Concentration in the analyzed sample, ng/mL	Концентрация в воздухе, мкг/м³ Concentration in air, µg/m³	% от ОБУВ % of OEL	Контроль Control
1	0,218	0,003	0,03 %	Соответствует Compliant
2	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
3	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
4	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
5	86,286	3,313	33,13 %	Соответствует Compliant
6	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
7	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
8	165,623	6,321	63,21 %	Не соответствует Doesn't match
9	0,174	0,007	н/о n/d	Соответствует Compliant
10	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
11	70,094	1,505	15,05 %	Соответствует Compliant
12	8,967	0,193	1,93 %	Соответствует Compliant
13	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
14	8,870	0,191	1,91 %	Соответствует Compliant
15	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
16	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
17	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
18	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
19	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant
20	н/о n/d	н/о n/d	н/о n/d	Соответствует Compliant

Примечание. н/о – не обнаружено или ниже предела обнаружения.

Note. n/d – not detected or below detection limit.

В результате количественного определения эзомепразола в воздухе рабочей зоны выявлен один процесс, который требует внимания и проведения

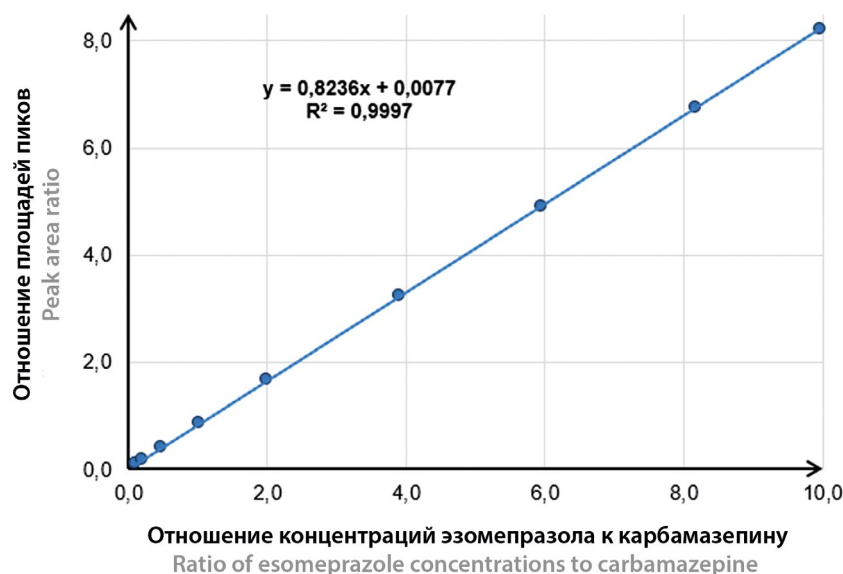


Рисунок 5. Калибровочный график

Figure 5. Calibration curve

оценки рисков, так как результат превышает допустимые 50 % ОБУВ. Остальные данные свидетельствуют о безопасности воздуха рабочей зоны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования разработана методика количественного определения эзомепразола в воздухе рабочей зоны методом ВЭЖХ-МС/МС. Установлен аналитический диапазон от 0,05 до 5,0 мкг/мл и соответствующий диапазон массовых концентраций в воздухе рабочей зоны 0,5–50,0 мкг/м³ при отборе 1 м³ воздуха. Такой диапазон обеспечивает необходимый контроль за безопасностью воздуха рабочей зоны. Проведенные исследования показали, что компоненты, входящие в состав лекарственного средства, не искажают результаты определения эзомепразола, а разработанная методика отвечает требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик».

Проведена оценка стабильности эзомепразола магния тригидрата на аналитических фильтрах в сухом виде, подтвержденная сохранением образцов при хранении при температурах от –20 °C до +25 °C в течение 3 месяцев. Это свидетельствует о надежности методики и возможности длительного хранения отобранных проб для последующего анализа.

Реализация разработанной методики позволила оценить безопасность воздуха рабочей зоны при производстве лекарственного средства в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой, содержащих эзомепразол. Полученные результаты подтвердили соответствие качества воздуха установленным гигиениче-

ским требованиям, что свидетельствует об обеспечении безопасности условий труда.

Также в результате исследования были выявлены технологические этапы, требующие дальнейшего совершенствования производственных процессов и усиления мер по охране труда. Дальнейшее развитие и внедрение предложенной методики позволит своевременно выявлять и предотвращать возможные риски для работников, а также повысит уровень производственной безопасности в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каразей Е. А. Ингибиторы протонной помпы в терапии кислотозависимых заболеваний: фокус на Эзомепразол. *Медицинские новости*. 2015;9:14–19.
2. Pyo Y.-C., Nguyen T. N., Lee Y.-S., Choi Y.-E., Park J.-S. Design of esomeprazole solid dispersion for improved dissolution and bioavailability using the supercritical anti-solvent technique. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;88:104889. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104889.
3. Rashid Z., Ranjha N. M., Rashid F., Raza H. Pharmacokinetic evaluation of microgels for targeted and sustained delivery of acid labile active pharmaceutical agent in animal model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;57:101770. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101770.
4. Yoo H. W., Hong S. J., Kim S. H. Helicobacter pylori Treatment and Gastric Cancer Risk After Endoscopic Resection of Dysplasia: A Nationwide Cohort Study. *Gastroenterology*. 2024;166(2):313–322. DOI: 10.1053/j.gastro.2023.10.013.
5. Pollmann L., Linnemann J., Pollmann N. S., Jürgens C., Schmeding M. Preoperative proton pump inhibitor therapy and anastomotic leak after esophagectomy—a new perspective. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2025;410:157. DOI: 10.1007/s00423-025-03727-3.

6. Юренев Г.Л., Парцвания-Виноградова Е.В., Лебедева Е.Г., Заборовский А.В., Тарарина Л.А. Возможности S-энантиомера классической молекулы омепразола (эзомерепразола) в лечении гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Consilium Medicum*. 2016;18(8):27–31.
7. Amin K.F.M. Greenness-sustainability metrics for assessment smart-chemometric spectrophotometric strategy for evaluation of the combination of six gastric proton-pump inhibitors with two selected impurities. *MethodsX*. 2024;12:102670. DOI: 10.1016/j.mex.2024.102670.
8. Carrouel F., Dziadzko M., Grégoire C., Galinski M., Dussart C., Lvovschi V.-E. Relevance of early management by proton-pump inhibitor in acute upper gastro-intestinal tract disorder: A scoping review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;167:115523. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115523.
9. Kumar A., Kumar R., Flanagan J., Långström B., Björndahl L., Darreh-Shori T. Esomeprazole reduces sperm motility index by targeting the spermic cholinergic machinery: A mechanistic study for the association between use of proton pump inhibitors and reduced sperm motility index. *Biochemical Pharmacology*. 2020;182:114212. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114212.
10. Helgadóttir H., Lund S.H., Björnsson E., Gizurarson S.S., Waldum H. Sa1208 – Serum Concentration and Pharmacokinetics of Single and Repeated Oral Doses of Esomeprazole and Gastrin Elevation in Healthy Males and Females. *Gastroenterology*. 2019;156(6):S-308. DOI: 10.1016/s0016-5085(19)37590-0.
11. Косман В.М., Карлина М.В., Мазукина Е.В., Глобенко А.А., Джайн Е.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Изучение безопасности и токсикокинетики препарата эзомепразол в доклинических исследованиях. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):176–190. DOI: 10.30895/2312-7821-2023-11-2-342.
12. Rao M.N., Krishna K.B.M., Babu B.H. Development and validation of a stability indicating HPLC method for the simultaneous analysis of esomeprazole and itopride in bulk and in capsules. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(02):072-080. DOI: 10.7324/japs.2016.60210.
13. Zanitti L., Ferretti R., Gallinella B., Torre F.L., Sanna M.L., Mosca A., Cirilli R. Direct HPLC enantioseparation of omeprazole and its chiral impurities: Application to the determination of enantiomeric purity of esomeprazole magnesium trihydrate. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010;52(5):665–671. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.02.021.
14. Liu R., Li P., Xiao J., Yin Y., Sun Z., Bi K., Li Q. A fast, sensitive, and high throughput method for the determination of esomeprazole in dog plasma by UHPLC-MS/MS: Application to formulation development of the compound preparation of esomeprazole. *Journal of Chromatography B*. 2017;1068–1069:352–357. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.11.002.
15. Lun J., Ma S., Xue M., Zhao P., Song, Y., Guo, X. Simultaneous enantiomeric analysis of five proton-pump inhibitors in soil and sediment using a modified QuEChERS method and chiral high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 2021;160:105625. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105625.
16. Пожарнов И.А., Симаков А.С., Шульга Н.А., Савченко А.Ю., Передеряев О.И., Сыркова Л.С., Медведев Ю.В., Фишер Е.Н. Гигиенический мониторинг загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами тикагрелора на фармацевтическом предприятии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):153–158. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-153-158.
17. Пожарнов И.А., Симаков А.С., Шатилина А.А., Раменская Г.В. Организация гигиенического мониторинга загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами на фармацевтических предприятиях (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):165–173. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-165-173.

REFERENCES

1. Karazei E. A. Proton pump inhibitors in the treatment of acid peptic disorders: focus on Esomeprazole. *Meditinskije novosti*. 2015;9:14–19. (In Russ.)
2. Pyo Y.-C., Nguyen T.N., Lee Y.-S., Choi Y.-E., Park J.-S. Design of esomeprazole solid dispersion for improved dissolution and bioavailability using the supercritical anti-solvent technique. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;88:104889. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104889.
3. Rashid Z., Ranjha N.M., Rashid F., Raza H. Pharmacokinetic evaluation of microgels for targeted and sustained delivery of acid labile active pharmaceutical agent in animal model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;57:101770. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101770.
4. Yoo H.W., Hong S.J., Kim S.H. Helicobacter pylori Treatment and Gastric Cancer Risk After Endoscopic Resection of Dysplasia: A Nationwide Cohort Study. *Gastroenterology*. 2024;166(2):313–322. DOI: 10.1053/j.gastro.2023.10.013.
5. Pollmann L., Linnemann J., Pollmann N.S., Jürgens C., Schmeding M. Preoperative proton pump inhibitor therapy and anastomotic leak after esophagectomy—a new perspective. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2025;410:157. DOI: 10.1007/s00423-025-03727-3.
6. Yurenev G. L., Partsvania-Vinogradova E. V., Lebedeva E. G., Zaborovskii A.V., Tararina L.A. Features of classical S-enantiomer of omeprazole molecules (esomeprazole) in the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Consilium Medicum*. 2016;18(8):27–31. (In Russ.)
7. Amin K.F.M. Greenness-sustainability metrics for assessment smart-chemometric spectrophotometric strategy for evaluation of the combination of six gastric proton-pump inhibitors with two selected impurities. *MethodsX*. 2024;12:102670. DOI: 10.1016/j.mex.2024.102670.
8. Carrouel F., Dziadzko M., Grégoire C., Galinski M., Dussart C., Lvovschi V.-E. Relevance of early management by proton-pump inhibitor in acute upper gastro-intestinal tract disorder: A scoping review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;167:115523. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115523.
9. Kumar A., Kumar R., Flanagan J., Långström B., Björndahl L., Darreh-Shori T. Esomeprazole reduces sperm motility index by targeting the spermic cholinergic machinery: A mechanistic study for the association between use of proton pump inhibitors and reduced sperm motility index. *Biochemical Pharmacology*. 2020;182:114212. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114212.

10. Helgadóttir H., Lund S. H., Björnsson E., Gizurarson S. S., Waldum H. Sa1208 – Serum Concentration and Pharmacokinetics of Single and Repeated Oral Doses of Esomeprazole and Gastrin Elevation in Healthy Males and Females. *Gastroenterology*. 2019;156(6);S-308. DOI: 10.1016/s0016-5085(19)37590-0.
11. Kosman V. M., Karlina M. V., Mazukina E. V., Globenko A. A., Jain E. A., Makarova M. N., Makarov V. G. Preclinical evaluation of esomeprazole safety and toxicokinetics. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):176–190. (In Russ.) DOI: 10.30895/2312-7821-2023-11-2-342.
12. Rao M. N., Krishna K. B. M., Babu B. H. Development and validation of a stability indicating HPLC method for the simultaneous analysis of esomeprazole and itopride in bulk and in capsules. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(02):072-080. DOI: 10.7324/japs.2016.60210.
13. Zanitti L., Ferretti R., Gallinella B., Torre F. L., Sanna M. L., Mosca A., Cirilli R. Direct HPLC enantioseparation of omeprazole and its chiral impurities: Application to the determination of enantiomeric purity of esomeprazole magnesium trihydrate. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010;52(5):665–671. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.02.021.
14. Liu R., Li P., Xiao J., Yin Y., Sun Z., Bi K., Li Q. A fast, sensitive, and high throughput method for the determination of esomeprazole in dog plasma by UHPLC–MS/MS: Application to formulation development of the compound preparation of esomeprazole. *Journal of Chromatography B*. 2017;1068–1069:352–357. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.11.002.
15. Lun J., Ma S., Xue M., Zhao P., Song, Y., Guo, X. Simultaneous enantiomeric analysis of five proton-pump inhibitors in soil and sediment using a modified QuEChERS method and chiral high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 2021;160:105625. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105625.
16. Pozharnov I. A., Simakov A. S., Shulga N. A., Savchenko A. Yu., Perederyaev O. I., Synkova L. S., Medvedev Yu. V., Fisher E. N. Hygienic monitoring of working area air pollution by particulate matter of ticagrelor in the pharmaceutical factory. *Drug development & registration*. 2022;11(2):153–158. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-153-158.
17. Pozharnov I. A., Simakov A. S., Shatilina A. A., Ramenskaya G. V. Organization of hygienic monitoring of working area air pollution by particulates in pharmaceutical industries (review). *Drug development & registration*. 2022;11(1):165–173. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-165-173.



Влияние глицирризиновой кислоты на функцию нейромоторного аппарата у лептинрезистентных мышей

Т. М. Матузок^{1, 2✉}, В. А. Приходько^{1, 2}, С. М. Напалкова¹,
О. В. Буюклинская¹, С. В. Оковитый^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева Российской академии наук (ИМЧ РАН). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 9

✉ Контактное лицо: Матузок Татьяна Максимовна. E-mail: matuzok.tatyana@pharminnotech.com

ORCID: Т. М. Матузок – <https://orcid.org/0000-0002-1640-016X>;
В. А. Приходько – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>;
С. М. Напалкова – <https://orcid.org/0000-0003-0913-9116>;
О. В. Буюклинская – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>;
С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Статья поступила: 03.02.2025

Статья принята в печать: 09.07.2025

Статья опубликована: 11.07.2025

Резюме

Введение. Сахарный диабет 2 типа (СД-2) имеет большое число осложнений, одним из которых является периферическая полинейропатия, усугубляющаяся с возрастом. Ввиду этого представляется актуальным поиск препаратов, способных эффективно корригировать полинейропатию на фоне СД-2.

Цель. Изучение влияния глицирризиновой кислоты (ГК) (20 мг/кг/д) при курсовом введении (1 мес.) на нейромоторную функцию у разновозрастных лептинрезистентных диабетических мышей-самок *db/db* методом стимуляционной электронейромиографии (ЭНМГ).

Материалы и методы. Исследование проводили на мышах-самках линии *C57Bl/Ks-db^{+/+}m (db/db)* массой 40–48 г возрастом 2 (*n* = 15) и 6 мес. (*n* = 10), рандомизированных на группы: 1) контроль (К) (2 мес. (К2): *n* = 7; 6 мес. (К6): *n* = 5); 2) группа, получавшая ГК (20 мг/кг/д внутрь × 1 мес.) (2 мес. (ГК2): *n* = 8; 6 мес. (ГК6): *n* = 5). По истечении 1 мес. проводили исследование электрической активности икроножной мышцы и двуглавой мышцы плеча методом ЭНМГ в следующих режимах: стимуляция одиночными стимулами, электростимуляционное утомление (ЭСУ), ритмическая стимуляция. Также исследовали скорость проведения импульса (СПИ) по седалищному нерву.

Результаты и обсуждение. В группе ГК2 максимальные амплитуда ($p < 0,05$) и площадь ($p < 0,01$) М-ответов двуглавой мышцы плеча были на 37,4 и 44,5 % ниже по сравнению с группой К2 соответственно, что, вероятно, может объясняться тем, что длительный прием ГК может вызывать гипокалиемию, в том числе в связи с ингибированием 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы 2-го типа. Относительно менее выраженное снижение данных показателей в группе ГК6 потенциально объясняется меньшей базальной активностью ферментативных систем у возрастных животных. Длительность М-ответа двуглавой мышцы плеча была на 21,7 % ниже ($p < 0,05$) в группе К6 по сравнению с группой К2, а значения пороговой силы тока в группах ГК2 и К6 на 48,4 и 50,4 % соответственно ($p < 0,01$ для обеих групп) превышали таковые в группе К2. Уменьшение длительности М-ответа и увеличение пороговой силы тока, вероятно, связаны с возрастными изменениями, включающими гибель части мышечных волокон и сокращение числа моторных единиц.

Заключение. ГК (20 мг/кг/д внутрь × 1 мес.) у молодых взрослых (2 мес.) лептинрезистентных мышей-самок снижала максимальные амплитуду и площадь М-ответов двуглавой мышцы плеча в режиме стимуляции одиночными стимулами. Исследуемое вещество не влияло на СПИ по седалищному нерву и процессы восстановления после ЭСУ икроножной мышцы и двуглавой мышцы плеча как у 2-, так и у 6-месячных животных.

Ключевые слова: глицирризиновая кислота, сахарный диабет 2 типа, старение, гепатопротекторы, электронейромиография

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

Вклад авторов. С. В. Оковитый, О. В. Буюклинская – идея и планирование эксперимента. Т. М. Матузок, В. А. Приходько – проведение экспериментов и обработка данных. В. А. Приходько – подготовка иллюстраций. В. А. Приходько, С. М. Напалкова, О. В. Буюклинская, С. В. Оковитый – подготовка и редакция рукописи.

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

Для цитирования: Матузок Т. М., Приходько В. А., Напалкова С. М., Буюклинская О. В., Оковитый С. В. Влияние глицирризиновой кислоты на функцию нейромоторного аппарата у лептинрезистентных мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):160–167. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2030>

Effects of glycyrrhizinic acid on neuromotor function in leptin-resistant mice

Tatyana M. Matuzok^{1,2}✉, Veronika A. Prikhodko^{1,2}, Svetlana M. Napalkova¹, Olga V. Buyuklinskaya¹, Sergey V. Okovityi^{1,2}

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² N. P. Behtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences. 9, Akademika Pavlova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Tatyana M. Matuzok. **E-mail:** matuzok.tatyana@pharminnotech.com

ORCID: Tatyana M. Matuzok – <https://orcid.org/0000-0002-1640-016X>;
Veronika A. Prikhodko – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>;
Svetlana M. Napalkova – <https://orcid.org/0000-0003-0913-9116>;
Olga V. Buyuklinskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>;
Sergey V. Okovityi – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Received: 03.02.2025

Accepted: 09.07.2025

Published: 11.07.2025

Abstract

Introduction. Among all types, type 2 diabetes mellitus (T2DM) shows the most rapidly growing prevalence, and has the greatest number of complications including peripheral polyneuropathy, which is aggravated with age. In view of this, the search for effective agents for the correction of T2DM-associated polyneuropathy is highly relevant.

Aim. To study the effects of course administration (1 month) of glycyrrhizinic acid (GA) (20 mg/kg/d) on neuromotor function in female leptin-resistant diabetic *db/db* mice of different ages using stimulation electroneuromyography (ENMG).

Materials and methods. The study was conducted in female C57Bl/Ks-*db^{+/+}m (db/db)* mice weighing 40–48 g, aged 2 months ($n = 15$) or 6 months ($n = 10$) that were randomized into 4 groups: 1) control (C) (2 months (C2): $n = 7$; 6 months (C6): $n = 5$); 2) GA-treated (20 mg/kg/d p/o $\times$ 1 month) (2 months (GA2): $n = 8$; 6 months (GA6): $n = 5$). Following 1 month of treatment, an ENMG study of *m. gastrocnemius* and *m. biceps brachii* electrical activity was conducted using the following protocols: single stimulus presentation, electrical stimulation-induced fatigue, and repetitive stimulation. Additionally, nerve conduction velocity (NCV) was measured for *n. ischiadicus*.

Results and discussion. In the GA2 group, compound muscle action potential (CMAP) peak amplitude and area in the biceps were 37.4 % ($p < 0.05$) and 44.5 % ($p < 0.01$) lower than respective control values, which may be related to possible hypokalemia induced by long-term GA use, including that resulting from 11β -hydroxysteroid dehydrogenase-2 inhibition. The relatively smaller reduction of the same parameters observed in the GA6 group may be explained by lower basal enzyme activity in aged animals. CMAP durations in the biceps were 21.7 % lower in the C6 group vs. C2 ($p < 0.05$), while threshold current values were 48.4 and 50.4 % higher in both GA2 and C6 groups vs. C2 ($p < 0.01$ for both). The decrease in CMAP duration and increase in threshold currents possibly reflects age-associated changes including muscle fiber and motor unit loss.

Conclusion. GA (20 mg/kg/day $\times$ 1 months) in young adult (2 months) female leptin-resistant mice reduced single stimulus-induced CMAP amplitude and area in the biceps muscle. The compound had no effect on sciatic NCV and post-ESIF recovery rates of the gastrocnemius and biceps in both 2 month- and 6 month-old mice.

Keywords: glycyrrhizinic acid, type 2 diabetes mellitus, non-alcoholic fatty liver disease, aging, hepatoprotectors, electroneuromyography

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

Contribution of the authors. Sergey V. Okovityi, Olga V. Buyuklinskaya – study conceptualization. Tatyana M. Matuzok, Veronika A. Prikhodko – experiment conduction and data analysis. Veronika A. Prikhodko – figure processing. Veronika A. Prikhodko, Svetlana M. Napalkova, Olga V. Buyuklinskaya, Sergey V. Okovityi – text writing and editing.

Funding. The study was carried out using the equipment of the Collective Use Center "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education St. Petersburg Chemical Federal University of the Ministry of Health of the Russian Federation" under agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

For citation: Matuzok T. M., Prikhodko V. A., Napalkova S. M., Buyuklinskaya O. V., Okovityi S. V. Effects of glycyrrhizic acid on neuromotor function in leptin-resistant mice. *Drug development & registration*. 2025;14(3):160–167. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2030>

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет 2 типа (СД-2) является социально значимым неинфекционным заболеванием, распространенность которого растет год от года¹. У 30–50 % больных осложнением СД-2 является полинейропатия, которая характеризуется поражением периферических нервов и нарушением нервно-мышечной передачи [1]. Возникающая на фоне нейропатии и мышечной атрофии двигательная дисфункция проявляется слабостью мышц нижних конечностей, мелким тремором и повышенной мышечной утомляемостью [2].

В качестве модели генетически детерминированного СД-2 могут быть использованы мыши линии C57Bl/Ks-*db⁺/m* (*Lepr^{db/db}*, *db/db*) [3], демонстрирующие резистентность к лептину, обусловленную аутосомно-рецессивной мутацией в гене его рецептора [4]. По данным А. А. Ф. Сима и соавторов, у *db/db* наблюдаются признаки диабетической полинейропатии с дисфункцией аксонов двигательных нервов, истончением и демиелинизацией моторных и сенсорных нервных волокон, замедлением расслабления скелетных мышц после сокращения [5]. Таким образом, данная экспериментальная модель может быть применима не только для изучения звеньев патогенеза СД-2, но и для оценки влияния различных веществ на его течение и развитие осложнений.

Средняя продолжительность жизни мышей *db/db* без лечения находится на уровне 0,96 и 1,33 года для самцов и самок соответственно [6]. Во второй половине жизни у *db/db* прогрессирует ожирение, возрастает гипергликемия [7], усугубляются нейрональные поражения [8], замедляются процессы регенерации тканей [9]. В то же время характер нарушений биоэлектрической активности скелетных мышц и нервно-мышечной передачи у данной линии мышей изучен недостаточно.

¹ Клинические рекомендации. Сахарный диабет 2 типа у взрослых. Доступно по: https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/all/proektnyj_ofis_pacientov_s_saharnym_diabetom/materialy/normativno_pravovye_dokumenty/saharnyj_diabet_2_tipa_u_vzroslyh.pdf. Ссылка активна на 03.02.2025.

Глицирризиновая кислота (ГК) – гепатопротекторное средство, обладающее антиоксидантной и антифибротической активностью, способное стабилизировать мембраны гепатоцитов, замедлять их некроз и апоптоз [10]. Нейропротекторное действие ГК связано с модуляцией работы внутренней антиоксидантной системы митохондрий и ингибированием апоптоза клеток [11]. ГК снижает внутриклеточное содержание активных форм кислорода, уменьшает соотношение проапоптотического белка Вах к антиапоптотическому белку Bcl-2 [11] и активирует сигнальные пути фосфатидилинозитол-3-киназы, протеинкиназы В и мишени рапамицина млекопитающих, что способствует ингибированию апоптоза и стимуляции пролиферации клеток [12], а также увеличивает активность антиоксидантных ферментов каталазы и глутатионпероксидазы [13].

Основной метаболит ГК 18β-глицирретиновая кислота в эксперименте на мышах улучшала энергетический метаболизм скелетных мышц, снижала выраженность оксидативного стресса и повышала эффективность высокоинтенсивных физических нагрузок [14]. Тем не менее потенциальное влияние ГК на функцию нейромоторного аппарата при ожирении, метаболическом синдроме и/или СД-2 остается мало охарактеризованным.

В связи с вышесказанным целью настоящего исследования стало изучение влияния ГК при курсовом применении на параметры электрической активности скелетных мышц и периферических нервов у молодых взрослых (2 мес.) и пожилых (6 мес.) мышей *db/db* методом стимуляционной электронейромиографии (ЭНМГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. 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 СПбХФУ Минздрава России. Эксперименты были выполнены на 15 молодых взрослых

(2 мес.) и 10 пожилых (6 мес.) мышах-самках линии C57Bl/Ks-db^{+/+}m (db/db) массой 40–45 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России одной партией и прошедших карантин в течение 14 дней. Мыши получали «Полнораационный комбикорм для лабораторных животных» (ООО «Лаборторм», Россия) и воду, соответствующую требованиям ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая». Доступ к корму и воде был обеспечен *ad libitum*.

Дизайн эксперимента. Непосредственно перед началом эксперимента мыши были рандомизированы на группы: 1) контроль (К) [2 мес. (К2): $n = 7$; 6 мес. (К6): $n = 5$]; 2) группа, получавшая ГК [2 мес. (ГК2): $n = 8$; 6 мес. (ГК6): $n = 5$].

Группы ГК2 и ГК6 получали ГК (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия) в дозе 20 мг/кг/д [14] в виде свежеприготовленной водной суспензии, группы К2 и К6 – эквивалентные количества 0,9%-го раствора хлорида. Все препараты вводили внутривентрикулярно с помощью зонда 1 р/д в течение 1 мес.

По окончании 1 мес. лечения проводили исследование методом стимуляционной ЭНМГ с помощью 4-канального электронейромиографа «Нейро-МВП-8» и программы «Нейро-МВП.NETw» 3.7.3.7 (ООО «Нейрософт», Россия) с предварительной наркотизацией хлоралгидратом (380 мг/кг внутривентрикулярно; MilliporeSigma, США).

В режиме стимуляции одиночными стимулами регистрировали М-ответы икроножной мышцы *m. gastrocnemius* на стимуляцию седалищного нерва *n. ischiadicus* слева. Мышь фиксировали в положении лежа на брюшке; установку электродов и стимуляцию нервных волокон осуществляли по ранее описанному протоколу [15]. 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.

Пробу с электростимуляционным утомлением (ЭСУ) *m. gastrocnemius* проводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [15].

Для оценки возможных нарушений нейромышечной передачи измеряли величину декремента амплитуды (ДА; %) 2-го, 5-го и 10-го М-ответов относительно 1-го ответа *m. gastrocnemius* на ритмическую стимуляцию *n. ischiadicus* или *m. biceps brachii* – на стимуляцию *n. musculocutaneus* с частотами 1, 3, 10 и 30 Гц [16].

Скорость проведения импульса (СПИ) (м/с) по левому *n. ischiadicus* измеряли по методике Schulz et al. [17]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc., США). При нормальном распределении количественных признаков (по критерию Шапиро – Уилка) значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного ANOVA с *post-hoc*-тестом

по Шидаку (для пар К2-К6, ГК2-ГК6, К2-ГК2, К6-ГК6), при ненормальном распределении – с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса с *post-hoc*-тестом по Данну (для тех же пар). Значимость различий между частотами встречаемости низких (< –10 %) значений ДА в группах оценивали с помощью точного теста Фишера. Порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$. Числовые данные на рисунках 1, 2 представлены в виде средних арифметических, планки погрешностей отражают стандартные ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Максимальная амплитуда ($p < 0,05$) и площадь ($p < 0,01$) М-ответов *m. biceps brachii* на непрямую стимуляцию одиночными стимулами в группе ГК2 были ниже на 37,39 и 44,48 % по сравнению с группой К2 соответственно. Длительность М-ответа *m. biceps brachii* при супрамаксимальной стимуляции была на 21,7 % ниже в группе К6 по сравнению с группой К2 ($p < 0,05$). Значения пороговой силы тока в группах ГК2 и К6 превышали на 48,4 и 50,38 % таковые в группе К2 соответственно ($p < 0,01$ для обеих групп) (рисунок 1). Значения латентности ответов и сил тока, вызвавших ответы с максимальными амплитудами, для всех групп оставались неизменными.

Животные всех экспериментальных групп демонстрировали одинаковую динамику восстановления амплитуды М-ответов обеих мышц после проведения ЭСУ.

Средние значения ДА 2-го, 5-го и 10-го М-ответов относительно 1-го М-ответа обеих мышц значительно не различались между экспериментальными группами при всех используемых частотах электростимуляции. В физиологически нормальном диапазоне ± 10 % во всех группах находилось не менее 70 % значений; частоты встречаемости аномальных значений приведены в таблице 1.

С учетом наблюдаемой дисперсии и малого объема выборки считаем, что формально выходящие за пределы физиологически нормального диапазона средние значения ДА можно отнести на счет случайной ошибки и артефактов регистрации.

Среди экспериментальных животных (в группе К6) была выявлена только одна мышь, демонстрировавшая стойкий ДА < –10 % всех анализируемых ответов *m. gastrocnemius* (но не *m. biceps brachii*) при всех частотах стимуляции. Обращала на себя внимание несколько большая частота встречаемости значений ДА < –10 % ответов *m. biceps brachii* в группе К2 по сравнению с группами ГК2 и К6, однако сравнительно небольшая численность групп не позволила результату сравнения с помощью точного теста Фишера достичь статистической значимости. Средние значения СПИ по *n. ischiadicus* значительно не различались между экспериментальными группами.

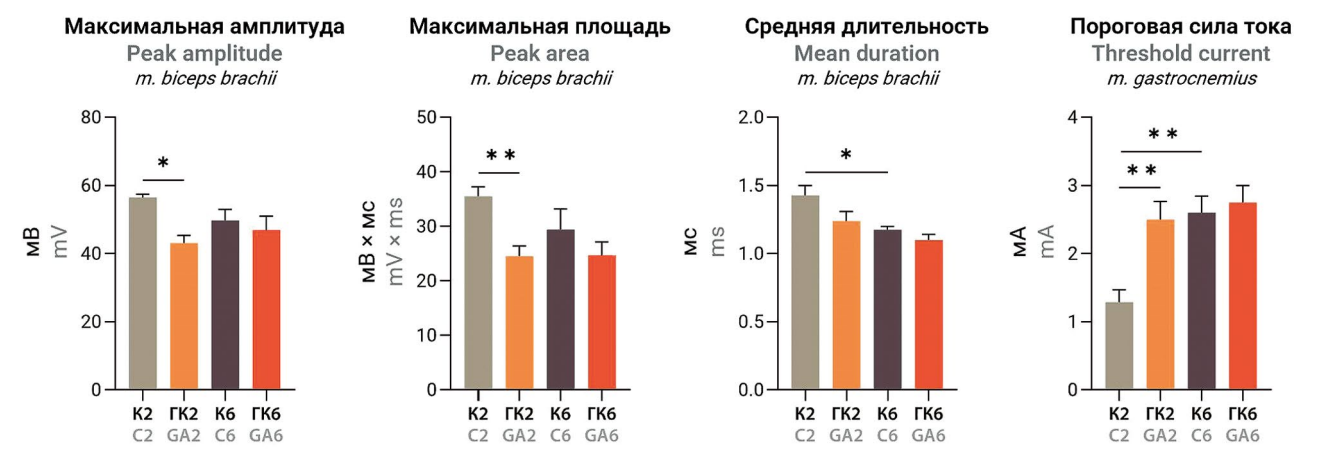


Рисунок 1. Параметры М-ответов *m. gastrocnemius* и *m. biceps brachii* на стимуляцию соответствующих нервов. К2 – контроль (2 мес.); GK2 – глицирризиновая кислота (2 мес.); К6 – контроль (6 мес.); GK6 – глицирризиновая кислота (6 мес.); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Figure 1. Parameters of compound muscle action potentials induced in *m. gastrocnemius* and *m. biceps brachii* by corresponding nerve stimulation.

C2 – control (2 months); GA2 – glycyrrhizic acid (2 months); C6 – control (6 months); GA6 – glycyrrhizic acid (6 months); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Таблица 1. Аномальные значения декремента амплитуды М-ответов мышц на ритмическую электростимуляцию
Table 1. Abnormal compound muscle action potential amplitude decrements under repetitive electrical stimulation (all frequencies)

Группа Group	Мышца Muscle	Число (%) индивидуальных аномальных значений декремента амплитуды Number (%) of individual abnormal amplitude decrement values		
		> +10 %	< –10 %	Всего Total
К2 C2	<i>m. biceps brachii</i>	0 (0,0 %)	29 (25,9 %)	29 (25,9 %)
	<i>m. gastrocnemius</i>	7 (6,3 %)	5 (4,5 %)	12 (10,7 %)
ГК2 GA2	<i>m. biceps brachii</i>	0 (0,0 %)	2 (1,8 %)	2 (1,8 %)
	<i>m. gastrocnemius</i>	9 (8,0 %)	5 (4,5 %)	14 (12,5 %)
К6 C6	<i>m. biceps brachii</i>	3 (2,7 %)	3 (2,7 %)	6 (5,4 %)
	<i>m. gastrocnemius</i>	4 (3,6 %)	7 (6,3 %)	11 (9,8 %)
ГК6 GA6	<i>m. biceps brachii</i>	13 (11,6 %)	10 (8,9 %)	23 (20,5 %)
	<i>m. gastrocnemius</i>	10 (8,9 %)	2 (1,8 %)	12 (10,7 %)

Примечание. К2 – контроль (2 мес.). К6 – контроль (6 мес.). GK6 – глицирризиновая кислота (6 мес.).

Note. C2 – control (2 months). C6 – control (6 months). GA6 – glycyrrhizic acid (6 months).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе было исследовано влияние возрастных изменений и курсового введения ГК в дозе 20 мг/кг/д на параметры электрической активности скелетных мышц, процессы посттетанического восстановления их сократимости и состояние нейромышечной передачи у мышей *db/db* в возрасте 2 и 6 месяцев с помощью стимуляционной ЭНМГ.

ЭНМГ является одним из современных методов диагностики функции периферической нервной системы и ее сопряжения со скелетными мышцами [18].

В режиме стимуляции одиночными стимулами наблюдали увеличение длительности М-ответов (*m. biceps brachii*) и порога раздражения (*m. gastrocnemius*) у молодых животных К2 по сравнению с пожилыми особями К6. Полученные данные, вероятно, могут го-

ворить о возрастных изменениях со стороны периферической нервной системы, включая уменьшение количества миелинизированных и немиелинизированных волокон, снижение экспрессии белков миелина (рибосомального фосфобелка, периферического миелинового белка-22, основного белка миелина), а также аксональную атрофию, связанную с замедлением транспорта белков цитоскелета [19].

Также в процессе старения снижается мышечная масса, сопровождающаяся уменьшением количества и – в меньшей степени – размера мышечных волокон. Предполагается, что ключевую роль в мышечной деградации играет митохондриальная дисфункция. Деструктивный процесс может усугубляться при наличии ожирения, СД-2 и гиподинамии, наблюдаемых у *db/db* [20].

Уменьшение длительности М-ответов и увеличение пороговой силы тока были характерными изменениями, ассоциированными с возрастом у мышей *db/db*. Гибель мышечных волокон и сокращение числа активных моторных единиц могут приводить к десинхронизации единичных потенциалов действия и снижению длительности суммарного ответа [21].

Сохранение нормальной скорости распространения возбуждения по седалищному нерву, предположительно, позволяет исключить наличие у мышей обоих возрастов тяжелой миопатии. Тем не менее снижение максимальной амплитуды и площади М-ответов, а также повышение пороговой силы тока при применении ГК могут быть интерпретированы как начальные, субклинические признаки поражения скелетных мышц [22]. Снижение максимальной амплитуды и площади М-ответов *m. biceps brachii* у мышей ГК2 по сравнению с К2, возможно, связано с тем, что длительный прием ГК может вызывать определенные электролитные изменения в мышечной ткани [23]. Сравнительно меньшая выраженность наблюдаемых изменений в группах 6-месячных мышей может быть объяснена меньшей базальной активностью ферментативных систем у пожилых животных [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у пожилых (6 мес.) лептинрезистентных мышей-самок *db/db* при ЭНМГ-исследовании наблюдали начальные признаки поражения мышечных волокон. Глицерризиновая кислота (20 мг/кг/д внутрь × 1 мес.) не влияла на скорость проведения импульса по *n. ischiadicus* и процессы восстановления после электростимуляционного восстановления *m. gastrocnemius* и *m. biceps brachii* как у молодых (2 мес.), так и у пожилых (6 мес.) мышей. Исследуемое вещество у 2-месячных (но не у пожилых) животных снижало максимальную амплитуду и площадь М-ответов *m. biceps brachii*, что, предположительно, может быть связано с электролитными изменениями в мышечной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ziegler D., Papanas N., Schnell O., Nguyen B.D.T., Nguyen K.T., Kulankrakorn K., Chaicharn. Current concepts in the management of diabetic polyneuropathy. *Journal of Diabetes Investigation*. 2021;12(4):464–475. DOI: 10.1111/jdi.13401.
2. Bianchi L., Volpato S. Muscle dysfunction in type 2 diabetes: a major threat to patient's mobility and independence. *Acta Diabetologica*. 2016;53:879–889. DOI: 10.1007/s00592-016-0880-y.
3. Степанова О. И., Каркищенко В. Н., Баранова О. В. Семёнов Х. Х., Бескова Т. Б., Галахова Т. В., Онищенко Н. А., Касинская Н. В. Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsJYLeprdb/+. *Биомедицина*. 2009;1(2):28–40.
4. Liu J., Lai F., Hou Y., Zheng R. Leptin signaling and leptin resistance. *Medical Review*. 2022;2(4):363–384. DOI: 10.1515/mr-2022-0017.
5. Sima A.A., Robertson D.M. Peripheral neuropathy in mutant diabetic mouse [C57BL/Ks (db/db)]. *Acta Neuropathologica*. 1978;41(2):85–89.
6. Sataranatarajan K., Ikeno Y., Bokov A., Feliers D., Yalaman-chili H., Lee H.J., Mariappan M.M., Tabatabai-Mir H., Diaz V., Prasad S., Javors M. A., Ghosh Choudhury G., Hubbard G. B., Barnes J. L., Richardson A., Kasinath B. S. Rapamycin Increases Mortality in *db/db* Mice, a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2016;71(7):850–857. DOI: 10.1093/gerona/glv170.
7. Hummel K.P., Dickie M.M., Coleman D.L. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*. 1966;153(3740):1127–1128. DOI: 10.1126/science.153.3740.1127.
8. Zhang J., Zhang Y., Yuan Y., Liu L., Zhao Y., Wang X. Gut Microbiota Alteration Is Associated With Cognitive Deficits in Genetically Diabetic (Db/db) Mice During Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;13:815562. DOI: 10.3389/fnagi.2021.815562.
9. Brem H., Tomic-Canic M., Entero H., Hanflik A. M., Wang V. M., Fallon J. T., Ehrlich H. P. The synergism of age and *db/db* genotype impairs wound healing. *Experimental Gerontology*. 2007;42(6):523–531. DOI: 10.1016/j.exger.2006.11.018.
10. Оковитый С. В., Райхельсон К. Л., Волнухин А. В., Кудлай Д. А. Гепатопротекторные свойства глицерризиновой кислоты. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2020;(12):96–108. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-184-12-96-108.
11. Kao T.-C., Shyu M.-H., Yen G.-C. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetinic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(2):754–761. DOI: 10.1021/jf802864k.
12. Qu L., Chen C., He W., Chen Y., Li Y., Wen Y., Zhou S., Jiang Y., Yang X., Zhang R., Shen L. Glycyrrhizic acid ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating autophagy through the PI3K/AKT/mTOR pathway. *American Journal of Translational Research*. 2019;11(4):2042–2055.
13. Ban J.Y., Park H.K., Kim S.K. Effect of glycyrrhizic acid on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *International Neuropsychology Journal*. 2020;24(1):548–55. DOI: 10.5213/inj.2040154.077.

14. Ma X., Chen H., Cao L., Zhao S., Zhao C., Yin S., Hu H. 18 β -glycyrrhetic acid improves high-intensity exercise performance by promoting glucose-dependent energy production and inhibiting oxidative stress in mice. *Phytotherapy Research*. 2021;35(12):6932–6943. DOI: 10.1002/ptr.7310.
15. Приходько В. А., Матузок Т. М., Гришина А. Ю., Ковансков 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1997.
16. Приходько В. А., Матузок Т. М. Резистентность к лептину приводит к изменению чувствительности к ипидакрину у мышей *db/db*. В сб.: III Международная научно-практическая конференция «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования». 2023. С. 231–236.
17. Schulz A., Walther C., Morrison H., Bauer R. In vivo electrophysiological measurements on mouse sciatic nerves. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;(86):51181. DOI: 10.3791/51181.
18. Морозов А. М., Сорокикова Т. В., Минакова Ю. Е., Беляк М. А. Электронейромиография: современный взгляд на возможности применения (обзор литературы). *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье*. 2022;3(57):107–116. DOI: 10.20340/vmi-rvz.2022.3.CLIN.6.
19. Verdú E., Ceballos D., Vilches J. J., Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 200;5(4):191–208. DOI: 10.1111/j.1529-8027.2000.00026.x.
20. Mankowski R. T., Anton S. D., Aubertin-Leheudre M. The role of muscle mass, muscle quality, and body composition in risk for the metabolic syndrome and functional decline in older adults. *Current Geriatrics Reports*. 2015;4:221–228. DOI: 10.1007/s13670-015-0132-y.
21. Anand N. S., Chad D. Electrophysiology of Myopathy. In: Blum A. S., Rutkove S. B., editors. *The Clinical Neurophysiology Primer*. New Jersey: Humana Totowa; 2007. P. 325–351. DOI: 10.1007/978-1-59745-271-7_20.
22. Paganoni S., Amato A. Electrodiagnostic evaluation of myopathies. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*. 2013;24(1):193–207. DOI: 10.1016/j.pmr.2012.08.017.
23. Nazari S., Rameshrad M., Hosseinzadeh H. Toxicological effects of *Glycyrrhiza glabra* (licorice): a review. *Phytotherapy research*. 2017;31(11):1635–1650. DOI: 10.1002/ptr.5893.
24. Yoshino T., Shimada S., Homma M., Makino T., Mimura M., Watanabe K. Clinical Risk Factors of Licorice-Induced Pseudoaldosteronism Based on Glycyrrhizin-Metabolite Concentrations: A Narrative Review. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8:719197. DOI: 10.3389/fnut.2021.719197.
2. Bianchi L., Volpato S. Muscle dysfunction in type 2 diabetes: a major threat to patient's mobility and independence. *Acta Diabetologica*. 2016;53:879–889. DOI: 10.1007/s00592-016-0880-y.
3. Stepanova O. I., Karkishchenko V. N., Baranova O. V., Semenov H. H., Beskova T. B., Galahova T. V., Onischenko N. A., Kasinskaya N. V. The mutant mice C57BL/KsJYLeprdb/+ as the genetic model of diabetes 2 type. *Journal Biomed*. 2009;1(2):28–40. (In Russ.)
4. Liu J., Lai F., Hou Y., Zheng R. Leptin signaling and leptin resistance. *Medical Review*. 2022;2(4):363–384. DOI: 10.1515/mr-2022-0017.
5. Sima A. A., Robertson D. M. Peripheral neuropathy in mutant diabetic mouse [C57BL/Ks (db/db)]. *Acta Neuropathologica*. 1978;41(2):85–89.
6. Sataranatarajan K., Ikeno Y., Bokov A., Feliers D., Yalaman-chili H., Lee H. J., Mariappan M. M., Tabatabai-Mir H., Diaz V., Prasad S., Javors M. A., Ghosh Choudhury G., Hubbard G. B., Barnes J. L., Richardson A., Kasinath B. S. Rapamycin Increases Mortality in *db/db* Mice, a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2016;71(7):850–857. DOI: 10.1093/gerona/glv170.
7. Hummel K. P., Dickie M. M., Coleman D. L. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*. 1966;153(3740):1127–1128. DOI: 10.1126/science.153.3740.1127.
8. Zhang J., Zhang Y., Yuan Y., Liu L., Zhao Y., Wang X. Gut Microbiota Alteration Is Associated With Cognitive Deficits in Genetically Diabetic (Db/db) Mice During Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;13:815562. DOI: 10.3389/fnagi.2021.815562.
9. Brem H., Tomic-Canic M., Entero H., Hanflik A. M., Wang V. M., Fallon J. T., Ehrlich H. P. The synergism of age and *db/db* genotype impairs wound healing. *Experimental Gerontology*. 2007;42(6):523–531. DOI: 10.1016/j.exger.2006.11.018.
10. Okovity S. V., Raikhelson K. L., Volnukhin A. V., Kudlai D. A. Hepatoprotective properties of glycyrrhizic acid. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2020;(12):96–108. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-184-12-96-108.
11. Kao T.-C., Shyu M.-H., Yen G.-C. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(2):754–761. DOI: 10.1021/jf802864k.
12. Qu L., Chen C., He W., Chen Y., Li Y., Wen Y., Zhou S., Jiang Y., Yang X., Zhang R., Shen L. Glycyrrhizic acid ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating autophagy through the PI3K/AKT/mTOR pathway. *American Journal of Translational Research*. 2019;11(4):2042–2055.
13. Ban J. Y., Park H. K., Kim S. K. Effect of glycyrrhizic acid on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *International Neuropsychology Journal*. 2020;24(1):S48–55. DOI: 10.5213/inj.2040154.077.
14. Ma X., Chen H., Cao L., Zhao S., Zhao C., Yin S., Hu H. 18 β -glycyrrhetic acid improves high-intensity exercise performance by promoting glucose-dependent energy production and inhibiting oxidative stress in mice. *Phytotherapy Research*. 2021;35(12):6932–6943. DOI: 10.1002/ptr.7310.
15. Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Grishina A. Yu., Kovan-skov V. E., Sysoev Yu. I., Titova M. V., Popova E. V., No-

REFERENCES

1. Ziegler D., Papanas N., Schnell O., Nguyen B. D. T., Nguyen K. T., Kulkantrakorn K., Chaicharn. Current concepts in the management of diabetic polyneuropathy. *Journal of Diabetes Investigation*. 2021;12(4):464–475. DOI: 10.1111/jdi.13401.

- sov 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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1997.
16. Prihod'ko V. A., Matuzok T. M. Leptin resistance confers altered sensitivity to ipidacrine in *db/db* mice. In: Materials of the III International Scientific and Practical Conference "Modern Pharmacy: New Approaches in Education and Current Research". 2023. P. 231–236. (In Russ.)
17. Schulz A., Walther C., Morrison H., Bauer R. In vivo electrophysiological measurements on mouse sciatic nerves. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;(86):51181. DOI: 10.3791/51181.
18. Morozov A. M., Sorokovikova T. V., Minakova Yu. E., Belyak M. A. Electroneuromyography: a modern view on the possibilities of application (literature review). *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ" (REHABILITATION, DOCTOR AND HEALTH)*. 2022;12(3):107–116. (In Russ.) DOI: 10.20340/vmi-rvz.2022.3.CLIN.6
19. Verdú E., Ceballos D., Vilches J. J., Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 200;5(4):191–208. DOI: 10.1111/j.1529-8027.2000.00026.x.
20. Mankowski R. T., Anton S. D., Aubertin-Leheudre M. The role of muscle mass, muscle quality, and body composition in risk for the metabolic syndrome and functional decline in older adults. *Current Geriatrics Reports*. 2015;4:221–228. DOI: 10.1007/s13670-015-0132-y.
21. Anand N. S., Chad D. Electrophysiology of Myopathy. In: Blum A. S., Rutkove S. B., editors. *The Clinical Neurophysiology Primer*. New Jersey: Humana Totowa; 2007. P. 325–351. DOI: 10.1007/978-1-59745-271-7_20.
22. Paganoni S., Amato A. Electrodiagnostic evaluation of myopathies. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*. 2013;24(1):193–207. DOI: 10.1016/j.pmr.2012.08.017.
23. Nazari S., Rameshrad M., Hosseinzadeh H. Toxicological effects of *Glycyrrhiza glabra* (licorice): a review. *Phytotherapy research*. 2017;31(11):1635–1650. DOI: 10.1002/ptr.5893.
24. Yoshino T., Shimada S., Homma M., Makino T., Mimura M., Watanabe K. Clinical Risk Factors of Licorice-Induced Pseudoaldosteronism Based on Glycyrrhizin-Metabolite Concentrations: A Narrative Review. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8:719197. DOI: 10.3389/fnut.2021.719197.



Создание клеточных моделей для оценки специфической активности биологических препаратов для лечения фибротических заболеваний

У. Д. Дьячкова✉, Н. А. Басалова, М. А. Виговский, А. Ю. Ефименко, О. А. Григорьева

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: Дьячкова Ульяна Д. E-mail: dyachkovauliana@gmail.com

ORCID: У. Д. Дьячкова – <https://orcid.org/0000-0002-6119-8976>;
Н. А. Басалова – <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>;
М. А. Виговский – <https://orcid.org/0000-0003-2103-8158>;
А. Ю. Ефименко – <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>;
О. А. Григорьева – <https://orcid.org/0000-0003-2954-2420>.

Статья поступила: 13.05.2025

Статья принята в печать: 21.07.2025

Статья опубликована: 25.07.2025

Резюме

Введение. Везикулярная фракция секрета мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека (BB МСК) может быть использована как фармацевтическая субстанция для разработки биологического лекарственного препарата для лечения фибротических заболеваний. Для контроля качества такого препарата наряду со стандартными методами требуются релевантные методы оценки специфической активности, основанные на изучении клеточных мишеней и механизмов действия разрабатываемых препаратов.

Цель. Разработка клеточных моделей для оценки специфической активности создаваемого препарата на основе BB МСК человека для лечения фибротических заболеваний.

Материалы и методы. Были разработаны две *in-vitro*-модели: первая – модель индуцированной дифференцировки клеточных линий первичных фибробластов кожи человека, вторая – модель поляризации макрофагов в клеточной культуре, полученной из моноцитов периферической крови человека.

Результаты и обсуждение. Обработка трансформирующим фактором роста (TGFβ-1) фибробластов приводила к увеличению уровня основного маркера миофибробластов альфа-гладкомышечного актина (αSMA) спустя 96 часов, а одновременное действие TGFβ-1 и BB МСК достоверно снижало уровень αSMA по сравнению с TGFβ-1-стимулированными фибробластами. Поляризация макрофагов в M1-направлении при действии комбинации LPS и IFNγ приводила к увеличению экспрессии генов IL-12p35, TNFα, IL-6 как через 4 часа, так и через 24 часа. Поляризация макрофагов в M2-направлении при действии IL-4 приводила к увеличению экспрессии гена CD200R1 как через 4 часа, так и через 24 часа. Действие BB МСК на провоспалительный подтип макрофагов M1, стимулированных LPS и IFNγ, приводило к снижению уровня экспрессии провоспалительных цитокинов IL-6, IL-12p35, TNFα через 24 часа после добавления BB.

Заключение. Для оценки специфической активности разрабатываемых препаратов на основе BB МСК человека предложены две релевантные клеточные модели. Количественным параметром для оценки специфической активности лекарственного препарата на основе BB МСК является снижение уровня αSMA в TGFβ-1-стимулированных фибробластах не менее чем в два с половиной раза по сравнению с положительным контролем. При этом снижение уровня экспрессии генов IL-12p35, IL-6, TNFα в поляризованных M1-макрофагах – не менее чем в два раза по сравнению с M1-макрофагами без воздействия BB МСК.

Ключевые слова: биологический препарат, внеклеточные везикулы, мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), специфическая активность

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

Вклад авторов. У. Д. Дьячкова, А. Ю. Ефименко и О. А. Григорьева участвовали в создании концепции работы, составлении дизайна экспериментов. У. Д. Дьячкова, М. А. Виговский и Н. А. Басалова принимали участие в сборе данных и их анализе. Все авторы внесли вклад в обсуждение результатов. У. Д. Дьячкова и О. А. Григорьева участвовали в написании работы, все авторы внесли вклад в рецензирование и редактирование работы.

Финансирование. Исследование было выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М. В. Ломоносова (определение количественных параметров для оценки специфической активности антифибротических препаратов) и поддержано грантом РФФ 23-15-00198 <https://rscf.ru/project/23-15-00198/> (клеточные модели взаимодействия макрофагов и стромальных клеток).

Для цитирования: Дьячкова У. Д., Басалова Н. А., Виговский М. А., Ефименко А. Ю., Григорьева О. А. Создание клеточных моделей для оценки специфической активности биологических препаратов для лечения фибротических заболеваний. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):168–176. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2095>

In vitro models for biological activity evaluation of a new antifibrotic drug based on the vesicular fraction of the human mesenchymal stromal cells secretome

Uliana D. Dyachkova✉, Nataliya A. Basalova, Maksim A. Vigovskiy, Anastasia Yu. Efimenko, Olga A. Grigorieva

Lomonosov Moscow State University. 1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Uliana D. Dyachkova. **E-mail:** dyachkovauliana@gmail.com

ORCID: Uliana D. Dyachkova – <https://orcid.org/0000-0002-6119-8976>;
Nataliya A. Basalova – <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>;
Maksim A. Vigovskiy – <https://orcid.org/0000-0003-2103-8158>;
Anastasia Yu. Efimenko – <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>;
Olga A. Grigorieva – <https://orcid.org/0000-0003-2954-2420>.

Received: 13.05.2025

Accepted: 21.07.2025

Published: 25.07.2025

Abstract

Introduction. The vesicular fraction of human mesenchymal stem/stromal cells (EV MSCs) secretome can be considered as a pharmaceutical substance for the biological drug development to treat fibrotic diseases. Biological drugs quality control requires standard tests using simple validable methods. Additionally, it is necessary to assess specific activity using relevant models based on specific cellular targets and mechanisms of action.

Aim. Development of cell models for specific activity assessment of the biological drug from human EV MSCs for the fibrotic diseases treatment.

Materials and methods. We proposed two *in vitro* models to evaluate specific activity: the first one is primary human dermal fibroblast (HDF) cell lines induced differentiation model and the second one is polarization of macrophages derived from human peripheral blood monocytes.

Results and discussion. Transforming growth factor (TGFβ-1) treatment of HDF increased the level of the main myofibroblasts marker – alpha-smooth muscle actin (αSMA) within 96 hours. The simultaneous action of TGFβ-1 and EV-MSCs significantly decreased αSMA level compared to TGFβ-1-stimulated fibroblasts. Macrophages polarization towards M1-type with LPS/IFNγ combination resulted in increased IL-6, IL-12p35, TNFα genes expression after both 4 and 24 hours. The EV-MSCs addition to M1-type decreased the gene expression of proinflammatory cytokines IL-6, IL-12p35, TNFα in 24 hours.

Conclusion. We developed two *in vitro* models to assess specific activity of antifibrotic drug based on human EV-MSCs. In the first model value of specific activity is at least 2.5-fold decrease of αSMA level in TGFβ-1-stimulated HDF, comparing to non-treated control. In the second model the value is at least two-fold decrease in the level of IL-12p35, IL-6, TNFα expression in M1 macrophages, compared to non-treated M1 macrophages.

Keywords: biological drug, extracellular vesicles, mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), specific activity

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

Contribution of the authors. Uliana D. Dyachkova, Anastasia Yu. Efimenko and Olga A. Grigorieva participated in developing the hypothesis and designing the experiments. Uliana D. Dyachkova, Maksim A. Vigovskiy and Nataliya A. Basalova participated in collecting and analyzing the data. All authors contributed to the results discussion. Uliana D. Dyachkova and Olga A. Grigorieva participated in writing the paper, all authors contributed to reviewing and editing.

Funding. The study was supported by State Assignment of Lomonosov MSU (quantitative parameters determination for assessing the antifibrotic drugs specific activity) and the RSF grant 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/> (macrophages and stromal cells interactions cell models).

For citation: Dyachkova U. D., Basalova N. A., Vigovskiy M. A., Efimenko A. Yu., Grigorieva O. A. In vitro models for biological activity evaluation of a new antifibrotic drug based on the vesicular fraction of the human mesenchymal stromal cells secretome. *Drug development & registration*. 2025;14(3):168–176. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2095>

ВВЕДЕНИЕ

Стволовые клетки являются многообещающим инструментом нового направления медицины – регенеративной медицины [1–3]. Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) в организме млекопитающих играют ключевую роль в поддержании гомеостаза тканей и их регенерации. Согласно действующей научной парадигме, свой эффект МСК реализуют через секрецию паракринных факторов в составе многокомпонентного секрета, в котором можно выделить везикулярную фракцию (ВВ МСК), состоящую из мембранных частиц разных размеров: экзосом и микровезикул [4, 5]. Ранее в наших работах было показано, что ВВ МСК способны подавлять развитие блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей, преимущественно за счет переноса микроРНК miR-29c и miR-129 [6, 7]. Таким образом, ВВ МСК можно рассматривать как потенциальный препарат для лечения фибротических заболеваний, в том числе фиброза легких. Согласно классификации решения Совета Евразийской экономической комиссии (ЕАК) № 89, препарат на основе ВВ МСК относится к биологическим препаратам, как выделенный из биологического источника¹. Такие препараты отличаются от лекарственных препаратов на основе малых молекул в том числе тем, что их состав не может быть стандартизирован. Контроль качества таких препаратов необходимо проводить не только по стандартным показателям, но также обязательно оценивать специфическую активность, которая является количественной мерой биологической активности препарата.

Универсальных методов определения специфической активности для любого биологического препарата не существует. Поэтому необходимо создание релевантных моделей для каждого конкретного биологического препарата, основанных на понимании клеточных мишеней и механизмов действия. Для разработки моделей оценки специфической активности препарата на основе ВВ МСК нами выбраны модели влияния на дифференцировку основного клеточного эффектора фиброза – миофибробластов и поляризацию макрофагов, играющих ключевую роль в регуляции иммунных процессов при фиброзе.

Целью данной работы явилась разработка клеточных моделей для оценки специфической активности создаваемого препарата на основе ВВ МСК человека для лечения фибротических заболеваний.

¹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0089/> Ссылка активна на 15.07.2025.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии, использованные в работе

В работе использовались клеточные линии и культуры, полученные от добровольцев, согласно разрешению институционального локального этического комитета (этический комитет МНОИ МГУ имени М. В. Ломоносова, IRB00010587) (протокол № 4, дата заседания 04.06.2018), с получением добровольного информированного согласия у всех доноров.

Мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки

МСК жировой ткани человека, иммортализованные с помощью человеческой теломеразы (ASC52telo, ATCC®), культивировали в полной питательной среде роста DMEM/F-12 (Capricorn Scientific, Германия) с добавлением 7%-й фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США) и 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, США) при 37 °C и 5%-м CO₂ в газовой фазе.

Фибробласты кожи

Первичные линии фибробластов кожи человека получали из банка клеточных линий Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М. В. Ломоносова (номер коллекции MSU_FB²). Клетки культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Gibco) с добавлением 1%-го пенициллина-стрептомицина (HyClone) и 10%-й ФБС (HyClone) при 37 °C и 5%-м CO₂ в газовой фазе.

Макрофаги

Макрофаги получали из моноцитов, выделенных из периферической крови здоровых доноров обоих полов. Для выделения цельную кровь смешивали в равных объемах с фосфатно-солевым буфером (ФСБ, НПП «ПанЭко», Россия), центрифугировали на градиенте раствора фиколла с плотностью 1,022 г/мл (НПП «ПанЭко», Россия) при 300g в течение 30 минут при +4 °C. Отбирали кольцо мононуклеаров, промывали раствором ФСБ и высаживали на культуральный планшет с адгезивным покрытием CellBind (Corning, США). Через час неприкрепившиеся лимфоциты отмывали с поверхности, к адгезировавшей фракции добавляли полную среду роста RPMI-1640 (GIBCO) с добавлением 1%-го пенициллина и стрептомицина (HyClone), 1%-й GlutaMax, 1%-го пирувата, 1%-й HEPES (GIBCO) и 10%-й инактивированной ФБС (HyClone).

² Национальный банк-депозитарий живых систем. Доступно по: <https://human.depo.msu.ru>. Ссылка активна на 13.05.2025.

Получение и характеристика везикулярной фракции секрета МСК

МСК отмывали трижды раствором Хенкса (НПП «ПанЭко», Россия) и добавляли среду без сыворотки DMEM на двое суток, после чего кондиционированную среду (КС) собирали, центрифугировали при 300g в течение 10 минут для осаждения клеточного дебриса, супернатант подвергали ультрафильтрации с использованием фильтра (300 кДа, Sartorius, Германия) центрифугированием при 1200g. Полученную везикулярную фракцию секрета хранили при –80 °C.

Для подтверждения подлинности ВВ МСК – наличия поверхностных маркеров – был проведен белковый электрофорез и иммуноблотинг с последующим полуколичественным определением Alix (abcam, ab88388), HSP70 (SBI, EXOAB-Hsp70A-1), CD63 (Millepore, CBL553), H2AX (R&D, AF2288).

Количественное определение ВВ МСК было выполнено методом анализа траектории наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) с помощью прибора ZetaView (Particle Metrix GmbH, Германия). Измерение проводилось в режиме «бокового светорассеяния» при 25 °C. Для измерения использовали лазер с длиной волны 488 нм, объектив 10x и высокочувствительную камеру с матрицей КМОП-типа. В качестве контроля случайных частиц использовался образец бессывороточной среды после 30 минут инкубации с МСК.

Клеточные модели

TGFβ-1-индуцированная дифференцировка фибробластов

Фибробласты кожи человека высаживали в концентрации 20 000 кл/мл в полной среде роста. Через сутки клетки депривировали от сыворотки 24 часа, затем добавляли 5x ВВ одновременно с 5 нг/мл TGFβ-1 к бессывороточной среде роста и культивировали в течение 4 суток. В качестве контроля использовали клетки, культивированные в бессывороточной среде с/без добавления TGFβ-1 (положительный и отрицательный контроли соответственно).

Дифференцировка и поляризация макрофагов

После прикрепления моноцитов добавляли GM-CSF или M-CSF (SCI-STORE, Россия) в концентрации 50 нг/мл. На 4 сутки проводили смену среды с добавлением тех же факторов. На 6 сутки клеткам меняли среду на полную с добавлением цитокинов для поляризации на 4 или 24 часа. К клеткам с GM-CSF добавляли комбинацию 100 нг/мл LPS и 20 нг/мл IFNγ (Sigma, США) для индукции поляризации M1-типа. К клеткам с M-CSF добавляли 20 нг/мл IL-4 (Sci-Store, Россия) для поляризации M2-типа [8]. Затем на 24 часа добавляли 5x ВВ МСК.

Анализ дифференцировки фибробластов

Иммуноцитохимический анализ

Клетки отмывали с помощью ФСБ от среды роста, фиксировали 4%-м раствором формальдегида (Pan-Reas, Испания) в течение 10 минут. Для выявления внутриклеточных маркеров проводили пермеабиллизацию клеточных мембран с использованием 0,2%-го раствора Triton X-100 (Sigma) в ФСБ. Для блокирования неспецифических сайтов связывания инкубировали препарат с 10%-м раствором нормальной сыворотки (Sigma) животного – донора вторых антител на ФСБ с добавлением 1%-го бычьего сывороточного альбумина (БСА, НПП «ПанЭко») в течение часа при комнатной температуре. Далее инкубировали образец с раствором первичных антител к αSMA (ab5694, 1:300, abcam) или неиммунными IgG (BioLend, США) в качестве контроля при +4 °C в течение ночи. Первичные антитела выявляли с помощью вторичных антител, конъюгированных с Alexa 488 (Invitrogen, США). Ядра дополнительно метили DAPI (Sigma) в разведении 1:10000. Препараты анализировали с помощью инвертированного микроскопа с флуоресцентным модулем и камерой (Leica DMI8, камера Leica DFC 7000 T, Leica, Германия).

Белковый электрофорез и иммуноблотинг

Фибробласты кожи человека лизировали на льду в 2x буфере Лемли для образцов. Белки лизата клеток разделяли с помощью денатурирующего фореза в присутствии 20%-го SDS (Sigma). Для определения молекулярных масс белков использовали стандартную коммерческую смесь предварительно окрашенных белков с известной молекулярной массой Page-Ruler™ Plus (Invitrogen). Иммуноблоттинг проводили с использованием немеченых моноклональных антител, специфически связывающихся с GAPDH (Cell Signaling Technology, США, 1:1000, 2118), (αSMA) (Abcam, 1:500, ab7817), белком активированных фибробластов (FAPa) (CellSignalling, 1:1000, 66562) на протяжении ночи при +4 °C и последующей инкубацией со вторыми антителами 1:3000 (антитела козы к IgG кролика или кроличьи антитела к IgG мыши), конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma), в течение 60 минут при комнатной температуре.

Визуализацию белков, связавшихся с антителами, осуществляли с помощью хемилюминесцентного субстрата (ECL Pico or Dura, Pierce, США). Для экспонирования мембран использовали экран ChemiDoc УФ (Bio-Rad, США). Детекцию хемилюминесценции проводили при помощи ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, США), денситометрический анализ полученных изображений проводили с использованием программы ImageLab.

Анализ поляризации макрофагов

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) с обратной транскрипцией

Для ПЦР-РВ макрофаги лизировали в RLT-буфере (QIAGEN GmbH, Германия). Выделение тотальной РНК из лизатов клеток проводили с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия) согласно прилагающейся методике производителя. Концентрацию и чистоту выделенной тотальной РНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США) при помощи оригинального программного обеспечения ND-1000 V 3.7.1 (Thermo Scientific, США). Образцы с показателями отношения поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) от 1,9 до 2,1 были использованы для дальнейшего анализа. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT kit (ЗАО «Евроген», Россия) согласно руководству пользователя. Амплификацию осуществляли с помощью прибора Nexus Mastercycler® gradient (Eppendorf AG, Германия). Количественную ПЦР в реальном времени проводили с помощью набора qPCRmix-HS SYBR + LowROX (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с протоколами производителя на приборе QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Используемые олигонуклеотидные последовательности праймеров указаны в таблице 1.

Статистическая обработка

Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения ±10–90 перцентили. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Для проверки достоверности различий значений (в численных данных) между опытными и контрольными группами применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (обозначения в тексте: * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика ВВ МСК

Согласно рекомендациям MISEV2023 для контроля качества ВВ МСК и подтверждения подлинности ВВ методом иммуноблоттинга нами было показано, что везикулярная фракция содержит специфические маркеры ВВ HSP70, Alix, CD9, CD81 и CD63. При этом в них отсутствует гистоновый белок H2AX, находящийся в ядрах клеток, но не в ВВ [9]. Данные представлены на рисунке 1.

При оценке размера и количества частиц методом NTA (Nanoparticle tracking analysis – анализ траектории наночастиц) было показано, что диаметр частиц варьирует от 10 до 550 нм, при этом большинство частиц имеет размер в среднем от 130 до 170 нм, что соответствует размеру микровезикул, к которым относятся ВВ МСК. При этом количество частиц в 1х растворе ВВ МСК составляло $3-5 \cdot 10^8$ частиц/мл. Данные представлены на рисунке 1.

Оценка специфической активности

Основным типом клеток-эффекторов при развитии фиброза являются миофибробласты, которые синтезируют большое количество компонентов внеклеточного матрикса и контрактируют его благодаря наличию αSMA-содержащих стресс-фибрилл в клетках [10]. Основным источником накопления миофибробластов считается их дифференцировка из резидентных фибробластов ткани, у которых при активации на мембране появляется белок FAPα (fibroblast activation protein alpha).

Важную роль в развитии фиброза играет хроническое воспаление [11]. Основными эффекторами воспаления являются макрофаги, которые в организме представлены широким спектром фенотипов: выделяют М1-провоспалительный и М2-противовоспалительный фенотипы [12].

Таблица 1. Олигонуклеотидные последовательности праймеров для генов человека

Table 1. Human gene primer sequences

Ген Gene	Прямая последовательность Forward sequence	Обратная последовательность Reverse sequence
36b4	5-GCTGCTGCCCCGTGCTGGTG-3	5-TGGTGCCCTGGAGATTTTAGTG-3
IL-12p35	5-GATGGCCCTGTGCCTTAGTA-3	5-TCAAGGGAGGATTTTGTGG-3
CD200R1	5-GGAGGATGAAATGCAGCCCTA-3	5-CTCAGATGCCTTCACCTTGTTT-3
TNFα	5-GAGGCCAAGCCCTGGTATG-3	5-CGGGCCGATTGATCTCAGC-3
IL-6	5-ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3	5-CCATCTTTGGAAGGTTAGGTTG-3

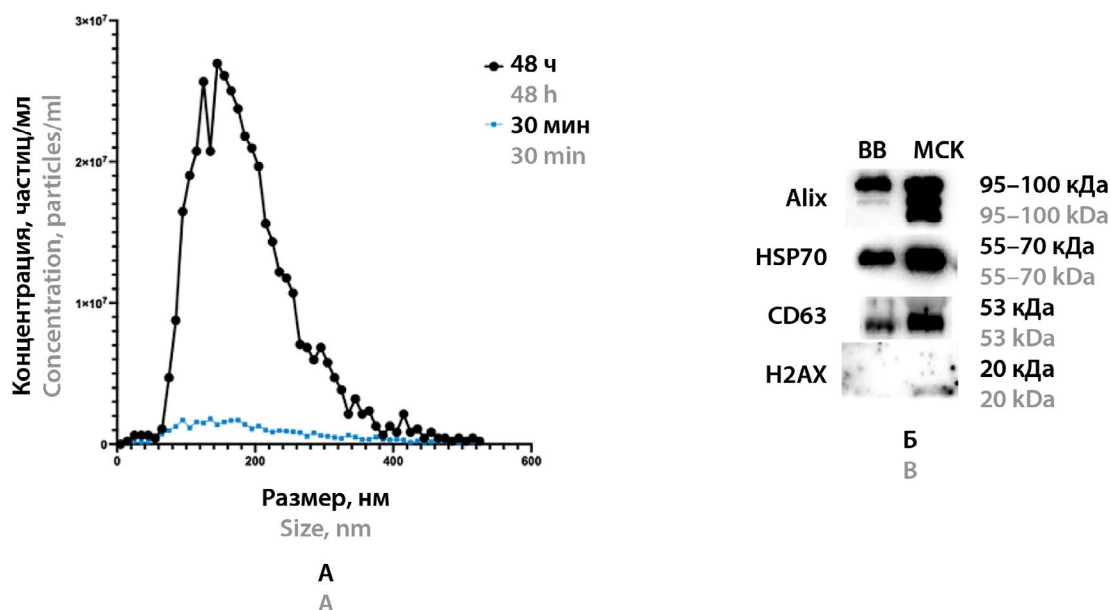


Рисунок 1. Характеристика ВВ МСК.

А – распределение частиц по размеру: в образце среды, кондиционированной МСК, после 48 часов кондиционирования (черный) и в контрольной КС после 30 минут кондиционирования (синий) для образцов, измеренных с помощью метода анализа траекторий наночастиц (NTA); **Б** – репрезентативные данные иммуноблоттинга

Figure 1. EV-MSCs characterization.

A – particle size distribution in the MSC-conditioned medium (CM) after 48 h conditioning (black) and in the control CM after 30 min conditioning (blue) measured using nanoparticle trajectory analysis (NTA); **B** – representative data of immunoblotting

Модель TGFβ-индуцированной дифференцировки фибробластов в миофибробласты

Фибробласты кожи человека обрабатывали трансформирующим фактором роста бета (TGFβ-1) (K+), затем оценивали количество αSMA и FAPα. Через 96 часов уровень αSMA увеличивался в среднем в 4,3 раза (±0,84) по сравнению с необработанными клетками (K-) и происходило его встраивание в стресс-фибриллы, что показано на рисунке 2. Значимого изменения уровня FAPα при действии TGFβ-1 как через 24 часа, так и через 96 часов не происходило, поэтому для определения специфической активности было выбрано определение уровня αSMA через 96 часов.

При одновременном действии TGFβ-1 и ВВ МСК количество αSMA в среднем в 19 (±5) раз меньше, чем при действии TGFβ-1, а также снижается количество стресс-фибрилл до уровня, сопоставимого с отрицательным контролем. Количественным параметром для оценки специфической активности лекарственного препарата на основе ВВ МСК является снижение уровня αSMA в клетках не менее чем в 2,5 раза по сравнению с положительным контролем.

Поляризация макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека

Методом ПЦР-РВ нами был проанализирован уровень экспрессии генов, меняющихся при поляризации макрофагов (рисунок 3, А). При стимуляции провоспалительной M1-поляризации увеличивалась экспрессия генов IL-12p35 (через 4 часа в $17,9 \pm 4,5$ раза, через 24 часа в $3,5 \pm 1,9$ раза), TNFα (через 4 часа в $54,6 \pm 10,4$ раза, через 24 часа в $4,2 \pm 1,2$ раза), IL-6 (через 4 часа в $233,1 \pm 53,7$ раза, через 24 часа в $25,1 \pm 16,6$ раза). При стимуляции в направлении M2a-поляризации уменьшалась экспрессия гена CD200R1 – маркера профибротических макрофагов (через 4 часа в $12,1 \pm 4,0$ раза, через 24 часа в $6,3 \pm 1,6$ раза).

При действии ВВ МСК на поляризованные M1-макрофаги снижалась экспрессия генов провоспалительных факторов IL-6 в $8 \pm 2,1$ раза, IL-12p35 в $3,4 \pm 1,2$ раза, TNFα в $4,7 \pm 1,7$ раза, в M2a-макрофагах повышалась экспрессия противовоспалительного фактора IL-10 в $1,75 (\pm 0,3)$ раза, а в M2c-макрофагах практически не изменяется экспрессия генов M2-макрофагов, что показано на рисунке 3, Б. Количественным

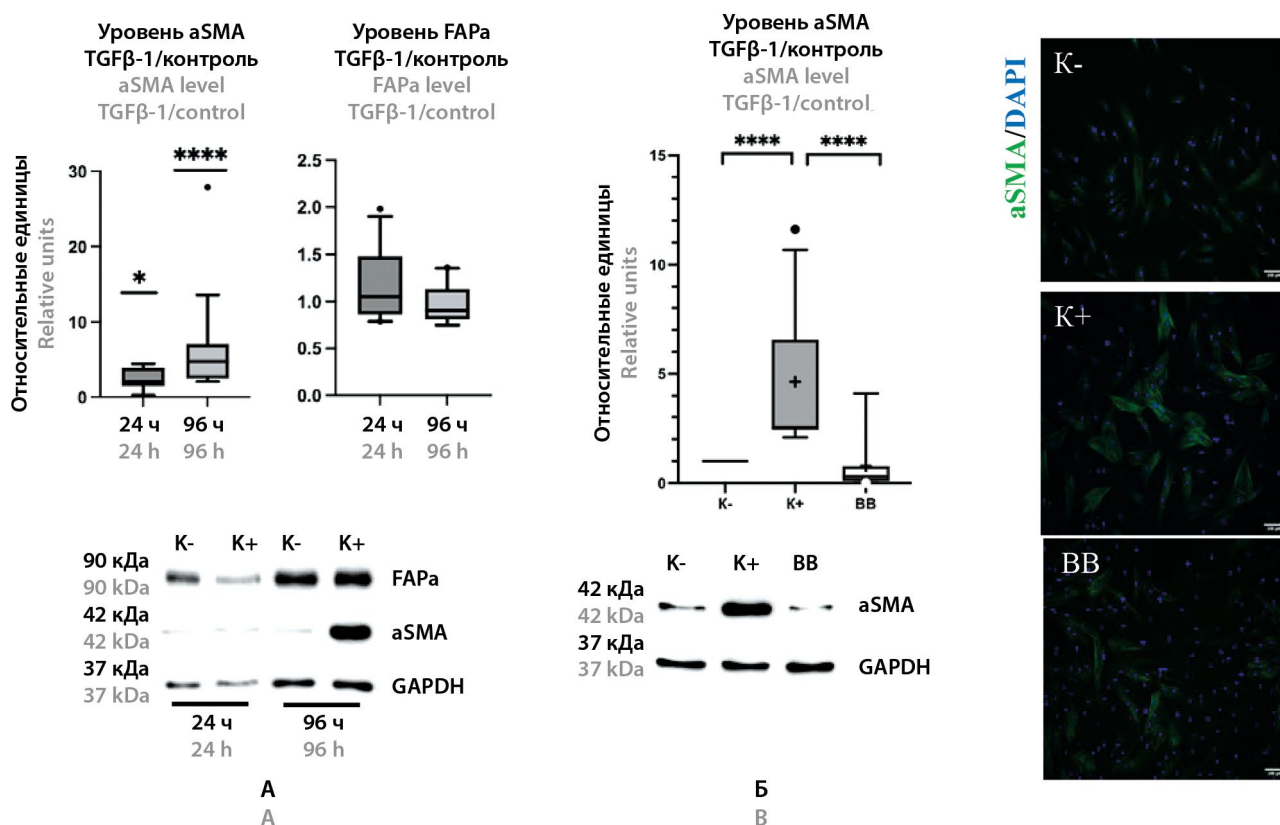


Рисунок 2. TGFβ-индуцированная дифференцировка фибробластов в миофибробласты.

А – уровень aSMA и FAPa по отношению к контролю в фибробластах кожи человека без воздействия (K-), под действием TGFβ-1 (K+) через 24 и 96 часов; **Б** – уровень aSMA по отношению к контролю в фибробластах кожи человека без воздействия (K-), под действием TGFβ-1 (K+), при одновременном действии TGFβ-1 и BB (BB), измеренный методом иммуноблоттинга. Репрезентативные микрофотографии aSMA (зеленый) фибробластов кожи человека без воздействия (K-), под действием TGFβ-1 (K+), при одновременном действии TGFβ-1 и BB (BB) через 96 часов. Ядра мечены DAPI (синий).

Данные представлены в виде 10–90 перцентилей, линия на уровне среднего значения, разбросы соответствуют диапазону 10–90 перцентилей ($n = 13$, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$)

Figure 2. TGFβ-induced fibroblasts differentiation into myofibroblasts.

A – aSMA and FAPa levels relative to control in human skin fibroblasts without treatment (K-), with TGFβ-1 treatment (K+) after 24 and 96 hours; **B** – aSMA level relative to control in untreated (K-), TGFβ-1-treated (K+), and TGFβ-1- and EVs-MSCs-treated human dermal fibroblasts (EVs) measured by immunoblotting. Representative pictures of aSMA (green) in untreated (K-), TGFβ-1-treated (K+), and TGFβ-1- and EVs-treated human dermal fibroblasts (EVs) after 96 h. Nuclei are labeled with DAPI (blue).

Data are presented as 10–90 percentiles, line at the mean value, scatter corresponds to 10–90 percentiles ($n = 13$, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$)

параметром для оценки специфической активности лекарственного препарата на основе BB МСК является снижение уровня экспрессии генов IL-12p35, IL-4, TNFα в поляризованных макрофагах не менее чем в два раза по сравнению с M1-макрофагами без воздействия BB МСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были разработаны две клеточные модели для оценки специфической активности биологического препарата на основе BB МСК для лечения фиброти-

ческих заболеваний. В качестве показателя специфической активности в модели TGFβ-индуцированной дифференцировки фибробластов в миофибробласты количественным параметром является снижение уровня aSMA в фибробластах не менее чем в 2,5 раза по сравнению с положительным контролем. В модели поляризации макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека, показателем специфической активности является снижение экспрессии генов IL-12p35, IL-6, TNFα в макрофагах не менее чем в два раза по сравнению с M1-макрофагами без воздействия BB МСК.

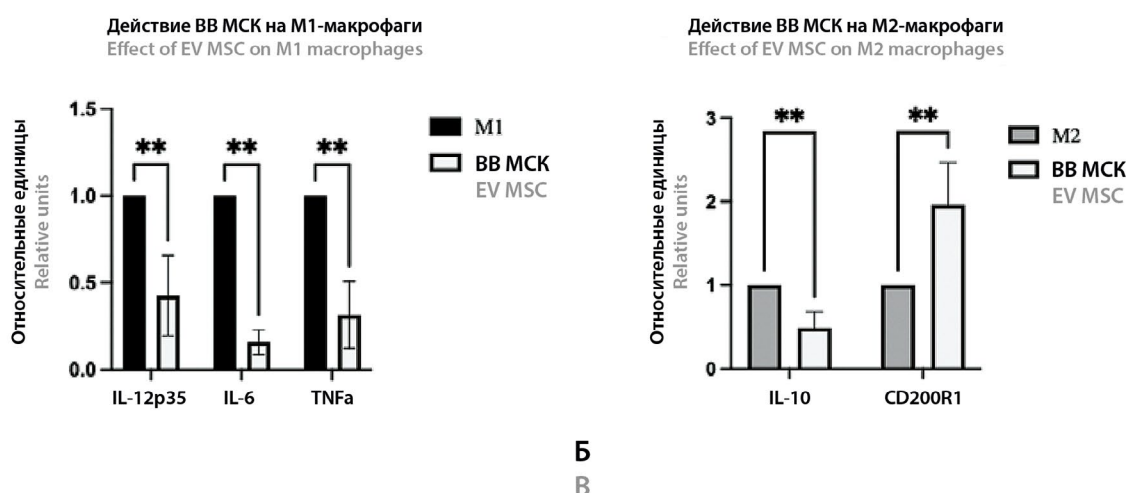
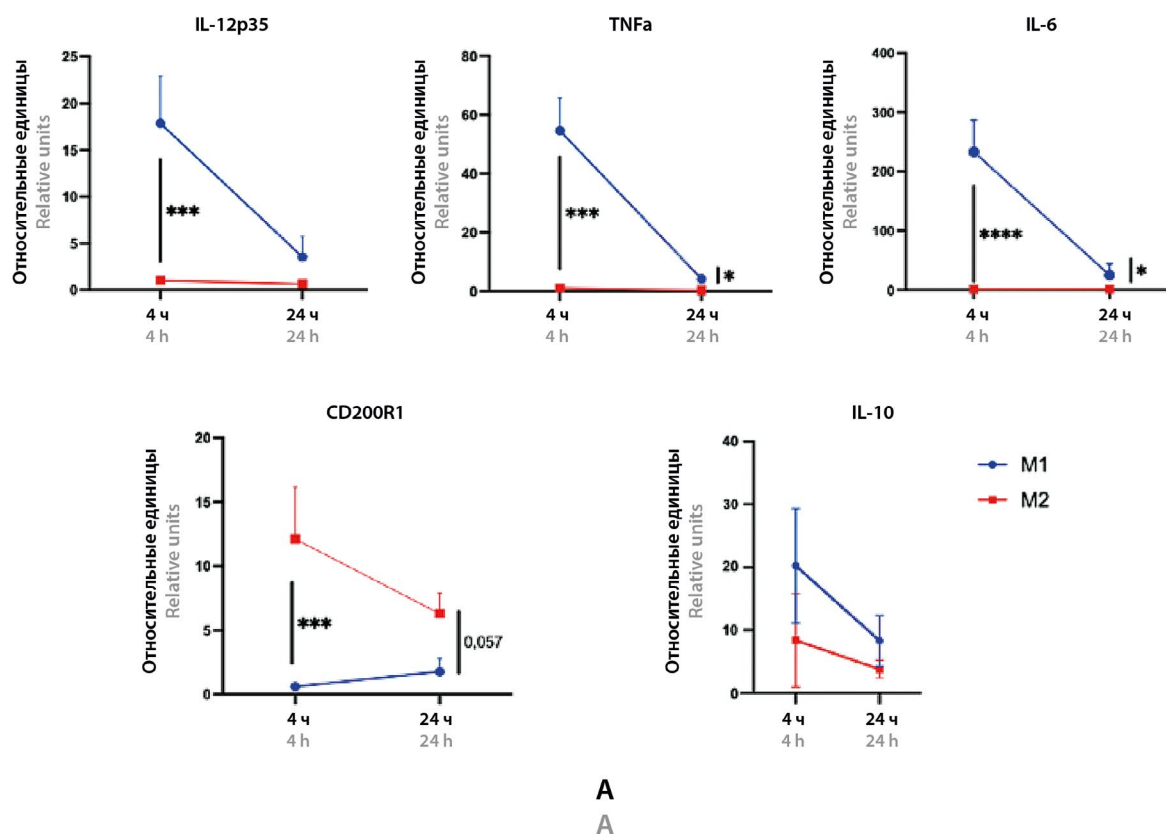


Рисунок 3. Поляризация макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека.

А – изменение экспрессии генов-маркеров макрофагов в динамике: М1-маркеры (IL-12p35, TNFα, IL-6), М2-маркеры (CD200R1, IL-10). Данные представлены в виде среднего значения, разбросы соответствуют стандартной ошибке среднего ($n = 5$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$); **Б** – изменение экспрессии генов-маркеров макрофагов человека, измеренной методом ПЦР-РВ, после действия ВВ МСК на поляризованные макрофаги. Гены-маркеры М1-макрофагов (IL-12p35, IL-6, TNFα), М2-макрофагов (CD200R1, IL-10). Данные представлены в виде 10–90 перцентилей, линия на уровне медианы, разбросы соответствуют стандартной ошибке ($n = 3$, * $p < 0,05$)

Figure 3. Polarization of macrophages obtained from human peripheral blood monocytes.

A – dynamic changes in human macrophage marker genes' expression: M1-macrophage markers were IL-12p35, IL-6, TNFα. M2-macrophage markers were CD200R1, IL-10. Data are presented as mean values, the ranges correspond to the standard error of the mean ($n = 5$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$); **B** – changes in human macrophage marker genes' expression after the EV-MSCs action on polarized macrophages. M1 macrophages genes-markers (IL-12p35, IL-6, TNFα), M2 macrophages (CD200R1, IL-10). Data are presented as 10–90 percentile, line at the median level, scatter corresponds to the standard error ($n = 3$, * $p < 0.05$)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Margiana R., Markov A., Zekiy A. O., Hamza M. U., Al-Dabbagh K. A., Al-Zubaidi S. H., Hameed N. M., Ahmad I., Sivaraman R., Kzar H. H., Al-Gazally M. E., Mustafa Y. F., Siahmansouri H. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):366. DOI: 10.1186/s13287-022-03054-0.
2. Hade M. D., Suire C. N., Suo Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. *Cells*. 2021;10(8):1959. DOI: 10.3390/cells10081959.
3. Tavakoli S., Ghaderi Jafarbeigloo H. R., Shariati A., Jahangiryan A., Jadidi F., Jadidi Kouhbanani M. A., Hassanzadeh A., Zamani M., Javidi K., Naimi A. Mesenchymal stromal cells; a new horizon in regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*. 2020;235(12):9185–9210. DOI: 10.1002/jcp.29803.
4. Kapur S. K., Katz A. J. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*. 2013;95(12):2222–2228. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.06.001.
5. Naji A., Eitoku M., Favier B., Deschaseaux F., Rouas-Freiss N., Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(17):3323–3348. DOI: 10.1007/s00018-019-03125-1.
6. Basalova N., Arbatskiy M., Popov V., Grigorieva O., Vigovskiy M., Zaytsev I., Novoseletskaia E., Sagaradze G., Danilova N., Malkov P., Cherniaev A., Samsonova M., Karagyaour M., Tolstoluzhinskaya A., Dyachkova U., Akopyan Z., Tkachuk V., Kalinina N., Efimenko A., Mesenchymal stromal cells facilitate resolution of pulmonary fibrosis by miR-29c and miR-129 intercellular transfer. *Experimental & Molecular Medicine*. 2023;55:1399–1412. DOI: 10.1038/s12276-023-01017-w.
7. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., Evtushenko E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Akopyan Z., Kalinina N., Efimenko A. Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020;9(5):1272. DOI: 10.3390/cells9051272.
8. Purcu D. U., Korkmaz A., Gunalp S., Helvacı D. G., Erdal Y., Dogan Y., Suner A., Wingender G., Sag D. Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLOS ONE*. 2022;17(3):e0265196. DOI: 10.1371/journal.pone.0265196.
9. Théry C., Witwer K., Aikawa E., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018;7(1):1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
10. Hinz B., Phan S. H., Thannickal V. J., Galli A., Bochaton-Piallat M.-L., Gabbiani G. The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *The American Journal of Pathology*. 2007;170(6):1807–1816. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070112.
11. Wynn T. A., Vannella K. M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):450–462. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
12. Murray P. J. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*. 2017;79:541–566. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.

pharmtech & ingredients

27-я Международная выставка оборудования,
сырья и технологий для фармацевтического производства

25–28.11.2025

Москва, Крокус Экспо

На выставке вас ждут:

- новинки сотен поставщиков из России и других стран
- переговоры и личные встречи с первыми лицами компаний
- тренды отрасли на 10+ мероприятиях деловой программы с экспертами и регуляторами отрасли



Получите
бесплатный билет
по промокоду:
pharmjournal

pharmtech-expo.ru

+7 495 799 55 85
pharmtech@ite.group



Организатор
ORGANISER





Автоматизированный количественный анализ окраса шерстного и кожного покрова лабораторных животных

В. А. Приходько , У. В. Ногаева, Д. Ю. Ивкин, С. В. Оковитый

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

 **Контактное лицо:** Приходько Вероника Александровна. **E-mail:** vaprikhodko@rambler.ru

ORCID: В. А. Приходько – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>;

У. В. Ногаева – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>;

Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Статья поступила: 11.06.2025

Статья принята в печать: 18.07.2025

Статья опубликована: 25.07.2025

Резюме

Введение. Анализ окраса шерстного и кожного покрова животных может использоваться как вспомогательный неинвазивный инструмент оценки ряда состояний и процессов, сопровождающихся изменением его цветности, насыщенности, долевого соотношения цветов шерсти или участков шерсти, подшерстка и кожи. Для проведения анализа окраса в условиях доклинических исследований требуется разработка простых, быстрых и легко стандартизуемых цифровых методов, обеспечивающих получение воспроизводимых результатов, пригодных для статистической обработки.

Цель. Целью настоящей работы стали разработка и апробация алгоритма количественного анализа окраса шерстного и кожного покрова лабораторных животных с использованием языка программирования R.

Материалы и методы. Для анализа шерстного покрова использовали цифровые фотоснимки самок морской свинки двух- и трехцветного окраса, сделанные в условиях искусственного освещения на однотонном контрастном фоне. Анализ соотношения участков шерсти и кожи выполняли с повторным использованием фотоснимков самца мыши с депиляционной моделью алопеции, сделанных в рамках ранее опубликованного доклинического исследования. Колориметрический анализ изображений осуществляли путем иерархической кластеризации цветов методом *k*-средних в пространстве RGB с расчетом площади кластеров с помощью пакета функций *recolorize* v0.2.0 для R v4.2.3 с RStudio v2025.05.0.

Результаты и обсуждение. Алгоритм колориметрического анализа включил три стадии: 1) преаналитическая обработка изображения и маскирование фона; 2) иерархическая кластеризация и рекластеризация цветов; 3) измерение абсолютных и относительных площадей цветовых кластеров. Посредством применения описанного алгоритма доленое соотношение цветов в окрасе двухцветной морской свинки было определено как 46,1 % агути и 53,9 % желтого; трехцветной – как 9,1 % рыжего, 19,6 % белого и 71,3 % черного. Для самца мыши после депиляции была охарактеризована динамика долевого соотношения участков кожи без волос и с растущими волосами в течение 28-дневного периода. Между 0-м, 9-м и 17-м днями после депиляции наблюдали сокращение относительной площади лишенной шерсти кожи от 8,7 до 7,4 и до 0,0 % соответственно ($p < 0,05$ для 17-го дня против 0-го и 9-го).

Заключение. В ходе проведенной работы описан и апробирован на модельных фотоснимках алгоритм количественного анализа окраса шерстного и кожного покрова с применением метода иерархической кластеризации цветов. Описанный алгоритм не требует использования специализированного программного обеспечения, быстр и прост в применении, подходит для серийной обработки изображений с получением количественных данных для дальнейшего статистического анализа.

Ключевые слова: анализ окраса, колориметрия, шерстный покров, кожный покров, алопеция, лабораторные животные

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

Вклад авторов. В. А. Приходько – идея и планирование исследования. В. А. Приходько, У. В. Ногаева – проведение экспериментов и обработка данных. В. А. Приходько – подготовка иллюстраций. В. А. Приходько, Д. Ю. Ивкин, С. В. Оковитый – подготовка и редакция рукописи.

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

Для цитирования: Приходько В. А., Ногаета У. В., Ивкин Д. Ю., ОкОВИТЫЙ С. В. Автоматизированный количественный анализ окраса шерстного и кожного покрова лабораторных животных. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):178–187. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2115>

Automated quantitative analysis of coat and skin coloration in laboratory animals

Veronika A. Prikhodko✉, Ulyana V. Nogaeva, Dmitry Yu. Ivkin, Sergey V. Okovityi

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

✉ **Corresponding author:** Veronika A. Prikhodko. **E-mail:** vaprikhodko@rambler.ru

ORCID: Veronika A. Prikhodko – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>;

Ulyana V. Nogaeva – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>;

Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

Sergey V. Okovityi – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Received: 11.06.2025

Accepted: 18.07.2025

Published: 25.07.2025

Abstract

Introduction. Analysis of animal coat and skin coloration can be used as an auxiliary method for assessment of various conditions and processes that are accompanied by changes in coloration, intensity, proportion of coat colors or areas covered by fur, undercoat, and skin. Performing coloration analysis in preclinical studies requires new straightforward, fast, and easily standardizable digital methods that yield reproducible data suitable for statistical processing.

Aim. In this work, we aimed to develop and test a novel algorithm for quantitative analysis of coat and skin coloration in laboratory animals using R programming language.

Materials and methods. To analyse fur coloration, we used digital photographs of female guinea pigs, one bicolor and one calico, that were taken under artificial lighting against a plain contrasting background. Analysis of fur and skin area proportion was carried out re-using photographs of a male mouse with depilation alopecia model, which were obtained during a previously published preclinical study. Colorimetric image analysis was performed by hierarchical k-means color clustering in RGB space and cluster area calculation using the *recolorize* v0.2.0 function package for R v4.2.3 with RStudio v2025.05.0.

Results and discussion. The algorithm for colorimetric analysis included 3 steps: 1) preprocessing images and masking the background; 2) hierarchical color clustering and reclustering; 3) calculating absolute and relative color cluster areas. Using the described algorithm, we found the color area proportion to be 46.1 % agouti vs. 53.9 % yellow for the bicolor guinea pig, and 9.1 % red vs. 19.6 % white vs. 71.3 % black, for the calico one. In the male mouse subjected to depilation, we characterized the dynamics of proportion between areas of hairless skin and skin with regrown hair across a 28 day-long period. We found a decrease in relative of hairless skin area between the 0th, 9th, and 17th days post-depilation from 8.7 to 7.4 % and to 0.0 %, respectively ($p < 0.05$ for 17th day vs. 0th and 9th).

Conclusion. In this work, we described and tested on model photographs an algorithm for analysis of coat and skin coloration using hierarchical color clustering. The algorithm does not require the use of specialized software, is fast and straightforward, and can be employed for batch image processing to obtain quantitative data for further statistical analysis.

Keywords: coloration analysis, colorimetry, coat, skin, alopecia, laboratory animals

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 – study design and planning. Veronika A. Prikhodko, Ulyana V. Nogaeva – experiment conduction and data analysis. Veronika A. Prikhodko – visualization. Veronika A. Prikhodko, 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 from 26 July 2021) with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation: Prikhodko V. A., Nogaeva U. V., Ivkin D. Yu., Okovityi S. V. Automated quantitative analysis of coat and skin coloration in laboratory animals. *Drug development & registration*. 2025;14(3):178–187. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2115>

ВВЕДЕНИЕ

Окрас животного является одним из его основных фенотипических признаков, выполняющих широкий спектр функций, включая защитную, терморегуляционную и коммуникативную [1]. В биомедицинских исследованиях с использованием лабораторных животных их окраска часто представляет интерес по ряду причин. Во-первых, окрашивание шерсти, кожи, оперения и других видов покровов отражает состояние их пигментации, ее изменение с возрастом и под воздействием внешних факторов, включая формирование экспериментальных патологий. Примерами последних являются доклинические модели нарушений меланогенеза [2], жизненного цикла и миграции пигментных клеток [3, 4], витилиго [5], обмена меди (болезнь Менкеса) [6].

Во-вторых, утрата шерсти с изменением соотношения площадей шерсти и кожи характерна для широкого спектра состояний, от моделей гнездной алопеции [7] и интоксикации солями таллия [8] до процессов естественного старения [9] и прогерии [10]. Интерес для количественной оценки интенсивности и/или площади окрашивания также потенциально могут представлять различные морфологические элементы кожи и слизистых оболочек, поверхностные дефекты (раны, ожоги, рубцы) и некоторые новообразования кожи [11–13].

Наконец, в некоторых случаях окрас шерсти, его интенсивность и цветность, наличие и характер рисунка могут являться фенотипическими коррелятами особенностей генотипа, включая наличие мутаций, доли мутантных аллелей и выраженности эпигенетических модификаций. Примером этому могут быть мыши со спонтанной точечной мутацией *lethal yellow* (*y*) в локусе *agouti* (*A*) на 2-й хромосоме, контролирующем синтез и распределение меланина в пределах волоса и всего шерстного покрова. Гетерозиготы *A/a* используются в качестве моногенной модели ожирения и сахарного диабета, сопряженных с характерной желтой окраской шерсти вследствие гиперпродукции феомеланина [14].

Ген *agouti* подвержен эпигенетическому сайленсингу, приводящему как к меньшей распространенности желтого пигмента («псевдоагути», тигровый, пятнистый, крапчатый окрас), так и к меньшей выраженности метаболических нарушений [15]. Таким образом, количественный анализ окраса тигровых *agouti*-мутантов рассматривается как удобная альтернатива молекулярно-генетическому исследованию [16]. Схожие закономерности пигментации шерсти демонстрируют мыши с другими мутациями в локусе *agouti* (*vy*, *iy*, *sy* и др.) [14], а также в локусе тирозиназы [17].

Во всех вышеперечисленных случаях колориметрический анализ может быть применен для неинвазивной количественной оценки изменений окраса с целями верификации целевой патологии, стратификации животных и оценки эффективности экспериментальной терапии в срезном режиме или в

динамике. Оптимизация существующих алгоритмов анализа, направленная на снижение трудоемкости и повышение воспроизводимости результатов, целесообразна для расширения возможности их рутинного применения в рамках доклинических исследований. Современные инструменты цифрового анализа изображений, включая различные средства на языке программирования R [16, 18], предоставляют широкие возможности для подобной автоматизации и оптимизации.

В связи с вышесказанным **целью настоящей работы** стала апробация протокола количественного анализа окраса шерстного покрова и соотношения участков шерсти и кожи лабораторных животных с использованием пакета функций для *recolorize* разработчика H. Weller [18]¹.

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 СПбХФУ. Анализ окраса шерсти выполнен с использованием двух самок морской свинки возрастом 3 мес., массой 320 и 363 г, полученных из филиала НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – ПЛЖ «Рапполово» (Россия), прошедших карантин в течение 14 дней и содержавшихся в стандартных условиях вивария. Для эксперимента были выбраны животные двух- (желтый + агути) и трехцветного (черный + белый + рыжий) окраса.

Анализ соотношения участков шерсти и кожи выполнен с повторным использованием архивных фотоснимков, полученных в рамках ранее проведенного и опубликованного доклинического исследования [19]. С целью оценки эффективности экспериментального средства против алопеции мышам-самцам линии C57Bl/6 производили депиляцию участка шерсти площадью 4 см² по трафарету в пояснично-крестцовой зоне спины, после чего производили фотофиксацию состояния шерстного покрова на 0-й, 9-й и 17-й дни после депиляции. В настоящую работу были включены фотоснимки мыши, получавшей терапию гелем, содержащим активный метаболит AP-57 экспериментального фармакологического агента AP-53, показавшего наибольшую эффективность в отношении роста волос [19].

Фотосъемку морских свинок осуществляли при помощи цифровой видеокамеры Panasonic HC-V260 в условиях равномерного искусственного освещения контролируемой яркости (800 лк) на однотонном зеленом фоне, цвет которого не характерен для окраса лабораторных млекопитающих. Для анализа было отобрано по одному фотоснимку дорсальной, правой

¹Weller H. recolorize: Color-Based Image Segmentation. R package version 0.2.0. 2025. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=recolorize>. Accessed: 25.05.2025.

и левой латеральных поверхностей тела животных под прямым углом. На преаналитическом этапе в графическом редакторе Adobe Photoshop 2021 v22.5 производили кадрирование необходимого участка изображения, маскирование глаз текстурой фона, а также выборочную коррекцию контрастности и экспозиции для устранения артефактов, образуемых погрешностями освещения. На архивных снимках животного с депиляцией шерсти дополнительно в ручном режиме удаляли фон, а также переводили их в оттенки серого для минимизации артефактов.

Колориметрический анализ полученных изображений проводили с помощью пакета функций *recolorize* v0.2.0 [18]¹ для R v4.2.3 с интегрированной средой разработки RStudio v2025.05.0. Для каждого изображения выполняли алгоритм:

1. Импорт изображения в формате JPEG с конверсией в объект класса *large array* с помощью функции *readImage()*.
2. Маскирование фона по координатам его цветового диапазона в пространстве RGB с помощью функций *backgroundCondition()* и *backgroundIndex()*. Этот шаг может быть совмещен со следующим.
3. Иерархическая кластеризация и рекластеризация цветов с помощью функции *recolorize2()* с указанием метода кластеризации (*k*-средних координат в пространстве RGB), метода рекластеризации (наложение центроидов кластеров) и ожидаемого числа кластеров.
4. Обработка артефактов с помощью итеративного применения функций *editLayer()* (для одного слоя) и *editLayers()* (для нескольких слоев) с указанием морфологической операции (заполнение, очистка) до получения визуально приемлемого результата.
5. Приведение палитры изображения к референтной – палитре первого изображения в серии.
6. Извлечение количественных данных (площадей цветовых участков), их обработка и визуализация с использованием набора пакетов функций *tidyverse* v2.0.0 [20].

Для определения пространственных координат цветовых диапазонов фона, подлежащих маскированию, дополнительно использовали пакеты функций *colordistance* v1.1.2² и *countcolors* v0.9.1³. Статистическую значимость различий между распределениями относительных площадей участков шерсти и кожи у мыши с моделью алопеции в различных контрольных

точках оценивали при помощи расширенного точного теста Фишера с поправкой Бонферрони с использованием пакета функций *RVAideMemoire* v0.9-83-11⁴; порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием описываемого алгоритма колориметрического анализа доленое соотношение цветов в окрасе двухцветной морской свинки было определено как 46,1 % агуты и 53,9 % желтого; трехцветной – как 9,1 % рыжего, 19,6 % белого и 71,3 % черного. Результаты анализа на всех стадиях обработки изображений отражены на рисунках 1 и 2.

Доли площади шерстного покрова и кожи у мыши с моделью алопеции составили соответственно: 0,913 и 0,087 на 0-й день, 0,926 и 0,074 на 9-й день, 1,000 и 0,000 на 17-й день эксперимента. Процентное соотношение площадей на 17-й день значительно отличалось по сравнению как с 0-м днем ($p = 0,01$), так и с 9-м днем ($p = 0,04$), что отражает положительную динамику отрастания шерсти на депилированном участке (рисунок 3). Наши результаты совпадают с опубликованными ранее данными об эффективности соединения AP-57 против экспериментальной алопеции, полученными путем гистологического исследования волосяных фолликулов [19].

В качественном аспекте наши результаты в высокой степени сходны с данными, полученными S. Ounpraseuth и соавторами для *A^{ya}*-мутантных мышей тигрового окраса [16]. Алгоритм анализа, описанный в указанной работе, предполагает выполнение первого основного этапа – кластеризации палитры и разделения регионов изображения по цветовым кластерам – в полуручном режиме с помощью инструментов выделения в графическом редакторе, что делает процесс серийной обработки снимков трудо- и времязатратным. Применение функций для кластеризации цветов пакета *recolorize* [18]⁵ позволяет хотя и не полностью устранить, но минимизировать необходимость в ручной обработке изображений и повысить степень воспроизводимости результатов за счет автоматизации как анализа целевых регионов, так и маскирования фона, обработки артефактов и унификации палитры между отдельными снимками. Описываемый алгоритм анализа также готов к масштабированию на всех этапах, от импорта предобработанных изображений до статистической обработки получаемых результатов, что может быть ценно в условиях большого числа первичных данных (фото-снимков).

⁴ Herve M. RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics. R package version 0.9-83-11. 2025. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>. Accessed: 25.05.2025.

⁵ Weller H. recolorize: Color-Based Image Segmentation. R package version 0.2.0. 2025. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=recolorize>. Accessed: 25.05.2025.

¹ Weller H. recolorize: Color-Based Image Segmentation. R package version 0.2.0. 2025. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=recolorize>. Accessed: 25.05.2025.

² Weller H. colordistance: Distance Metrics for Image Color Similarity. R package version 1.1.2. 2021. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=colordistance>. Accessed: 25.05.2025.

³ Weller H. countcolors: Locates and Counts Pixels Within Color Range(s) in Images. R package version 0.9.1. 2019. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=countcolors>. Accessed: 25.05.2025.

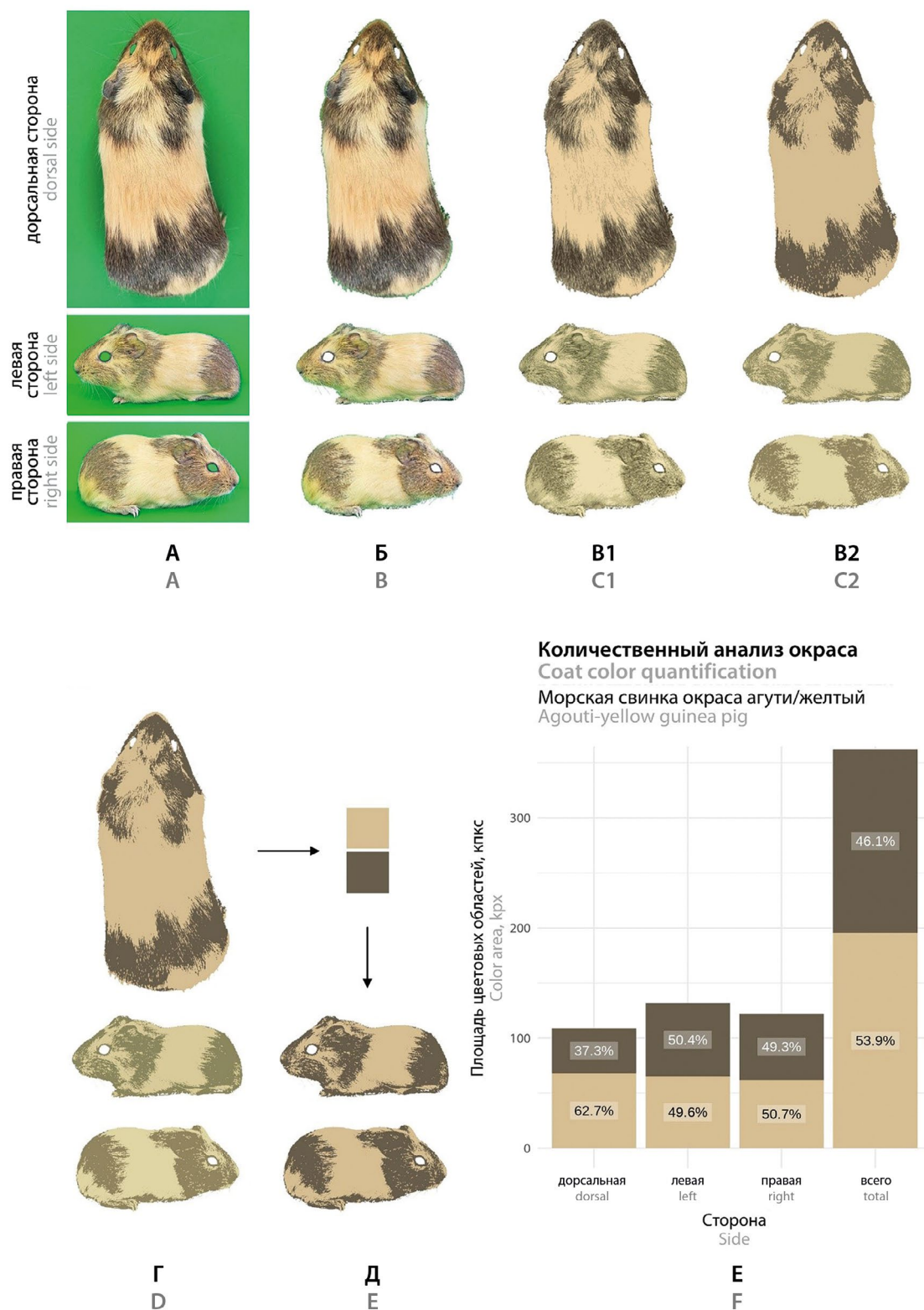


Рисунок 1. Этапы и результаты анализа окраса шерсти двухцветной морской свинки.

A – исходные изображения после преаналитической обработки; **Б** – маскировка фона; **В** – кластерный анализ палитры (**В1** – кластеризация, **В2** – рекластеризация); **Г** – обработка артефактов; **Д** – приведение к референтной палитре; **Е** – извлечение и анализ результатов

Figure 1. Steps and results of coat color analysis in a bicolor guinea pig.

A – source images after preprocessing; **B** – masking background; **C** – color cluster analysis (**C1** – clustering, **C2** – reclustering); **D** – processing artifacts; **E** – imposing reference colors; **F** – extracting and analyzing results

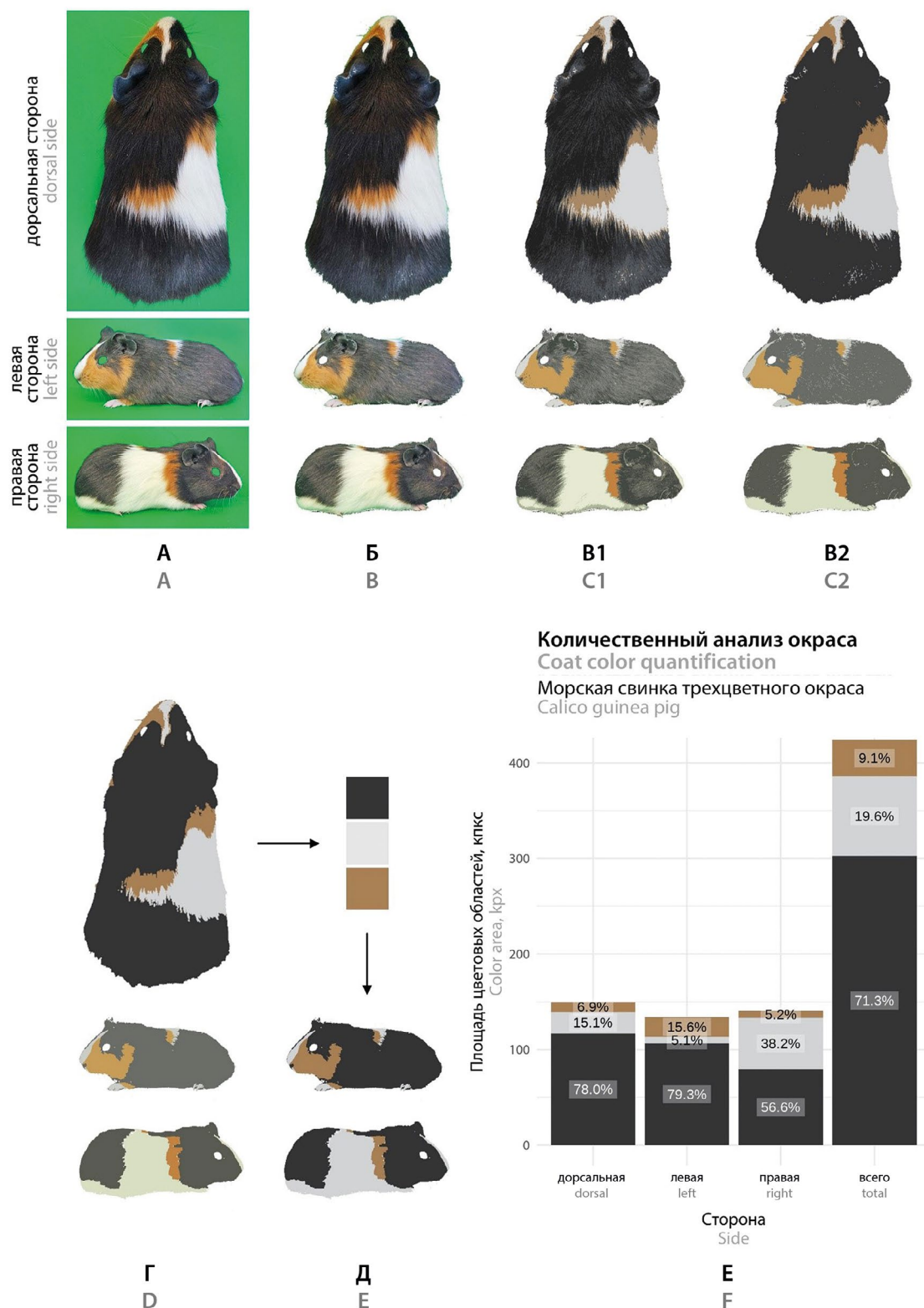


Рисунок 2. Этапы и результаты анализа окраса шерсти трехцветной морской свинки.

A – исходные изображения после преаналитической обработки; Б – маскировка фона; В – кластерный анализ палитры (B1 – кластеризация, B2 – рекластеризация); Г – обработка артефактов; Д – приведение к референтной палитре; Е – извлечение и анализ результатов

Figure 2. Steps and results of coat color analysis in a calico guinea pig.

A – source images after preprocessing; B – masking background; C – color cluster analysis (C1 – clustering, C2 – reclustering); D – processing artifacts; E – imposing reference colors; F – extracting and analyzing results

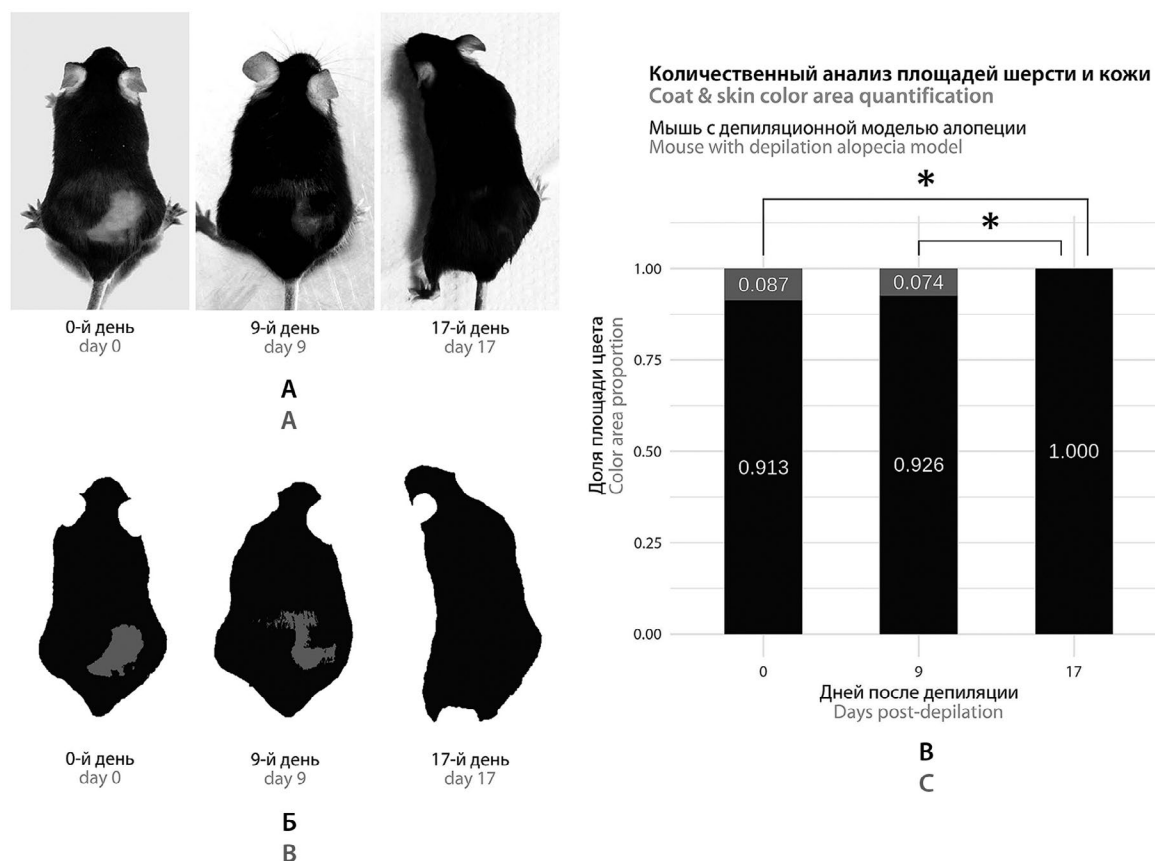


Рисунок 3. Этапы и результаты анализа площадей шерстного и кожного покрова у мыши с экспериментальной алопецией.

А – изображения, подготовленные для кластерного анализа палитры; **Б** – изображения после кластерного анализа палитры; **В** – результаты количественного анализа; * $p < 0,05$ (расширенный точный тест Фишера с поправкой Бонферрони)

Figure 3. Steps and results of coat and skin area analysis in a mouse with experimental alopecia.

A – images preprocessed for color cluster analysis; **B** – images after color cluster analysis; **C** – quantification results; * $p < 0.05$ (extended Fisher's exact test with Bonferroni correction)

Следует также остановиться на основных ограничениях и особенностях применения описываемого алгоритма. В рамках его апробации в данной работе мы не проводили контроль параметров цветопередачи на этапе съемки, поскольку дифференциация и кластеризация цветов, во-первых, осуществлялись для животных индивидуально (без наличия в какой-либо степени гетерогенной выборки) и, во-вторых, проводились одновременно по нескольким спектральным характеристикам (цвета различались по тону, яркости и насыщенности). Для проведения более чувствительного количественного анализа с дифференциацией цветов по отдельным спектральным характеристикам (например, по яркости при постоянных тоне и насыщенности) потребуется строгая стандартизация уровня освещенности и цветовой температуры источника освещения, а также цветопередачи с помощью цветовых эталонов и последующей фотокоррекции [21, 22].

В этой работе мы также прибегли к ручному маскированию глаз животных в фоторедакторе, однако этот этап может быть целесообразным пропустить по меньшей мере в двух ситуациях: когда цвет глаз животного не встречается в палитре его окраса (с этой целью может быть оптимальным использование альбиносов) и может быть исключен из расчета; а также в больших сериях изображений, где с целью экономии трудозатрат площадь области глаз может быть отнесена на счет систематической погрешности.

Один и тот же цвет объекта при съемке под разным углом (например, съемке спины и латеральных поверхностей тела) может быть запечатлен на снимках по-разному. Для приведения близких цветов к одним значениям центроидов кластеров мы использовали функцию *imposeColors* пакета *recolorize*, применение которой позволяет анализировать серии изображений в одних пространственных координатах.

тах. Эта функция применима только в условиях экспериментов, не требующих тонкой дифференциации между близкими по спектральным характеристикам цветами (например, оттенками кожи при гиперемии, эритеме, сыпи, изменениях пигментации) [18, 21, 22]. При анализе небольших палитр (2–3 цвета) для дополнительного облегчения дифференциации также может быть применен перевод изображения в оттенки серого.

При измерении и анализе площадей участков цвета в абсолютных единицах дополнительно необходимо приведение изображений объектов к одинаковому масштабу с помощью масштабной линейки или аналогичного стандарта. Для минимизации артефактов и искажений, связанных с вариабельностью позы животного, может быть рассмотрена возможность его мягкой фиксации, например, путем рефлекторного хвата горизонтальной перекладины или решетки мелкими грызунами [23].

С позиции сокращения потребности в преаналитической обработке и воспроизводимости результатов для количественного анализа площади оптимальным участком, вероятно, является дорсальная поверхность тела, поскольку она наиболее пригодна для получения снимков под прямым углом с минимальными искажениями за счет рельефа и возникающих перепадов светотени. Для дополнительного повышения точности получаемых данных за счет технических репликат съемка животных может проводиться многократно с последующим совмещением и усреднением изображений или численных результатов их обработки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проведена апробация алгоритма колориметрического анализа шерстного и кожного покрова на модельных фотоснимках лабораторных животных. Описываемый алгоритм задействует опубликованные и расположенные в открытом доступе пакеты функций для языка программирования R и предназначен для автоматизированной количественной оценки площадей каждого цвета, присутствующего в окрасе животного, на основе иерархической кластеризации цветов. Экспериментально подтверждена применимость алгоритма для анализа окраса шерсти как фенотипического признака, в том числе коррелирующего с особенностями генотипа и эпигенетики линейных животных, для оценки динамики роста или утраты шерсти и подшерстка в условиях моделей алопеции. Дальнейшая модификация алгоритма с включением экспериментальных моделей дерматологических и иных патологий, характеризующихся изменением цветовых характеристик кожного и/или шерстного покрова, может расширить сферу его применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Caro T., Mallarino R. Coloration in Mammals. *Trends in Ecology and Evolution*. 2020;35(4):357–366. DOI: 10.1016/j.tree.2019.12.008.
2. Rochin L., Hurbain I., Serneels L., Fort C., Watt B., Leblanc P., Marks M. S., De Strooper B., Raposo G., van Niel G. BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(26):10658–10663. DOI: 10.1073/pnas.1220748110.
3. Tharmarajah G., Faas L., Reiss K., Saftig P., Young A., Van Raamsdonk C. D. Adam10 haploinsufficiency causes freckle-like macules in Hairless mice. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 2012;25(5):555–565. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2012.01032.x.
4. Papalazarou V., Swaminathan K., Jaber-Hijazi F., Spence H., Lahmann I., Nixon C., Salmeron-Sanchez M., Arnold H.-H., Rottner K., Machesky L. M. The Arp2/3 complex is critical for colonisation of the mouse skin by melanoblasts. *Development*. 2020;147(22):dev194555. DOI: 10.1242/dev.194555.
5. Fan R., Gao J. Establishment of a promising vitiligo mouse model for pathogenesis and treatment studies. *Diagnostic Pathology*. 2024;19(1):92. DOI: 10.1186/s13000-024-01520-2.
6. Lenartowicz M., Krzeptowski W., Lipiński P., Grzmil P., Starzyński R., Pierzchała O., Möller L. B. Mottled Mice and Non-Mammalian Models of Menkes Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2015;8:72. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00072.
7. Sundberg J. P., Wang E. H. C., McElwee K. J. Current Protocols: Alopecia Areata Mouse Models for Drug Efficacy and Mechanism Studies. *Current Protocols*. 2024;4(8):e1113. DOI: 10.1002/cpz1.1113.
8. Shipkowski K. A., Hubbard T. D., Ryan K., Waidyanatha S., Cunney H., Shockley K. R., Allen J. L., Toy H., Levine K., Harrington J., Betz L., Sparrow B., Roberts G. K. Short-term toxicity studies of thallium (I) sulfate administered in drinking water to Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice. *Toxicology Reports*. 2023;10:621–632. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.05.003.
9. Chen C. C., Murray P. J., Jiang T. X., Plikus M. V., Chang Y. T., Lee O. K., Widelitz R. B., Chuong C. M. Regenerative hair waves in aging mice and extra-follicular modulators follistatin, dkk1, and sfrp4. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(8):2086–2096. DOI: 10.1038/jid.2014.139.
10. Kreienkamp R., Gonzalo S. Metabolic Dysfunction in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Cells*. 2020;9(2):395. DOI: 10.3390/cells9020395.
11. Sakamoto M., Nakano T., Tsuge I., Yamanaka H., Katayama Y., Shimizu Y., Note Y., Inoue M., Morimoto N. Dried human cultured epidermis accelerates wound healing in diabetic mouse skin defect wounds. *Scientific Reports*. 2022;12(1):3184. DOI: 10.1038/s41598-022-07156-w.
12. Rahul V. G., Ellur G., Gaber A. A., Govindappa P. K., Elfur J. C. 4-aminopyridine attenuates inflammation and apoptosis and increases angiogenesis to promote skin regeneration following a burn injury in mice. *Cell Death Discovery*. 2024;10(1):428. DOI: 10.1038/s41420-024-02199-6.
13. Семивеличенко Е. Д., Ермолаева А. А., Пономаренко В. В., Новоселов А. В., Плиско Г. А., Ивкин Д. Ю., Антонов В. Г., Карев В. Е., Титович И. А., Ерёмин А. В. Ис-

- следование эффективности действия препаратов на основе молекулярных комплексов аденозин-полимер на модели термического ожога. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):209–219. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-209-219.
14. Voisey J., van Daal A. Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Research*. 2002;15(1):10–18. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2002.00039.x.
15. Cropley J.E., Suter C.M., Beckman K.B., Martin D.I.K. Germ-line epigenetic modification of the murine *A^y* allele by nutritional supplementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(46):17308–17312. DOI: 10.1073/pnas.0607090103.
16. Ounpraseuth S., Rafferty T.M., McDonald-Phillips R.E., Gam-mill W.M., Siegel E.R., Wheeler K.L., Nilsson E.A., Cooney C.A. A method to quantify mouse coat-color proportions. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5414. DOI: 10.1371/journal.pone.0005414.
17. Lavado A., Olivares C., García-Borrón J.C., Montoliu L. Molecular basis of the extreme dilution mottled mouse mutation: a combination of coding and noncoding genomic alterations. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(6):4817–4824. DOI: 10.1074/jbc.M410399200.
18. Weller H.I., Hiller A.E., Lord N.P., Van Belleghem S.M. recolorize: An R package for flexible colour segmentation of biological images. *Ecology Letters*. 2024;27(2):e14378. DOI: 10.1111/ele.14378.
19. Ногаева У.В., Ивкин Д.Ю., Плиско Г.А., Флисюк Е.В., Ковансков В.Е., Штырлин Ю.Г., Сидоров К.О. Сравнительная эффективность трансдермальных форм для терапии алопеции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):171–178. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-171-178.
20. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R., Grolemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*. 2019;4(43):1686. DOI: 10.21105/joss.01686.
21. Badano A., Revie C., Casertano A., Cheng W.C., Green P., Kimpe T., Krupinski E., Sisson C., Skråvseth S., Treanor D., Boynton P., Clunie D., Flynn M.J., Heki T., Hewitt S., Homma H., Masia A., Matsui T., Nagy B., Nishibori M., Penczek J., Schopf T., Yagi Y., Yokoi H. Summit on Color in Medical Imaging. Consistency and standardization of color in medical imaging: a consensus report. *Journal of Digital Imaging*. 2015;28(1):41–52. DOI: 10.1007/s10278-014-9721-0.
22. Савельев Д.С., Городков С.Ю., Горемыкин И.В. Стандартизация колориметрии медицинской фотографии в клинической практике. *Детская хирургия*. 2024;28(5):460–471. DOI: 10.17816/ps803.
23. Bonetto A., Andersson D.C., Waning D.L. Assessment of muscle mass and strength in mice. *BoneKey Reports*. 2015;4:732. DOI: 10.1038/bonekey.2015.101.
2. Rochin L., Hurbain I., Serneels L., Fort C., Watt B., Leblanc P., Marks M.S., De Strooper B., Raposo G., van Niel G. BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(26):10658–10663. DOI: 10.1073/pnas.1220748110.
3. Tharmarajah G., Faas L., Reiss K., Saftig P., Young A., Van Raamsdonk C.D. Adam10 haploinsufficiency causes freckle-like macules in *Hairless* mice. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 2012;25(5):555–565. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2012.01032.x.
4. Papalazarou V., Swaminathan K., Jaber-Hijazi F., Spence H., Lahmann I., Nixon C., Salmeron-Sanchez M., Arnold H.-H., Rottner K., Machesky L.M. The Arp2/3 complex is critical for colonisation of the mouse skin by melanoblasts. *Development*. 2020;147(22):dev194555. DOI: 10.1242/dev.194555.
5. Fan R., Gao J. Establishment of a promising vitiligo mouse model for pathogenesis and treatment studies. *Diagnostic Pathology*. 2024;19(1):92. DOI: 10.1186/s13000-024-01520-2.
6. Lenartowicz M., Krzeptowski W., Lipiński P., Grzmil P., Starzyński R., Pierzchała O., Møller L.B. Mottled Mice and Non-Mammalian Models of Menkes Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2015;8:72. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00072.
7. Sundberg J.P., Wang E.H.C., McElwee K.J. Current Protocols: Alopecia Areata Mouse Models for Drug Efficacy and Mechanism Studies. *Current Protocols*. 2024;4(8):e1113. DOI: 10.1002/cpz1.1113.
8. Shipkowski K.A., Hubbard T.D., Ryan K., Waidyanatha S., Cunneen H., Shockley K.R., Allen J.L., Toy H., Levine K., Harrington J., Betz L., Sparrow B., Roberts G.K. Short-term toxicity studies of thallium (I) sulfate administered in drinking water to Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice. *Toxicology Reports*. 2023;10:621–632. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.05.003.
9. Chen C.C., Murray P.J., Jiang T.X., Plikus M.V., Chang Y.T., Lee O.K., Widelitz R.B., Chuong C.M. Regenerative hair waves in aging mice and extra-follicular modulators follistatin, dkk1, and sfrp4. *The Journal of Investigative dermatology*. 2014;134(8):2086–2096. DOI: 10.1038/jid.2014.139.
10. Kreienkamp R., Gonzalo S. Metabolic Dysfunction in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Cells*. 2020;9(2):395. DOI: 10.3390/cells9020395.
11. Sakamoto M., Nakano T., Tsuge I., Yamanaka H., Katayama Y., Shimizu Y., Note Y., Inoue M., Morimoto N. Dried human cultured epidermis accelerates wound healing in diabetic mouse skin defect wounds. *Scientific Reports*. 2022;12(1):3184. DOI: 10.1038/s41598-022-07156-w.
12. Rahul V.G., Ellur G., Gaber A.A., Govindappa P.K., Elfars J.C. 4-aminopyridine attenuates inflammation and apoptosis and increases angiogenesis to promote skin regeneration following a burn injury in mice. *Cell Death Discovery*. 2024;10(1):428. DOI: 10.1038/s41420-024-02199-6
13. Semivelichenko E.D., Ermolaeva A.A., Ponomarenko V.V., Novoselov A.V., Plisko G.A., Ivkin D.Yu., Antonov V.G., Karev V.E., Titovich I.A., Eremin A.V. Study of the Effectiveness of Drugs Based on Molecular Complexes of Adenosine-polymer on the Model of Thermal Burn. *Drug development & registration*. 2022;11(3):209–219. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-209-219.

REFERENCES

14. Voisey J., van Daal A. Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Research*. 2002;15(1):10–18. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2002.00039.x.
15. Cropley J.E., Suter C.M., Beckman K.B., Martin D.I.K. Germ-line epigenetic modification of the murine *A^y* allele by nutritional supplementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(46):17308–17312. DOI: 10.1073/pnas.0607090103.
16. Ounpraseuth S., Rafferty T.M., McDonald-Phillips R.E., Gam-mill W.M., Siegel E.R., Wheeler K.L., Nilsson E.A., Cooney C.A. A method to quantify mouse coat-color proportions. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5414. DOI: 10.1371/journal.pone.0005414.
17. Lavado A., Olivares C., García-Borrón J.C., Montoliu L. Molecular basis of the extreme dilution mottled mouse mutation: a combination of coding and noncoding genomic alterations. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(6):4817–4824. DOI: 10.1074/jbc.M410399200.
18. Weller H.I., Hiller A.E., Lord N.P., Van Belleghem S.M. recolorize: An R package for flexible colour segmentation of biological images. *Ecology Letters*. 2024;27(2):e14378. DOI: 10.1111/ele.14378.
19. Nogaeva U.V., Ivkin D.Yu., Plisko G.A., Flisyuk E.V., Kovanskov V.E., Shtyrlin Yu.G., Sidorov K.O. Comparative efficacy of transdermal forms for alopecia therapy. *Drug Development & Registration*. 2021;10(4):171–178. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-171-178.
20. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R., Golemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*. 2019;4(43):1686. DOI: 10.21105/joss.01686.
21. Badano A., Revie C., Casertano A., Cheng W.C., Green P., Kimpe T., Krupinski E., Sisson C., Skråvseth S., Treanor D., Boynton P., Clunie D., Flynn M.J., Heki T., Hewitt S., Homma H., Masia A., Matsui T., Nagy B., Nishibori M., Penczek J., Schopf T., Yagi Y., Yokoi H, Summit on Color in Medical Imaging. Consistency and standardization of color in medical imaging: a consensus report. *Journal of Digital Imaging*. 2015;28(1):41–52. DOI: 10.1007/s10278-014-9721-0.
22. Savelyev D.S., Gorodkov S.Y., Goremykin I.V. Standardization of color measurement in the medical photography in clinical practice. *Russian Journal of Pediatric Surgery*. 2024;28(5):460–471. (In Russ.) DOI: 10.17816/ps803.
23. Bonetto A., Andersson D.C., Waning D.L. Assessment of muscle mass and strength in mice. *BoneKEy Reports*. 2015;4:732. DOI: 10.1038/bonekey.2015.101.

Оригинальная статья / Research article

УДК 577.161.23; 616.921.5; 616.36

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2071>



Влияние разных доз парикальцитола на экспрессию рецепторов к витамину D в ткани печени мышей

Т. П. Сатаева✉, В. Ю. Малыгина, А. А. Давыдова, М. А. Кривенцов, А. К. Гуртовая

Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С. И. Георгиевского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»), 295051, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, бульвар Ленина, д. 5/7

✉ Контактное лицо: Сатаева Татьяна Павловна. E-mail: tanzcool@mail.ru

ORCID: Т. П. Сатаева – <https://orcid.org/0000-0001-6451-7285>;
В. Ю. Малыгина – <https://orcid.org/0000-0002-7681-6773>;
А. А. Давыдова – <https://orcid.org/0000-0003-0843-1465>;
М. А. Кривенцов – <https://orcid.org/0000-0001-5193-4311>;
А. К. Гуртовая – <https://orcid.org/0000-0001-8633-1166>.

Статья поступила: 03.04.2025

Статья принята в печать: 25.07.2025

Статья опубликована: 25.07.2025

Резюме

Введение. Применение высоких доз витамина D приводит к нежелательным побочным эффектам, таким как гиперкальциемия. Парикальцитол (ПК) – это биологически активное синтетическое вещество, которое селективно связывается с внутриклеточными рецепторами витамина D и не вызывает гиперкальциемию. Известно о влиянии данного препарата на метаболические пути, секрецию паратиреоидного гормона, астму и фиброз печени, что подтверждает его широкий клинический потенциал. Однако влиянию разных доз ПК на состояние клеток печени, которые являются важнейшим местом его метаболизма, посвящены единичные публикации.

Цель. Изучить влияние внутрибрюшинного введения разных доз ПК на степень активации рецепторов к витамину D и провести морфологическую оценку состояния ткани печени у мышей.

Материалы и методы. В эксперименте использовали самцов мышей линии BALB/c без внешних патологических признаков, весом 16–18 г и возрастом 4–6 недель, которых разделили на 4 группы. Здоровые животные контрольной группы получали внутрибрюшинно по 100 мкл физраствора. Животные из 2, 3 и 4-й групп получали ПК внутрибрюшинно в дозе 25, 50 и 100 нг/мышь соответственно на 1, 2, 4 и 7-й день. Выведение из эксперимента осуществлялось на 10-й или на 21-й день после начала эксперимента. Гистологическую оценку тканей печени выведенных из эксперимента на 10-й день животных проводили согласно общепринятым гистологическим методикам. Иммуногистохимическое исследование проводили в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond™- maX (Leica, Германия). Использовали первичные кроличьи поликлональные антитела к рецептору витамина D.

Результаты и обсуждение. Введение ПК в разных дозах закономерно повышало общее количество клеток печени, экспрессирующих VDR, преимущественно за счет иммунных клеток. Увеличение процентного количества интенсивно окрашенных непаренхиматозных клеток (++++ и +++) наблюдалось к 21-му дню эксперимента и составило в подгруппе 2.2 – 56,0 %, 3.2 – 46,6 % и 4.2 – 48,0 %, в контрольной группе это значение составило 39,5 %. Наиболее близкое к контролю строение ткани печени наблюдалось у животных, которые получали ПК в дозе 25 нг/мышь. В группах мышей, где животные получали ПК в дозах 50 нг/мышь и 100 нг/мышь, отмечались определенные морфологические изменения, носящие преимущественно дистрофический и дисциркуляторный характер, что отражало токсическое влияние этих доз ПК на метаболизм гепатоцитов.

Заключение. Введение разных доз парикальцитола приводит к повышению экспрессии VDR преимущественно в непаренхиматозных клетках печени, осуществляющих иммунные функции. Экспрессия VDR в гепатоцитах всех подгрупп возрастала к 10-му дню наблюдения и снижалась к 21-му дню, что, вероятно, было обусловлено гибелью этих клеток. Микроскопическое исследование показало, что использование ПК у здоровых мышей приводит к определенным дозозависимым изменениям в печени, наименее токсичной является доза ПК 25 нг/мышь.

Ключевые слова: гепатоциты, клетки Купфера, дистрофия, иммуногистохимия

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

© Сатаева Т. П., Малыгина В. Ю., Давыдова А. А., Кривенцов М. А., Гуртовая А. К., 2025
© Sataieva T. P., Malygina V. Yu., Davydova A. A., Kriventsov M. A., Gurtovaya A. K., 2025

Вклад авторов. Т. П. Сатаева – научное руководство работой, разработка дизайна рукописи и её написание, анализ и интерпретация статистических данных. В. Ю. Малыгина – сбор данных, выполнение практической части исследования, написание рукописи. А. А. Давыдова – выполнение практической части исследования. М. А. Кривенцов и А. К. Гуртовая – анализ и интерпретация статистических данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Источник финансирования. Исследование поддержано грантом РФФ 23-15-20015, соглашение от 20.04.2023.

Для цитирования: Сатаева Т. П., Малыгина В. Ю., Давыдова А. А., Кривенцов М. А., Гуртовая А. К. Влияние разных доз парикальцитола на экспрессию рецепторов к витамину D в ткани печени мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):188–195. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2071>

Effect of different doses of paricalcitol on the expression of vitamin D receptors in mice liver tissue

Tatiana P. Sataieva✉, Veronika Yu. Malygina, Alexandra A. Davydova, Maxim A. Kriventsov, Anna K. Gurtovaya

Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky V. I. Vernadsky Crimean Federal University. 5/7, Lenina Boulevard, Simferopol, Republic of Crimea, 295051, Russia

✉ **Corresponding author:** Tatiana P. Sataieva. **E-mail:** tanzcool@mail.ru

ORCID: Tatiana P. Sataieva – <https://orcid.org/0000-0001-6451-7285>;
Veronika Yu. Malygina – <https://orcid.org/0000-0002-7681-6773>;
Alexandra A. Davydova – <https://orcid.org/0000-0003-0843-1465>;
Maxim A. Kriventsov – <https://orcid.org/0000-0001-5193-4311>;
Anna K. Gurtovaya – <https://orcid.org/0000-0001-8633-1166>.

Received: 03.04.2025

Accepted: 25.07.2025

Published: 25.07.2025

Abstract

Introduction. The high doses of vitamin D lead to undesirable side effects such as hypercalcemia. Paricalcitol (PC) is a biologically active synthetic substance that selectively binds to intracellular vitamin D receptors and does not cause hypercalcemia. The effect of this drug on metabolic pathways, parathyroid hormone secretion, asthma and liver fibrosis is known, which confirms its wide clinical potential. However, only a few publications have been devoted to the effect of different doses of PC on the state of liver cells, which are the most important site of its metabolism.

Aim. To study the effect of intraperitoneal administration of different doses of paricalcitol on the degree of activation of vitamin D receptors and to conduct a morphological assessment of the state of liver tissue in mice.

Materials and methods. The experiment involved male BALB/c mice without external pathological signs, weighing 16–18 g and aged 4–6 weeks, which were divided into 4 groups. Healthy animals of the control group received 100 µl of saline solution intraperitoneally. Animals from the groups 2, 3, and 4 received PC intraperitoneally at the doses of 25 ng/mouse, 50 ng/mouse, and 100 ng/mouse, respectively on the days 1, 2, 4, and 7. Sacrifice was performed on the 10th or 21st day after the onset of the experiment. Histological assessment of liver tissues of animals removed from the experiment on day 10 was performed according to generally accepted histological methods. Immunohistochemical examination was performed automatically in a Bond™- maX immunohistostainer (Leica, Germany). Primary rabbit polyclonal antibodies to the vitamin D receptor were used.

Results and discussion. The introduction of PC in different doses consistently increased the total number of liver cells expressing VDR, mainly due to immune cells. An increase in the percentage of intensely stained non-parenchymatous cells (++++ and +++) was observed by the 21st day of the experiment and amounted to 56.0 % in subgroup 2.2, 3.2 – 46.6 % and 4.2 – 48.0 %, in the control group this value was 39.5 %. The liver tissue structure closest to the control was observed in animals that received PC at a dose of 25 ng/mouse. In the groups of mice where the animals received PC at doses of 50 ng/mouse and 100 ng/mouse, certain morphological changes were noted, mainly of a dystrophic and discirculatory nature, which reflected the toxic effect of these doses of PC on the metabolism of hepatocytes.

Conclusion. The administration of different doses of PC leads to an increase in VDR expression mainly in non-parenchymatous liver cells that perform immune functions. VDR expression in hepatocytes of all subgroups increased by the 10th day of observation and decreased by the 21st day, which was probably due to the death of these cells. Microscopic examination showed that the use of PC in healthy mice leads to certain dose-dependent changes in the liver, the least toxic dose of PC is 25 ng/mouse.

Keywords: hepatocytes, Kupffer cells, dystrophy, immunohistochemistry

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

Contribution of the authors. Tatiana P. Sataieva – scientific supervision of the work, development of the design of the manuscript and its writing, analysis and interpretation of statistical data. Veronika Yu. Malygina – collecting data, performing the practical part of the study, writing the manuscript. Alexandra A. Davydova – performance of the practical part. Maxim A. Kriventsov and Anna K. Gurtovaya – analysis and interpretation of statistical data. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant 23-15-20015, agreement dated 04/20/2023.

For citation: Sataieva T. P., Malygina V. Yu., Davydova A. A., Kriventsov M. A., Gurtovaya A. K. Effect of different doses of paricalcitol on the expression of vitamin D receptors in mice liver tissue. *Drug development & registration*. 2025;14(3):188–195. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2071>

ВВЕДЕНИЕ

Витамин D и его метаболиты необходимы для обеспечения различных физиологических процессов путем регулирования баланса кальция и фосфора [1–3]. В клинических и экспериментальных исследованиях показано, что витамин D может уменьшать окислительный стресс и воспаление, а также способен оказывать разнообразное воздействие на сердечно-сосудистую, репродуктивную, выделительную и иммунную системы, помимо своей важной роли в минерализации костной ткани [4–7].

Витамин D проявляет свое действие через рецепторы витамина D (VDR), которые были признаны частью суперсемейства ядерных рецепторов, которые присутствуют не только в тканях, участвующих в проявлении классических эффектов витамина D (таких как кости, кожа, кишечник и почки), но и в «неклассических» тканях (таких как мозг, сердце, печень, мышцы и жировая ткань) [8]. Эти рецепторы со своими лигандами в целевых клетках опосредуют разнообразные биологические эффекты, тем самым регулируя транскрипцию целевых генов (геномный путь в «неклассических» тканях) [9].

Витамин D и его рецепторы играют важную роль в модуляции воспалительных процессов и иммунной функции. Многие исследования как *in vivo*, так и *in vitro* продемонстрировали, что витамин D подавляет воспаление в тканях за счет снижения выработки провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 6 (ИЛ-6), ИЛ-8, ИЛ-12, фактор некроза опухоли-α (ФНО-α), интерферон γ (ИФН-γ) [10, 11]. VDR экспрессируются во многих клетках иммунной системы, включая моноциты, макрофаги, а также дендритные клетки, и могут быть перспективной мишенью при заболеваниях печени [12].

Природные формы витамина D обладают сходной фармакологической активностью и обеспечивают терапевтический эффект, как правило, за счет высоких доз, что нередко приводит к нежелательным побочным эффектам, главным образом к гиперкальциемии, включая кальцификацию кровеносных артерий и нефрокальциноз [13, 14].

В настоящее время разрабатываются новые производные витамина D с оптимизированной селективностью к рецепторам и сниженной системной токсичностью, что повышает их терапевтическую эффективность против рака, аутоиммунных расстройств и воспалительных заболеваний. В клинической практике применяются несколько аналогов витамина D, такие как альфакальцидол, парикальцитол и фалекальцитриол [15].

Парикальцитол (ПК) (19-нор-1,25-дигидроксивитамин D₂) является синтетическим аналогом D₂, который селективно связывается с рецептором витамина D и предотвращает секрецию паратиреоидного гормона. Препарат широко используется для лечения и профилактики вторичного гиперпаратиреоза при хронической почечной недостаточности. Кроме того, имеются сведения о противовоспалительных и антиоксидантных свойствах ПК [16]. В клинической практике ПК применяется для лечения вторичного гиперпаратиреоза у пациентов с хроническим поражением почек [17]. Недавнее исследование показало, что ПК замедляет экспрессию провоспалительных факторов, вызванных транслокацией NF-κB из цитоплазмы в ядро, тем самым улучшая течение экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. Более того, было показано, что препарат способен уменьшать экспериментальный интерстициальный фиброз почек, вызванный хронической почечной недостаточностью, за счет влияния на рецепторы ренина и ангиотензина и уменьшения воспаления [17]. Также было обнаружено, что ПК уменьшает повреждение печени, вызванное перевязкой желчных протоков, за счет подавления окислительного стресса [18]. Однако влиянию различных доз ПК на состояние клеток печени, которые являются важнейшим местом его метаболизма, посвящены единичные публикации.

Цель. Изучить влияние внутрибрюшинного введения разных доз ПК на степень активации рецепторов к витамину D и провести морфологическую оценку состояния ткани печени у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали самцов мышей линии BALB/c без внешних патологических признаков, весом 16–18 г и возрастом 4–6 недель. Животных разделили на следующие группы и подгруппы, представленные на рисунке 1.

Гистологическую оценку тканей печени вывели на 10-й день из эксперимента животных проводили согласно общепринятым гистологическим методам. Образцы печени, фиксированные 10%-м формалином, заливали в парафин и получали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое исследование проводили в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond™-maX (Leica, Германия). Использовали первичные кроличьи поликлональные антитела к рецептору витамина D (Affinity, cat. № DF6917, разведение 1:100). Визуализацию проводили с системой детекции BOND Funding Polymer Detection System (Leica, Великобритания). Микроскопический анализ

выполняли с помощью системы видеомикроскопии (микроскоп DM2000, камера DFC295, Leica, Германия). Количество позитивных клеток подсчитывали в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$. Интенсивность окрашивания оценивали как слабую «+» (светло-коричневое окрашивание), среднюю «++» (коричневое окрашивание) и сильную «+++ /++++» (темно-коричневое окрашивание).

Исследование было одобрено протоколом заседания комитета по этике № 10 от 23.11.2021 ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского». Работу с животными осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Минвуза № 724 от 13.11.1984).

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ STATISTICA 10.0, используя критерий Шапиро – Уилка для проверки нормальности распределения, дисперсионный анализ, метод Шеффе и критерий Даннета. Уровень значимости $p < 0,05$



Рисунок 1. Дизайн исследования

Figure 1. Design of the experiment

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение ПК повышало общее количество клеток печени, экспрессирующих VDR, при различных концентрациях и сроках наблюдения (таблица 1). Увеличение процентного количества интенсивно окрашенных клеток (++++ и +++) наблюдалось во всех экспериментальных группах на 21-й день эксперимента и составило в подгруппе 2.2 – 56,0 %, 3.2 – 46,6 % и 4.2 – 48,0 %, в контрольной группе это значение составило 39,5 %. Эти результаты указывают на вероятность того, что витамин D и его аналоги способны активно и длительно воздействовать на клетки печени через геномные пути (неклассические эффекты).

Экспрессия VDR в печени демонстрирует значительные различия в зависимости от типа клеток и дозы введения ПК. В гепатоцитах мышей контрольной группы экспрессия VDR была заметно низкая (+/+),

тогда как в непаренхиматозных клетках, включая клетки Купфера, печеночные синусоидальные эндотелиальные клетки, холангиоциты и печеночные звездчатые клетки, регистрировались более высокие уровни ядерной экспрессии (+++/++++).

Введение дозы 25 нг/мышь к 21-му дню наблюдения статистически значимо повышало количество положительных клеток печени, экспрессирующих VDR, по сравнению с контролем и 10-м днем наблюдения главным образом за счет увеличения экспрессии в непаренхиматозных иммунных клетках на фоне ее небольшого снижения в гепатоцитах. В течение многих лет считалось, что ключевой ролью витамина D во врожденном иммунитете является его способность стимулировать дифференцировку моноцитов-предшественников в более зрелые фагоцитарные макрофаги, также была продемонстрирована четкая связь

Таблица 1. Количество иммунопозитивно окрашенных к VDR клеток печени

Table 1. Number of liver cells immunopositively stained for VDR

Подгруппы Subgroups	Доза, срок ВиЭ Dose, period of sacrifice	Количество положительно окрашенных клеток, % от всех положительно окрашенных Number of positively stained cells, % of all positively stained cells				Сумма положительно окрашенных клеток Sum of positively stained cells
		Интенсивность окрашивания Color intensity of cell nucleus				
		++++	+++	++	+	
1	Контроль Control	18,2 ± 1,1	90,6 ± 6,3	79,2 ± 3,2	87,8 ± 2,5	275,8 ± 7,4
		6,6 %	32,8 %	28,7 %	31,8 %	100,0 %
2.1	ПК 25, 10-й день PC 25, Day 10	38,8 ± 3,3	84 ± 7,8	82,4 ± 4,1	92 ± 4,1	297,2 ± 9,4* **
		13,1 %	28,3 %	27,7 %	30,9 %	100 %
2.2	ПК 25, 21-й день PC 25, day 21	83,8 ± 6,4	98,2 ± 2,6	77,6 ± 2,6	71 ± 2,4	330,6 ± 6,4* ***
		25,3 %	29,7 %	23,5 %	21,5 %	100 %
3.1	ПК 50, 10-й день PC 50, day 10	13 ± 2,4	71,6 ± 8,8	92,4 ± 4,1	101,2 ± 8,1	278,2 ± 7,5***
		4,7 %	25,7 %	33,2 %	36,4 %	100
3.2	ПК 50, 21-й день PC 50, day 21	32,8 ± 2,3	109,8 ± 3,4	76,8 ± 5,1	85,6 ± 1,8	304,6 ± 8,4* ** ***
		10,7 %	35,9 %	25,2 %	28,1 %	100 %
4.1	ПК 100, 10-й день PC 100, Day 10	52,4 ± 3,3	91,8 ± 2,1	72,6 ± 1,6	71 ± 6,2	287,8 ± 4,4*** **
		18,2 %	31,9 %	25,2 %	24,7 %	100 %
4.2	ПК 100, 21-й день PC 100, day 21	65,4 ± 2,6	100,6 ± 5,2	97,2 ± 3,2	82 ± 3,4	345,2 ± 8,3* ***
		18,9 %	29,1 %	28,2 %	23,7 %	100 %

Примечание. * Различие средних с контрольной группой является статистически значимым на уровне значимости $p < 0,01$.

** Различие средних между подгруппой 2.1 и подгруппами 3.2 и 4.1 является статистически значимым на уровне значимости $p < 0,01$ и $p = 0,04$ соответственно.

*** Различие средних между группой 4.2 и подгруппами 2.2, 3.1, 3.2 и 4.1 является статистически значимым на уровне значимости $p < 0,01$.

Note. * The difference in means with the control group is statistically significant at the significance level of $p < 0.01$.

** The difference in means between subgroup 2.1 and subgroups 3.2 and 4.1 is statistically significant at the significance level of $p < 0.01$ and $p = 0.04$, respectively.

*** The difference in means between group 4.2 and subgroups 2.2, 3.1, 3.2 and 4.1 is statistically significant at the significance level of $p < 0.01$.

между витамином D и активацией Toll-подобных рецепторов TLR4 [19].

В 3-й группе, где животные получали более высокую дозу ПК 50 нг/мышь, повышение экспрессии VDR к 21-му дню наблюдалось преимущественно за счет непаренхиматозных клеток +++/++++, количество которых возрастало на 16,2 % по сравнению с 10-м днем на фоне уменьшения процента клеток +/-.

При введении ПК в дозе 100 нг/мышь к 10-му дню происходило резкое увеличение экспрессии во всех клеточных популяциях, при этом последующего увеличения экспрессии VDR к 21-му дню как в гепатоцитах, так и в непаренхиматозных клетках практически не наблюдалось.

При микроскопическом исследовании печени мышей контрольной группы наблюдается классическая гистологическая картина, характерная для здоровых животных. Гепатоциты, организованные в трабекулы, представляют собой крупные полигональные клетки эпителиальной природы, ядра округлой формы с участками гетеро- и эухроматина. В некоторых клетках визуализируются ядрышки. Среди гепатоцитов встречается умеренное количество двуядерных форм. В центре печеночных долек располагаются центральные вены, заполненные эритроцитами, синусоиды не расширены. (рисунок 2).

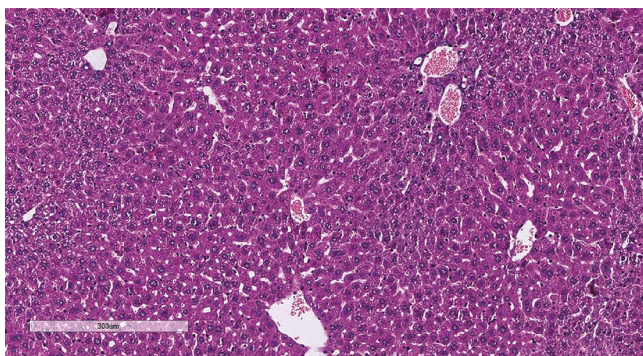


Рисунок 2. Слабо выраженное полнокровие центральных вен в ткани печени животного контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 9,6$

Figure 2. Mild plethora of central veins in liver tissue of the animal in the control group. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 9.6$

Наиболее близкое к контрольной группе строение ткани печени наблюдалось у животных первой экспериментальной группы, которая получала ПК в дозе 25 нг/мышь. У животных отмечались слабо выраженное полнокровие центральных вен и очаговые проявления дистрофических изменений. Гепатоциты со слабыми признаками внутриклеточного отека располагались в перипортальной зоне. Вокруг центральных вен гепатоциты имели обширную эозинофильную мелкозернистую цитоплазму (рисунок 3, А).

В группах мышей, где животные получали ПК в дозах 50 нг/мышь и 100 нг/мышь, отмечались определенные микроскопические изменения, носящие преимущественно дистрофический и дисциркуляторный характер, что отражало токсическое влияние этих доз ПК на метаболизм гепатоцитов. Печеночные дольки теряли свою четкую гексагональную структуру. Рисунок ткани печени в целом выглядел стертым. Центральные вены были резко расширены, заполнены эритроцитами, синусоиды сужены (рисунок 3, Б).

На фоне вакуольной дистрофии гепатоцитов в ткани печени животных 3-й экспериментальной группы определялись множественные двуядерные гепатоциты, что отражало процессы компенсаторной регенерации (рисунок 3, В).

За счет выраженного внутриклеточного отека в печеночных балках отмечалось нарушение нормальной гистоархитектоники, что особенно сильно проявлялось у животных третьей экспериментальной группы, получавших ПК в дозе 100 нг/мышь. Гепатоциты периферической части печеночной дольки демонстрировали более тяжелые дистрофические изменения, их цитоплазма выглядела оптически прозрачной или заполненной крупными вакуолями. Ядра в таких клетках были, как правило, округлые, гиперхромные и располагались центрально (рисунок 3, Г). Можно предположить, что, помимо метаболических нарушений, высокая доза ПК (100 нг/мышь) сама по себе может вызывать выработку провоспалительных цитокинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение разных доз парикальцитола приводит к повышению экспрессии VDR преимущественно в непаренхиматозных клетках печени, осуществляющих иммунные функции. Экспрессия VDR в гепатоцитах всех подгрупп возрастала к 10-му дню наблюдения и снижалась к 21-му дню, что, вероятно, было обусловлено гибелью этих клеток.

Микроскопическое исследование показало, что использование ПК у здоровых мышей приводит к определенным дозозависимым изменениям в печени. Вероятное перенапряжение адаптационных механизмов приводит к гидропической дистрофии гепатоцитов и компенсаторному увеличению числа двуядерных гепатоцитов в 3-й и 4-й группах. Во 2-й группе такие изменения выявлены не были. При этом у мышей этой экспериментальной группы отмечалась гиперплазия внутриклеточных органелл, которая проявлялась в наличии в цитоплазме множества эозинофильных гранул. Таким образом, у мышей наиболее благоприятным является использование дозировки ПК 25 нг/мышь.

Необходимы дальнейшие исследования для изучения роли витамина D и VDR в метаболизме клеток печени как в норме, так и при патологии.

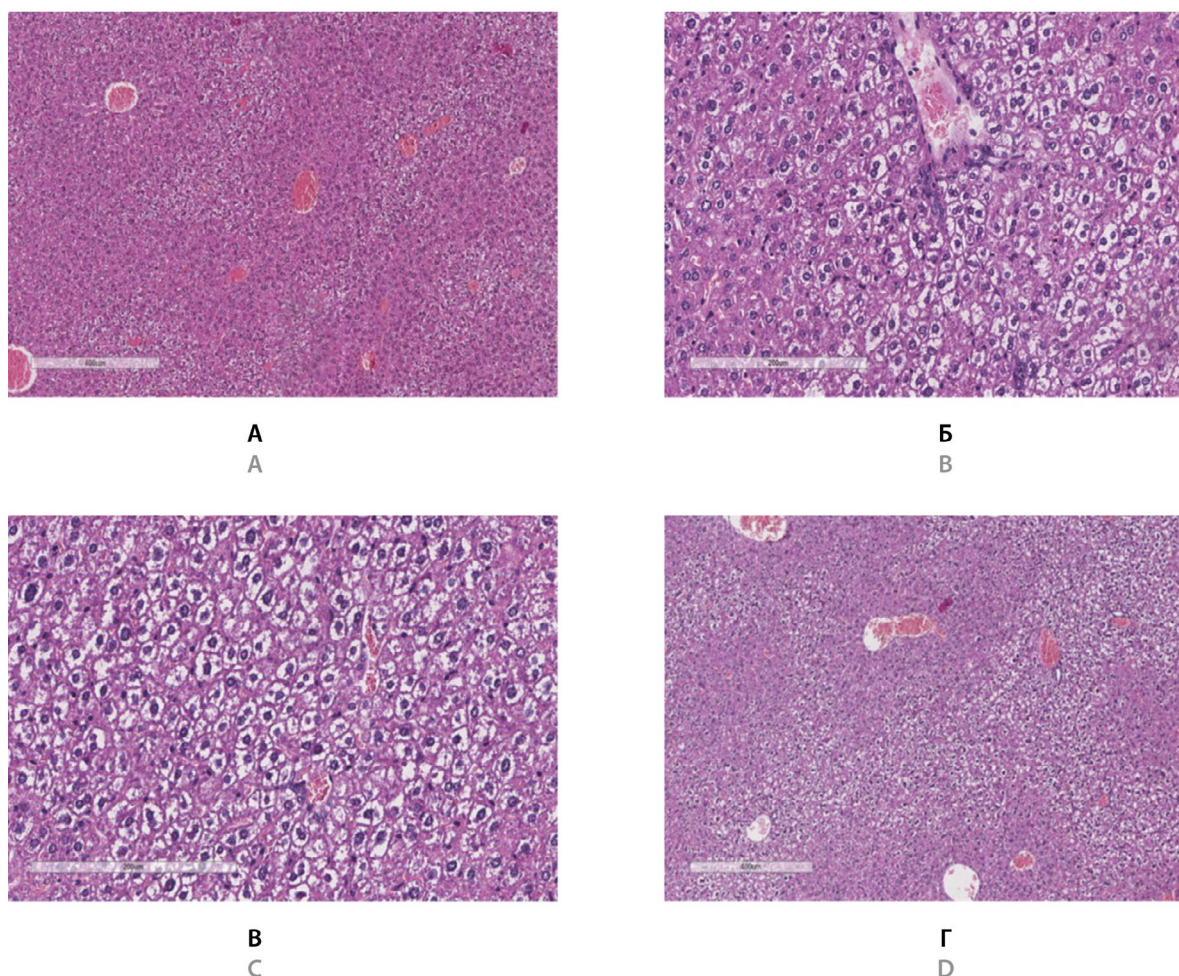


Рисунок 3. Морфологические изменения печени мышей на фоне введения различных доз ПК.

А – полнокровные центральные вены и слабовыраженная гидропическая дистрофия перипортально расположенных гепатоцитов у животного 2-й экспериментальной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 17,2$; **Б** – полнокровные сосуды печени мыши из 3-й экспериментальной группы, получавшей дозу ПК 50 нг/мышь. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 6$; **В** – множественные двоядерные формы гепатоцитов мыши из 3-й экспериментальной группы, получавшей дозу ПК 50 нг/мышь. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 17,2$; **Г** – выраженная гидропическая дистрофия гепатоцитов мыши из 4-й экспериментальной группы, получавшей дозу ПК 100 нг/мышь. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 20$

Figure 3. Morphological changes in the mouse liver after administration of various doses of PC.

A – Congested central veins and mild hydropic degeneration of periportal hepatocytes in an animal of the third experimental group. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 17,2$; **B** – Congestion of liver vessels in mice from the 3rd experimental group that received a dose of PC of 50 ng/mouse. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 6$; **C** – Multiple binuclear forms of hepatocytes in mice from the 3rd experimental group that received a dose of PC of 50 ng/mouse. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 17,2$; **D** – Severe hydropic degeneration of hepatocytes in mice from the 4th experimental group that received a dose of PC of 100 ng/mouse. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 20$

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wimalawansa S.J. Physiological Basis for Using Vitamin D to Improve Health. *Biomedicines*. 2023;11(6):1542. DOI: 10.3390/biomedicines11061542.
2. Tan C.-H. N., Yeo B., Vasanwala R. F., Sultana R., Lee J. H., Chan D. Vitamin D Deficiency and Clinical Outcomes in Critically Ill Pediatric Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the Endocrine Society*. 2025;9(5):bvaf053. DOI: 10.1210/jendso/bvaf053.
3. Chen X., Zhou M., Yan H., Chen J., Wang Y., Mo X. Association of serum total 25-hydroxy-vitamin D concentration and risk of all-cause, cardiovascular and malignancies-specific mortality in patients with hyperlipidemia in the United States. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9:971720. DOI: 10.3389/fnut.2022.971720.
4. Warren M. F., Livingston K. A. Implications of Vitamin D Research in Chickens can Advance Human Nutrition and Perspectives for the Future. *Current Developments in Nutrition*. 2021;5(5):nzab018. DOI: 10.1093/cdn/nzab018.

5. Radu I. A., Ognean M. L., Ștef L., Giurgiu D. I., Cucerea M., Gheonea C. Vitamin D: What We Know and What We Still Do Not Know About Vitamin D in Preterm Infants-A Literature Review. *Children*. 2025;12(3):392. DOI: 10.3390/children12030392.
6. Izzo M., Carrizzo A., Izzo C., Cappello E., Cecere D., Ciccarelli M., Iannece P., Damato A., Vecchione C., Pompeo F. Vitamin D: Not Just Bone Metabolism but a Key Player in Cardiovascular Diseases. *Life*. 2021;11(5):452. DOI: 10.3390/life11050452.
7. Phillips E. A., Hendricks N., Bucher M., Maloyan A. Vitamin D Supplementation Improves Mitochondrial Function and Reduces Inflammation in Placentae of Obese Women. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:893848. DOI: 10.3389/fendo.2022.893848.
8. Menger J., Lee Z.-Y., Notz Q., Wallqvist J., Hasan M. S., Elke G., Dworschak M., Meybohm P., Heyland D. K., Stoppe C. Administration of vitamin D and its metabolites in critically ill adult patients: an updated systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Care*. 2022;26(1):268. DOI: 10.1186/s13054-022-04139-1.
9. Huang H.-Y., Lin T.-W., Hong Z.-X., Lim L.-M. Vitamin D and Diabetic Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(4):3751. DOI: 10.3390/ijms24043751.
10. Masbough F., Kouчек M., Koosha M., Salarian S., Miri M., Raoufi M., Taherpour N., Amniati S., Sistanizad M. Investigating the Effect of High-Dose Vitamin D3 Administration on Inflammatory Biomarkers in Patients with Moderate to Severe Traumatic Brain Injury: A Randomized Clinical Trial. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2024;49(10):643–651. DOI: 10.30476/ijms.2023.99465.3156.
11. Wimalawansa S. J. Rapidly Increasing Serum 25(OH)D Boosts the Immune System, against Infections–Sepsis and COVID-19. *Nutrients*. 2022;14(14):2997. DOI: 10.3390/nu14142997.
12. Zhang Y., Zhou J., Hua L., Li P., Wu J., Shang S., Deng F., Luo J., Liao M., Wang N., Pan X., Yuan Y., Zheng Y., Lu Y., Huang Y., Zheng J., Liu X., Li X., Zhou H. Vitamin D receptor (VDR) on the cell membrane of mouse macrophages participates in the formation of lipopolysaccharide tolerance: mVDR is related to the effect of artesunate to reverse LPS tolerance. *Cell Communication and Signaling*. 2023;21(1):124. DOI: 10.1186/s12964-023-01137-w.
13. Brandenburg V., Ketteler M. Vitamin D and Secondary Hyperparathyroidism in Chronic Kidney Disease: A Critical Appraisal of the Past, Present, and the Future. *Nutrients*. 2022;14(15):3009. DOI: 10.3390/nu14153009.
14. Izzo C., Secondulfo C., Bilancio G., Visco V., Virtuoso N., Migliarino S., Ciccarelli M., Di Pietro P., La Mura L., Damato A., Carrizzo A., Vecchione C. Chronic Kidney Disease with Mineral Bone Disorder and Vascular Calcification: An Overview. *Life*. 2024;14:418. DOI: 10.3390/life14030418.
15. Magagnoli L., Cassia M., Galassi A., Ciceri P., Massó E., Gelpi R., Bover J., Cozzolino M. Vitamin D: are all compounds equal? *Clinical Kidney Journal*. 2025;18(1):i61–i96. DOI: 10.1093/ckj/sfae417.
16. Patel R., Nandini, Kharkwal H., Saha M., Sankaranarayanan M., Sharma S., Chander S. Recent Advancements Towards the Use of Vitamin D Isoforms and the Development of Their Synthetic Analogues as New Therapeutics. *Biomedicines*. 2025;13(4):1002. DOI: 10.3390/biomedicines13041002.
17. Qu Y., Wu Y., Jiang H. Research progress in the pharmacological actions of the multiple effects and selectivity of the vitamin D analogue paricalcitol: a narrative review. *Annals of Palliative Medicine*. 2021;10(10):11177–11190. DOI: 10.21037/apm-21-2249.
18. Jia R., Yang F., Yan P., Ma L., Yang L., Li L. Paricalcitol inhibits oxidative stress-induced cell senescence of the bile duct epithelium dependent on modulating Sirt1 pathway in cholestatic mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021;169:158–168. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.019.
19. Wang S., Huang S., Liu X., He Y., Liu Y. Paricalcitol ameliorates acute kidney injury in mice by suppressing oxidative stress and inflammation via Nrf2/HO-1 signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(2):969. DOI: 10.3390/ijms24020969.



Эффективность применения экзосом на модели хронического кожного поражения *in vivo*

И. И. Глазко¹, Е. А. Дубова¹, И. Е. Балакин^{1✉}, О. В. Рукодайн², В. И. Пустовойт¹

¹ 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. Маршала Новикова, д. 23

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Факультет непрерывного медицинского образования, Медицинский институт. 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

✉ Контактное лицо: Балакин Евгений Игоревич. E-mail: evgbalakin@yandex.ru

ORCID: И. И. Глазко – <https://orcid.org/0000-0001-8512-3736>;

Е. А. Дубова – <https://orcid.org/0000-0002-7115-538X>;

И. Е. Балакин – <https://orcid.org/0000-0001-5545-135X>;

О. В. Рукодайн – <https://orcid.org/0000-0001-9134-7189>;

В. И. Пустовойт – <https://orcid.org/0000-0003-3396-5813>.

Статья поступила: 16.06.2025

Статья принята в печать: 18.08.2025

Статья опубликована: 22.08.2025

Резюме

Введение. Хронические язвы кожи, включая радиационно-индуцированные, связаны с нарушением регенерации, хроническим воспалением и высоким риском осложнений, что требует новых подходов к лечению из-за низкой эффективности традиционных методов. Современные методы регенеративной медицины, такие как применение биополимерных покрытий и экзосомальных препаратов, способствуют восстановлению тканей за счет улучшения микроокружения, стимуляции клеточной активности и модуляции воспаления.

Цель. Разработка модели хронического радиационно-индуцированного кожного поражения и оценка эффективности экзосом, произведенных в клинике регенеративной медицины «Новейшая медицина», монотерапии медицинским изделием (МИ) СФЕРО®гель, а также их комбинированного применения у лабораторных животных.

Материалы и методы. В эксперименте использовали 48 крыс стока Wistar, которым моделировали хроническое кожное поражение посредством фракционированного рентгеновского облучения (5 × 10 Гр), механической травмы и индукции стойкого воспаления [введение липополисахарида (LPS)]. Животные были рандомизированы на четыре группы: контрольную, МИ СФЕРО®гель, экзосомы и комбинированную терапию. Лечение проводили в течение 28 суток. Эффективность оценивали с помощью морфометрии язвенной поверхности (ImageJ) и гистологического анализа.

Результаты и обсуждение. Применение экзосом («Новейшая медицина») и МИ СФЕРО®гель значительно ускоряло процессы репарации, снижало выраженность фиброза и воспаления. Комбинированная терапия обеспечила полную эпителизацию у 75 % животных, нормализацию ангиогенеза и восстановление дермальной структуры.

Заключение. Комбинированное применение МИ СФЕРО®гель и экзосом («Новейшая медицина») оказывает синергетический эффект в терапии хронических радиационных язв, что подтверждает перспективность данного подхода для клинической трансляции в восстановительной медицине.

Ключевые слова: хронические язвы кожи, радиационные повреждения, СФЕРО®гель, фракционированное облучение, регенеративная терапия, восстановительная медицина

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

Вклад авторов. И. И. Глазко и Е. А. Дубова придумали, разработали дизайн и провели эксперимент. В. И. Пустовойт и О. В. Рукодайн участвовали в обработке данных, оформлении статьи, формировании заключения. Е. И. Балакин проводил поиск и систематизацию литературных данных.

Благодарность. Исследование проводилось на инициативной основе.

Для цитирования: Глазко И. И., Дубова Е. А., Балакин И. Е., Рукодайный О. В., Пустовойт В. И. Эффективность применения экзосом на модели хронического кожного поражения *in vivo*. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2025;14(3):196–204. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2123>

Efficacy of exosomes in a chronic skin lesion model *in vivo*

Irina I. Glazko¹, Elena A. Dubova¹, Evgenii I. Balakin^{1✉}, Oleg V. Rukodayny², Vasily I. Pustovoit¹

¹ Federal Medical Biophysical Center named after A. I. Burnazyan of Federal Medical Biological Agency of Russia. 23, Marshala Novikova str., Moscow, 123098, Russia

² Institute of Medicine, RUDN University или Medical Institute, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia. 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Evgenii I. Balakin. **E-mail:** evgbalakin@yandex.ru

ORCID: Irina I. Glazko – <https://orcid.org/0000-0001-8512-3736>;

Elena A. Dubova – <https://orcid.org/0000-0002-7115-538X>;

Evgenii I. Balakin – <https://orcid.org/0000-0001-5545-135X>;

Oleg V. Rukodayny – <https://orcid.org/0000-0001-9134-7189>;

Vasily I. Pustovoit – <https://orcid.org/0000-0003-3396-5813>.

Received: 16.06.2025

Accepted: 18.08.2025

Published: 22.08.2025

Abstract

Introduction. Chronic skin ulcers, including radiation-induced ones, are associated with impaired regeneration, chronic inflammation and a high risk of complications, which requires new approaches to treatment due to the low efficiency of traditional methods. Modern methods of regenerative medicine, such as application of biopolymer coatings and exosomal drugs, promote tissue restoration by improving the microenvironment, stimulating cellular activity and modulating inflammation.

Aim. To develop a model of chronic radiation-induced skin injury and assess the therapeutic efficacy of monotherapy with medical device SPHERO®gel, exosome therapy (manufactured by New Medicine Stem Cell Clinic), and their combination in laboratory animals.

Materials and methods. The study involved 48 male Wistar rats subjected to fractionated X-ray irradiation (5 × 10 Gy), mechanical skin injury, and persistent inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) injection. Animals were randomized into four groups: control, SPHERO®gel, exosomes (manufactured by New Medicine Stem Cell Clinic), and combined treatment. Therapy was applied for 28 days. Wound healing efficacy was evaluated using ulcer area morphometry (ImageJ) and histological examination.

Results and discussion. Both SPHERO®gel and exosome (New Medicine Stem Cell Clinic) therapy significantly enhanced tissue repair, reduced fibrosis and inflammation. The combined therapy resulted in complete epithelialization in 75 % of animals, normalized angiogenesis, and restored dermal architecture.

Conclusion. The combination of SPHERO®gel and exosomes (manufactured by New Medicine Stem Cell Clinic) demonstrates a synergistic effect in the treatment of chronic radiation-induced ulcers and holds promise for clinical application in regenerative and restorative medicine.

Keywords: chronic skin ulcers, radiation injury, SPHERO®gel, fractionated irradiation, regenerative therapy, restorative medicine

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 I. Glazko and Elena A. Dubova conceived, developed the design and conducted the experiment. Vasily I. Pustovoit and Oleg V. Rukodayny participated in data processing, article design, and conclusion formation. Evgenii I. Balakin conducted the search and systematization of literary data.

Acknowledgment. The study was conducted on an initiative basis.

For citation: Glazko I. I., Dubova E. A., Balakin E. I., Rukodayny O. V., Pustovoit V. I. Efficacy of exosomes in a chronic skin lesion model *in vivo*. *Drug development & registration*. 2025;14(3):196–204. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2123>

ВВЕДЕНИЕ

Хронические язвы кожи, в том числе возникающие после радиационного повреждения тканей, являются серьезной клинической проблемой, сопряжен-

ной с выраженным снижением регенеративного потенциала, хронизацией воспалительного процесса, фиброзом и риском суперинфекции. Такие состояния требуют длительной и комплексной терапии, однако

существующие консервативные подходы демонстрируют ограниченную эффективность [1–4]. В частности, радиационно-индуцированные язвы характеризуются нарушением микроциркуляции, гибелью стволовых и пролиферативных клеток, дефицитом факторов роста и неэффективностью классических методов лечения [5–8].

Современные тенденции в регенеративной медицине предполагают использование биополимерных покрытий и клеточно-экзосомальных технологий для восстановления тканевого гомеостаза и стимуляции репаративных процессов [9, 10]. Биополимерные гели, такие как МИ СФЕРО®гель, обеспечивают защиту раневой поверхности и создают оптимальные условия для регенерации [11, 12]. Экзосомальные препараты, обогащенные факторами роста, микроРНК и сигнальными молекулами, способствуют активации фибробластов, кератиноцитов и ангиогенеза, а также модулируют воспалительный ответ [13–16].

В условиях дефицита адекватных моделей хронических язв, отражающих патогенез радиационно-индуцированных поражений, актуальной задачей является их разработка с последующей оценкой эффективности перспективных терапевтических подходов.

Целью настоящего исследования являлась разработка модели хронического кожного поражения у лабораторных животных и анализ терапевтического потенциала МИ СФЕРО®гель, экзосом («Новейшая медицина») и их комбинации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и условия содержания

Использовали 48 самцов крыс (Wistar, 8–10 недель, 330–400 г), полученных из питомника РАН (Пущино, Россия). Условия содержания: 22 ± 2 °C, влажность 50–60 %, световой режим 12/12 ч, корм и вода *ad libitum*. Исследование соответствовало ETS 123 и одобрено локальным этическим комитетом. Животные прошли 14-дневный карантин и ветеринарный осмотр. Особи с заболеваниями или отклонениями от нормы исключались.

Общая схема эксперимента

Моделирование хронического кожного поражения осуществляли трехэтапной процедурой: фракционированным рентгеновским облучением; механической травмой язвы; индукцией хронического воспаления. Терапию начинали на 8-е сутки и проводили в течение 28 дней (рисунок 1).

Модель хронического кожного поражения

Фракционированное рентгеновское облучение

Облучали при легкой седации (золазепам + ксилазин, 5/5 мг/кг, i.p.) локально область (3 × 3 см) спины на рентгеновской установке РУМ-17 (Россия), ра-



Рисунок 1. Схематическое представление дизайна эксперимента

Figure 1. Schematic representation of the experimental design

ботающей в режиме: напряжение 150 кВ; сила тока 6 мА; фильтр Al – 1 мм. Всего выполнили 5 фракций по 10 Гр с интервалом 48 ч.

Фракционированное облучение позволяет моделировать отдаленные последствия, включая развитие стойкого сосудистого повреждения, сублетальной гибели клеток и прогрессирующего фиброза.

Механическая травма

На 7-е сутки после облучения под легкой седацией с соблюдением асептических условий формировали язвенную поверхность с помощью 12 перфораций стерильной инсулиновой иглой калибра 27G (по шкале Гейдж) по периметру области облу-

чения. Методика позволяет создать условия для локальной микроишемии и механического нарушения краевого эпителия, моделируя неэпителизирующуюся язву.

Индукция хронического воспаления

После механической травмы в край язвы вводили 100 мкг липополисахарид (LPS) из *Escherichia coli* производства Sigma-Aldrich, Германия, в 50 мкл физраствора для индукции стойкого воспаления, активации макрофагов и нейтрофилов с выработкой провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6), что необходимо для хронизации процесса [18]. Модель объединяет ключевые патогенетические элементы хронической язвы: радиационное повреждение сосудов и стромы, нарушение эпидермального барьера и персистирующее воспаление.

Группы лечения

На 8-е сутки животные были рандомизированы в 4 группы ($n = 12$): 1) контроль без лечения; 2) МИ СФЕРО®гель (1 мл/день, равномерное распределение по поверхности язвы); 3) экзосомы (50 мкл/день); 4) комбинация экзосом (50 мкл) с последующим нанесением МИ СФЕРО®гель (1 мл).

Экзосомальный препарат

Экзосомы получали из культуральной среды мезенхимальных стромальных клеток человека (пассажи 3–5), выращенных на среде α MEM с 4%-м лизата человеческих тромбоцитов (Compras, США). После достижения 70–80 % конfluентности клетки инкубировали 48 ч в бесывороточной среде, затем супернатант центрифугировали (300g) 10 мин для удаления клеточных фрагментов; после чего фильтровали через 0,45 мкм фильтр и часа очищали каскадной тангенциальной фильтрацией. Мембраны в системе тангенциальной фильтрации подбирали с пределами отсека 100 и 1000 кДа. После очистки проводили стерилизующую фильтрацию препарата. Концентрацию экзосом определяли методом BCA assay (Thermo Fisher Scientific, США) и Nanoparticle Tracking Analysis на приборе NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Великобритания), выявив частицы размером 70–150 нм. Препарат (50 мкл) ежедневно наносили на язвенную поверхность с 8-го по 35-й день терапии.

Оценка эффективности

Морфометрия язвенной поверхности

Площадь язвенной поверхности измеряли в динамике на 8, 14, 21, 28, 35 и 49-е сутки. Фотодокументацию выполняли камерой Canon EOS 1100D при стандартном освещении. Количественный анализ

проводили в программе ImageJ (НИН) с ручной калибровкой масштаба, рассчитывая изменение площади в процентах относительно исходного размера на 8-е сутки.

Морфология и гистология

Для морфологической оценки образцы кожи забирали на 35-е и 49-е сутки (по 6 животных/группу/точку), включая центральную зону язвы и прилегающие ткани (≥ 5 мм от края). Фиксацию проводили в 10%-м нейтральном формалине (pH 7,4) 24–48 ч с последующей стандартной проводкой через спирты, ксилол и заливку в парафин (+58 °C).

Серийные срезы толщиной 4–5 мкм получали на микротоме Leica RM2235. Окрашивали гематоксилин-эозином (оценка эпидермиса, дермы, воспаления) и по Массону (коллагеновый фиброз).

Анализ выполняли на микроскопе Leica DM2000 ($\times 100$ –400) с документированием камерой Leica DFC450 C (программа Leica Application Suite). Оценку проводили два заслепленных морфолога независимо.

Иммуногистохимия

Для иммуногистохимического анализа образцов кожи (35-е и 49-е сутки) проводили оценку пролиферации (Ki67), ангиогенеза (CD31), фиброза (α -SMA) и воспаления (CD68). Срезы 4–5 мкм депарафинировали, проводили антигенное восстановление в цитратном буфере (pH 6,0, 95 °C, 20 мин) и блокирование эндогенной пероксидазы 3%-го H_2O_2 . После блокирования неспецифического связывания 5%-го BSA (бычьего сывороточного альбумина) инкубировали с первичными антителами (Ki67 1:200, CD31 1:100, α -SMA 1:500, CD68 1:200) при +4 °C 16–18 ч. После промывания фосфатно-солевым буфером (PBS) наносили вторичные антитела, конъюгированные с полимерной системой обнаружения (EnVision, Dako), в течение 30 мин при комнатной температуре. Визуализацию выполняли с субстратом DAB (3,3'-диаминобензидина), контрастировали ядра гематоксилином Майера. Анализ проводили на микроскопе Leica DM2000 ($\times 100$ –400), оценивая 5 случайных полей зрения ($\times 400$) в Leica Application Suite. Количественно анализировали Ki67⁺, CD68⁺-клетки и CD31⁺-сосуды; α -SMA оценивали по 4-балльной шкале: 0 – отсутствие окрашивания; 1 – слабое окрашивание; 2 – умеренное окрашивание; 3 – сильное диффузное окрашивание. Исследование выполняли два заслепленных морфолога.

Статистический анализ

Данные представлены как $M \pm SD$. Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро – Уилка. Сравнение групп проводили однофакторным ANOVA с пост-хок-тестом Тьюки при выявлении зна-

чимых различий. Для ранговых показателей (степень фиброза по α -SMA) применяли критерий Краскела – Уоллиса с попарными сравнениями по Данну. Уровень значимости $p < 0,05$. Анализ выполняли в GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрический анализ выявил существенные различия в динамике площади язв между группами (рисунок 2). В контроле у 83 % животных сохранялась язва к 35-м суткам (65 ± 12 % от исходной площади). К 49-м суткам язва оставалась у 50 % особей, что подтверждало низкую спонтанную регенерацию в условиях моделирования хронического поражения.

В группе МИ СФЕРО®гель с 14-х суток наблюдалось достоверное сокращение площади язвы ($p < 0,05$ vs контроль). К 35-м суткам площадь составила 40 ± 8 %, однако в 67 % случаев отмечалось форми-

рование плотного фиброзного слоя, указывающего на рубцовый тип заживления.

Экзосомная терапия («Новейшая медицина») обеспечила выраженный регенеративный эффект: к 21-м суткам площадь язвы уменьшилась до 35 ± 9 %, к 35-м суткам – до 25 ± 6 % ($p < 0,01$ vs контроль), с восстановлением дермальной архитектоники, формированием зрелой сосудистой сети и минимальным фиброзом.

Комбинированная терапия (экзосомы + МИ СФЕРО®гель) показала наибольшую эффективность: к 35-м суткам площадь язвы уменьшилась до 15 ± 4 %, а к 49-м суткам полная эпителизация достигнута у 75 % животных, с достоверными отличиями от контроля и монотерапии ($p < 0,001$) (рисунок 3).

Морфологическое исследование подтвердило различия в качестве репаративных процессов между исследуемыми группами (таблица 1).

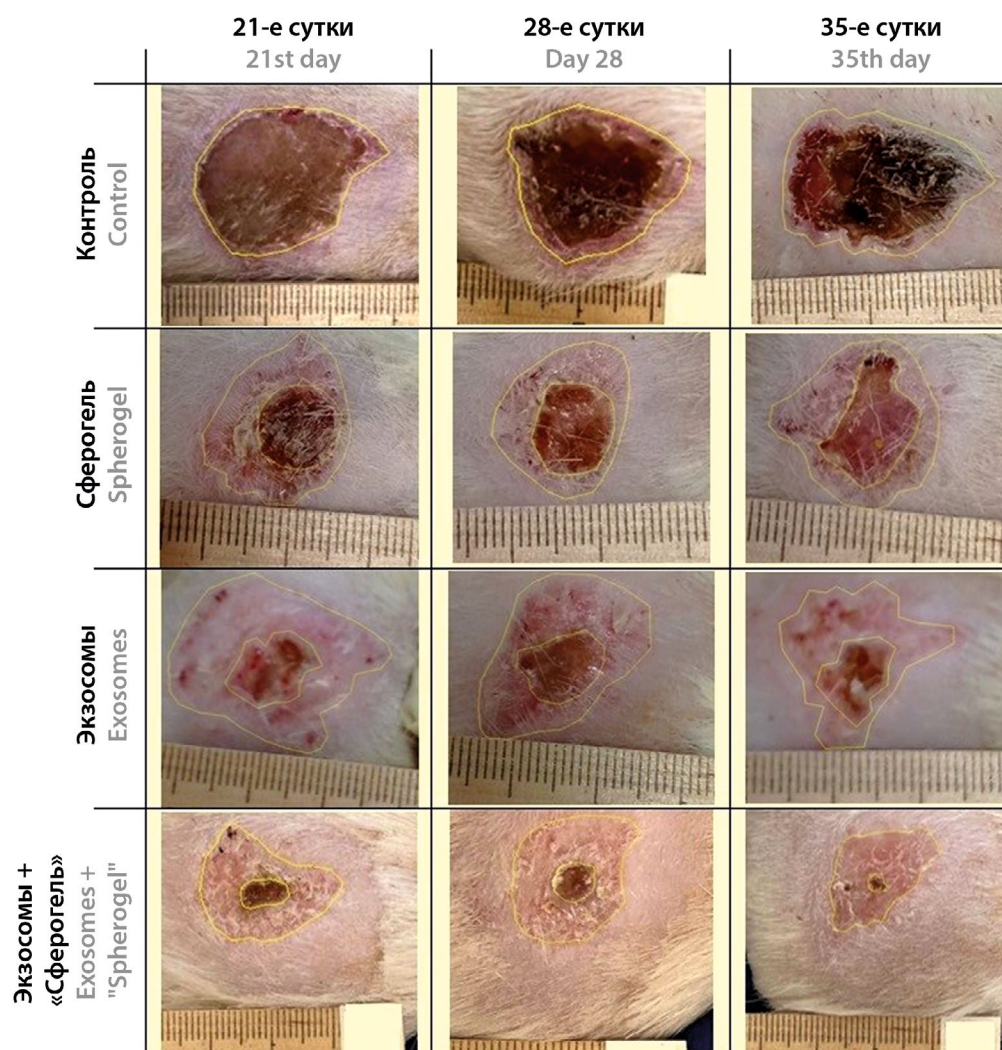


Рисунок 2. Динамика площади язвенной поверхности в исследуемых группах

Figure 2. Dynamics of ulcer surface area in the study groups

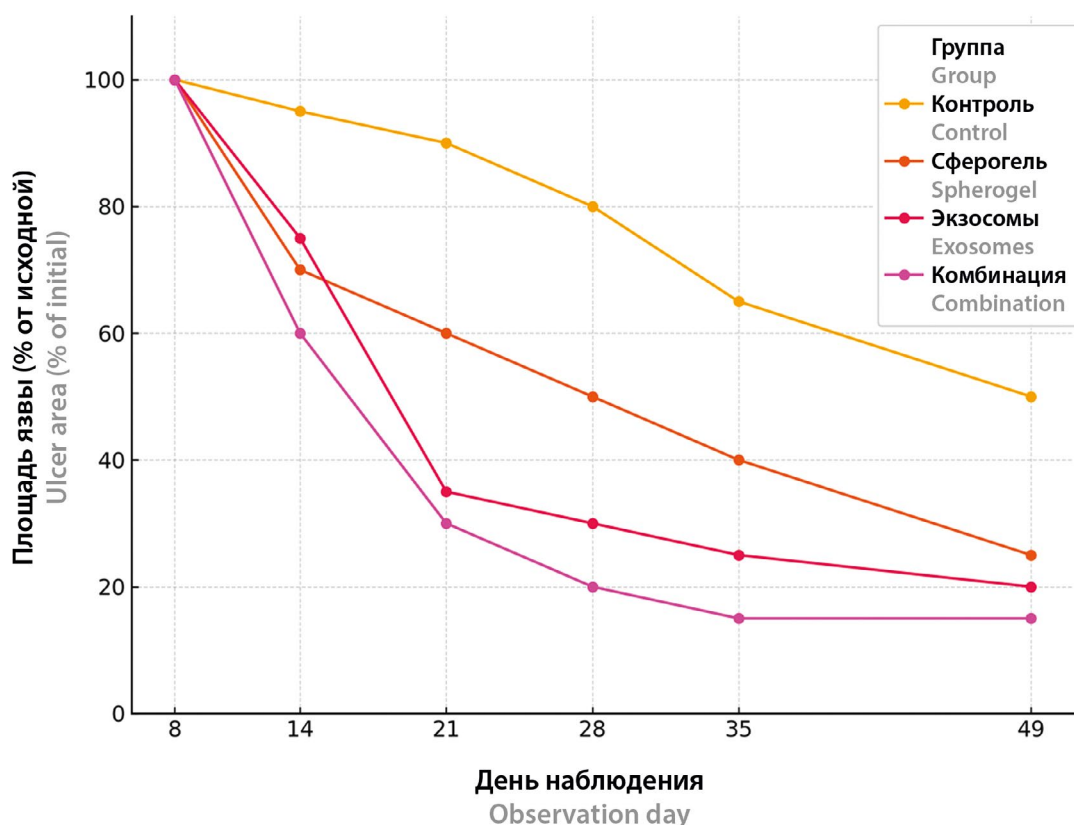


Рисунок 3. Динамика площади язвенного поражения (% от исходного значения) в экспериментальных группах на протяжении наблюдения

Figure 3. Dynamics of the area of ulcerative lesions (% of the initial value) in the experimental groups during the observation period

Контрольная группа на 35–49-е сутки сохраняла признаки хронического воспаления с дезорганизацией коллагеновых волокон (фиброз 3 балла) и дефицитом васкуляризации. В группе МИ СФЕРО®гель 50 % случаев достигли эпителизации, но сохранялся плотный коллагеновый слой (фиброз 2–3 балла) и незрелая сосудистая сеть, количество сосудов умеренно увеличено (6 ± 2 сосуда / поле $\times 400$).

Экзосомная терапия препаратом клиники «Новейшая медицина» обеспечила восстановление толщины эпидермиса, упорядоченность коллагена (фиброз 0–1 балл) и активный ангиогенез (12 ± 3 сосуда / поле $\times 400$). Комбинированное лечение дало наилучшие результаты: полное восстановление дермальной архитектоники, минимальный фиброз (0–1 балл) и максимальная васкуляризация (14 ± 3 сосуда / поле $\times 400$).

Воспалительные изменения

Анализ воспалительных изменений выявил значимые межгрупповые различия. В контроле к 49-м суткам сохранялся выраженный нейтрофильно-макрофагальный инфильтрат. СФЕРО®гель снижал нейт-

рофильный компонент, формируя макрофагально-лимфоцитарный инфильтрат.

Экзосомная терапия к 35-м суткам уменьшала клеточную инфильтрацию, а к 49-м суткам оставляла лишь лимфоцитарный компонент. Комбинированное лечение обеспечивало минимальный лимфоцитарный инфильтрат уже к 35-м суткам без выраженной макрофагальной реакции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанная модель хронического кожного поражения, сочетающая фракционированное рентгеновское облучение с механической травмой и бактериальной стимуляцией (LPS), достоверно воспроизводит патогенетические механизмы радиационно-индуцированных язв. Модель характеризуется устойчивым язвенным дефектом с выраженным воспалением, нарушением микроциркуляции, подавленной регенерацией и избыточным фиброзированием, что соответствует клинической картине хронических радиационных и посттравматических язв кожи [5, 6, 17].

Таблица 1. Гистологические и морфологические параметры регенерации кожи в экспериментальных группах на 49-е сутки
Table 1. Histological and morphological parameters of skin regeneration in experimental groups on the 49th day

Параметр Parameter	Контроль Control	СПЕРО®гель SPHERO®gel	Экзосомы («Новейшая медицина») Exosomes (New Medicine Stem Cell Clinic)	Комбинированная терапия Combination therapy
Степень эпителизации Epithelialization Degree	Частичная / отсутствует Partial / missing	Полная (50 %) Complete (50 %)	Полная (83–100 %) Complete (83–100 %)	Полная (100 %) Complete (100 %)
Структура дермы Structure of the dermis	Выраженная дезорганизация Marked disorganization	Дезорганизация волокон Fiber disorganization	Восстановление структуры Structure Restoration	Полное восстановление Full recovery
Фиброз (баллы 0–3) ¹ Fibrosis (score 0–3) ¹	3	2–3	0–2	0–1
Сосудистые изменения (CD31 ⁺ , сосуды / поле зрения x400) ² Vascular changes (CD31 ⁺ , vessels / visual field x400) ²	4 ± 1	6 ± 2	12 ± 3	14 ± 3
Воспалительный инфильтрат ³ Inflammatory infiltrate ³	Нейтрофилы + макрофаги, выраженный Neutrophils + macrophages, expressed	Макрофагально-лимфоцитарный Macrophage-lymphocytic	Лимфоцитарный, минимальный к 49 сут. Lymphocytic, minimal to 49 days	Минимальный, лимфоцитарный Minimal, lymphocytic

Примечание.¹ Фиброз оценивали полуколичественно по окраске Masson's Trichrome по 4-балльной шкале: 0 – отсутствие фиброза; 1 – легкий фиброз; 2 – умеренный фиброз; 3 – грубый плотный фиброз с дезорганизацией collagenовых волокон.

² Количество сосудов определяли по количеству CD31⁺-структур в 5 полях зрения (x400), среднее значение ± стандартное отклонение.

³ Клеточный состав воспалительного инфильтрата оценивали по H&E-окраске по преобладающему типу клеток в зоне дефекта (нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты).

Note.¹ Fibrosis was assessed semi-quantitatively by Masson's Trichrome staining on a 4-point scale: 0 – no fibrosis; 1 – mild fibrosis; 2 – moderate fibrosis; 3 – coarse dense fibrosis with disorganization of collagen fibers.

² The number of vessels was determined by the number of CD31⁺ structures in 5 visual fields (x400), mean value ± standard deviation.

³ The cellular composition of the inflammatory infiltrate was assessed by H&E stain, by the predominant cell type in the defect zone (neutrophils, macrophages, lymphocytes).

Экзосомальная терапия достоверно улучшила регенерацию поврежденной кожи, что согласуется с литературными данными [13, 14, 18, 19]. Экзосомы модулировали воспаление, активировали ангиогенез и стимулировали пролиферацию, что подтверждалось улучшением морфометрии язв, восстановлением дермальной архитектоники и снижением фиброзировани [18, 20–22].

Препарат «Сферогель» обеспечивал преимущественно механическую защиту и создание благоприятной среды для эпителизации, однако вызывал образование плотного рубцового фиброза, что соответствует литературным данным применения биополимерных покрытий [10, 23]. Комбинированная терапия экзосомами («Новейшая медицина») и МИ СФЕРО®-гель показала наилучшие результаты по скорости заживления и качеству регенерации [20, 24, 25], что объясняется синергизмом их действий: экзосомы стимулировали регенерацию и ангиогенез, а СФЕРО®-гель обеспечивал защиту и оптимальное микроокружение.

Результаты подтверждают перспективность комбинированной терапии с применением биополимерных покрытий (СФЕРО®-гель) и экзосом при лечении хронических язв. Разработанная модель служит эффективной платформой для тестирования инновационных подходов: генотерапии, факторов роста, стволовых клеток и оптимизации регенеративных схем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование подтвердило эффективность экзосом («Новейшая медицина») и МИ СФЕРО®-гель в стимуляции репарации хронических радиационно-индуцированных язв. Комбинированная терапия показала наилучшие результаты: нормализацию дермальной архитектоники, полную эпителизацию и минимальный фиброз, что перспективно для клинического применения.

Разработанная модель демонстрирует высокую воспроизводимость и адекватность для доклинической оценки терапевтических средств при хронических язвах различного генеза. Полученные данные обосновывают разработку новых комбинированных протоколов, сочетающих применение биополимерных покрытий с экзосомальными препаратами, для улучшения качества регенерации и снижения рубцевания.

Перспективными направлениями являются: оптимизация дозировок экзосом, создание функциональных биополимерных матриц для контролируемого высвобождения, а также клиническая валидация подхода у пациентов с хроническими язвами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yang X., Ren H., Guo X., Hu C., Fu J. Radiation-induced skin injury: pathogenesis, treatment, and management. *Aging*. 2020;12(22):23379–23393. DOI: 10.18632/aging.103932.
2. Barker H. E., Paget J. T. E., Khan A. A., Harrington K. J. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nature Reviews. Cancer*. 2015;15(7):409–425. DOI: 10.1038/nrc3958.
3. Kolimi P., Narala S., Nyavanandi D., Youssef A. A. A., Dudhipala N. Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. *Cells*. 2022;11(15):2439. DOI: 10.3390/cells11152439.
4. Machado P., Ribeiro F. N., Wroblewski Giublin F. C., Gerzvolf Mieres N., Stumpf Tonin F., Pontarolo R., Marcondes Sari M. H., Edison Luna Lazo R., Mota Ferreira L. Next-Generation Wound Care: A Scoping Review on Probiotic, Prebiotic, Synbiotic, and Postbiotic Cutaneous Formulations. *Pharmaceuticals*. 2025;18(5):704. DOI: 10.3390/ph18050704.
5. Yarnold J., Vozenin Brotons M.-C. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiotherapy and Oncology*. 2010;97(1):149–161. DOI: 10.1016/j.radonc.2010.09.002.
6. Gu Q., Wang D., Cui C., Gao Y., Xia G., Cui X. Effects of radiation on wound healing. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 1998;17(2):117–123.
7. Park S. W., Shin J., Jeong B. K., Byun S., Lee K. S., Choi J. The Effects of Extracorporeal Shock Wave Therapy on Cutaneous Radiation Injury in a Mouse Model. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2025;155(5):813–825. DOI: 10.1097/PRS.00000000000011782.
8. Nie S., Ren C., Liang X., Cai H., Sun H., Liu F., Ji K., Wang Y., Liu Q. Supramolecular Hydrogel-Wrapped Gingival Mesenchymal Stem Cells in Cutaneous Radiation Injury. *Cells*. 2022;11(19):3089. DOI: 10.3390/cells11193089.
9. Sen C. K., Gordillo G. M., Roy S., Kirsner R., Lambert L., Hunt T. K., Gottrup F., Gurtner G. C., Longaker M. T. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*. 2009;17(6):763–771. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x.
10. Boateng J. S., Matthews K. H., Stevens H. N. E., Eccleston G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(8):2892–2923. DOI: 10.1002/jps.21210.
11. Arabpour Z., Abedi F., Salehi M., Baharnoori S. M., Soleimani M., Djalilian A. R. Hydrogel-Based Skin Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(4):1982. DOI: 10.3390/ijms25041982.
12. Qi L., Zhang C., Wang B., Yin J., Yan S. Progress in Hydrogels for Skin Wound Repair. *Macromolecular Bioscience*. 2022;22(7):2100475. DOI: 10.1002/mabi.202100475.
13. Phinney D. G., Pittenger M. F. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. 2017;35(4):851–858. DOI: 10.1002/stem.2575.
14. Zhang B., Wang M., Gong A., Zhang X., Wu X., Zhu Y., Shi H., Wu L., Zhu W., Qian H., Xu W. HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells*. 2015;33(7):2158–2168. DOI: 10.1002/stem.1771.
15. Hu L., Wang J., Zhou X., Xiong Z., Zhao J., Yu R., Huang F., Zhang H., Chen L. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound

- healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Scientific Reports*. 2016;6:32993. DOI: 10.1038/srep32993.
16. Shabbir A., Cox A., Rodriguez-Menocal L., Salgado M., Van Badiavas E. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells and Development*. 2015;24(14):1635–1647. DOI: 10.1089/scd.2014.0316.
 17. Juvkam I. S., Zlygosteva O., Arous D., Galtung H. K., Malinen E., Sølund T. M., Edin N. J. A preclinical model to investigate normal tissue damage following fractionated radiotherapy to the head and neck. *Journal of Radiation Research*. 2023;64(1):44–52. DOI: 10.1093/jrr/rrac066.
 18. Kalluri R., LeBleu V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478):eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977.
 19. Esmaeilzadeh A., Yeganeh P. M., Nazari M., Esmaeilzadeh K. Platelet-Derived Extracellular Vesicles: A New-Generation Nanostructured Tool for Chronic Wound Healing. *Nanomedicine*. 2024;19(10):915–941. DOI: 10.2217/nnm-2023-0344.
 20. Diegelmann R. F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 2004;9(1):283–289. DOI: 10.2741/1184.
 21. Lee J. H., Won Y. J., Kim H., Choi M., Lee E., Ryoou B., Lee S.-G., Cho B. S. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Wound Healing and Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(13):10434. DOI: 10.3390/ijms241310434.
 22. Li Y., Zhu Z., Li S., Xie X., Qin L., Zhang Q., Yang Y., Wang T., Zhang Y. Exosomes: compositions, biogenesis, and mechanisms in diabetic wound healing. *Journal of Nanobiotechnology*. 2024;22(1):398. DOI: 10.1186/s12951-024-02684-1.
 23. Li B., Song S., Zhou Y., Chen X., Zhang Z., Liu X., Zhang R. Biopolymer hydrogels in biomedicine: Bridging chemistry, biology, and clinical translation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025;318:145048. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.145048.
 24. Meng H., Su J., Shen Q., Hu W., Li P., Guo K., Liu X., Ma K., Zhong W., Chen S., Ma L., Hao Y., Chen J., Jiang Y., Li L., Fu X., Zhang C. A Smart MMP-9-responsive Hydrogel Releasing M2 Macrophage-derived Exosomes for Diabetic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*. 2025;14(10):2404966. DOI: 10.1002/adhm.202404966.
 25. Zhou Y., Zhang X.-L., Lu S.-T., Zhang N.-Y., Zhang H.-J., Zhang J., Zhang J. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):407. DOI: 10.1186/s13287-022-02980-3.

ПАМЯТИ КОНСТАНТИНА ЗАХАРОВА



11 июля нас постигла огромная утрата: в результате ДТП погиб один из ведущих специалистов в области клинических исследований, основатель и руководитель исследовательской организации «Экселлена», ученый, филантроп, популяризатор науки, наш коллега и друг **Константин Захаров**. Многогранность этого человека настолько безгранична, что описать все сферы деятельности, в которых был успешен Константин, не так-то просто. Костя умел не только генерировать невероятное количество идей, но и успешно их реализовывал. Результатом этого стала многолетняя успешная деятельность. Являясь выпускником Военно-медицинской академии им. Кирова, **Константин Захаров** много лет успешно трудился в области клинических исследований. Одним из наибо-

лее значимых проектов Константина явилось исследование первой вакцины против коронавируса «Гам-Ковид-Вак», она же «Спутник-V». Богатый опыт в области клинических исследований вакцин стал решающим фактором того, что именно команде «Экселлена» во главе с Константином была доверена эта важнейшая миссия в тяжелый период пандемии. Также одним из важных проектов Константина явились клинические исследования инновационных препаратов. Так, например, успешно проведенное командой «Экселлены» при участии команды Центра Фармацевтической Аналитики исследование новых молекул, синтезированных в Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете, позволило перейти к следующему этапу – второй фазе клинических исследований с участием пациентов.

Широкий кругозор и научные интересы Константина делали яркими и интересными его выступления на любой научной конференции. Константин был постоянным спикером конгрессов «Разработка и регистрация лекарственных средств». На конгрессе в 2025 году Константин был членом жюри первого в рамках конгрессов конкурса молодых ученых «Молодежная лига РРЛС». Также Константин был успешным популяризатором науки, основателем проекта «Stereotax», автором многочисленных научных публикаций. За годы деятельности возглавляемая им компания «Экселлена» стала для Константина по-настоящему второй семьей.

От коллектива Центра Фармацевтической Аналитики и журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» хотим добавить, что Костя был очень искренним, простым и открытым человеком. Встречи с ним, даже минутные, всегда были очень теплыми и душевными. Нам будет очень не хватать Константина, его ярких выступлений, его бесконечных идей и потрясающей жизненной энергии. Светлая память о **Константине Захарове** навсегда останется в наших сердцах.



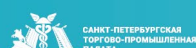
gotoipheb.ru | +7 921 330 6218



Международная выставка и форум по фармацевтике и биотехнологиям

7–9 апреля 2026 | Санкт-Петербург

Поддержка:



АССОЦИАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ
ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЕВРАЗИЙСКОГО
ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОЮЗА

СПХФУ
с 1919 года по созданию
первого и второго поколений



Санкт-Петербургский
государственный химико-
фармацевтический университет

Организатор:



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науке:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки, фармацевтические науки, биологические науки);
- 3.4.1. Промышленная фармацевтика и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал отдает приоритет аспирантским и докторским работам, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.

2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.
Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – <http://www.consort-statement.org>

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате A4 Microsoft Word (*.doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
6. ORCID всех авторов статьи.

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – <http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1>)

Ключевые слова: (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах, и не повторять название статьи.

Вклад авторов. Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: <http://elibrary.ru>

Образец оформления

Mental Health Research Institute
4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производителя и страну происхождения [пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: Синдрол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, страну происхождения [пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете, в прослеживаемом формате, с четкими, разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т. д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: М – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа $M \pm m$, указать объем выборки n. Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т. п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написание рукописи и т. д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по ал-

фавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.

5. В конце описания в круглых скобках указывается (In Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychopharmacogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117 DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008-0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B. Obesity among individuals with serious mental illness. *Acta Psychiatrica Scand*. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/>

Варианты библиографического описания патентов: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/>

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/>

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.citethisforme.com>.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления предоставляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подписью на русском и английском языках. В подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуточные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подписей рисунков на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *.tif, *.jpg, *.cdr, *.ai, с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.

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 ВИНТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Издательские услуги:

Английский перевод статей

- Услуга комплексного перевода.
- Производство англоязычной статьи, включающее верстку и научный перевод.

Специальный выпуск журнала

- При заключении договора сотрудничества возможна публикации специального выпуска журнала.
Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России», был выпущен номером Том 10, № 4 (2021).

Журнал является **Open Access** изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.



Основатель журнала и главный редактор – д. фарм. н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич**

По вопросам сотрудничества просьба обращаться на почту: **info@cpha.ru**

Электронный журнал

Печатный журнал

Информационный ресурс



Фармацевтический журнал

«Разработка и регистрация лекарственных средств»

Наша аудитория:

Среди наших читателей специалисты и руководители отделов разработки ЛС, контроля и обеспечения качества, специалисты по ДКИ, КИ, отделов регистрации, сотрудники аналитических лабораторий, технологи, инженеры, а также топ-менеджмент фармацевтических компаний.

Разделы журнала:

- ➡ Поиск и разработка новых лекарственных средств.
- ➡ Фармацевтическая технология.
- ➡ Методы анализа лекарственных средств.

- ➡ Доклинические и клинические исследования.
- ➡ Регуляторные вопросы.

Аудитория **10 000+**
Нас читают **Россия, СНГ**

Периодичность выхода
журнала **4 раза в год**

Партнер ключевых
мероприятий отрасли

Распространяется
бесплатно

Мы в Telegram



По вопросам сотрудничества
info@pharmjournal.ru
info@chpa.ru