



СИБИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ – ТРАДИЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Международная
научно-практическая конференция

г. Томск,
13-16 сентября 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

**Международная
научно-практическая конференция**

**РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ –
ТРАДИЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

г. Томск, 13–16 сентября 2021 г.

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

Томск
Издательство СибГМУ
2021

УДК 615.0(06)

ББК 52.82

Р 177

Р 177 Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы. Международная научно-практическая конференция (г. Томск, 13-16 сентября 2021 г.): сборник материалов – Томск: Изд-во СибГМУ, 2021. – 257 с.

ISBN 978-5-98591-146-0

Сборник содержит материалы юбилейной международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы», посвященной нескольким важным датам в истории развития ведущей в Сибири школы фармацевтического образования и науки:

- 100 лет со дня рождения выдающегося фармаколога, доктора медицинских наук, профессора Саратикова Альберта Самойловича;
- 100 лет со дня рождения известного ботаника и фармакогноста, доктора биологических наук, профессора Березовской Тамары Павловны;
- 80 лет фармацевтическому факультету;
- 75 лет со дня рождения декана фармацевтического факультета СибГМУ, доктора фармацевтических наук, профессора Дмитрука Степана Евгеньевича, внесшего значительный вклад в развитие фармацевтического образования.

Сборник предназначен для специалистов в области клинических дисциплин, экспериментальной фармакологии, фармации и биомедицины.

Под реакцией д-ра фарм. наук М.В. Белоусова и д-ра мед. наук А.И. Венгеровского.

Редакционная коллегия:

Е.А. Безверхняя

Е.И. Гулина

С.В. Кривошеков

О.Л. Мезенцева

Ю.В. Шабанова

УДК 615.0(06)

ББК 52.82

Текст статей публикуется в авторской редакции. Ответственность за достоверность содержания работ лежит на авторах.

ISBN 978-5-98591-146-0

© Сибирский государственный медицинский университет, 2021

© Макет изд-ва СибГМУ, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА	12
Химическая технология лекарственных средств и технология лекарственных форм	12
ПОЛУЧЕНИЕ ТАБЛЕТОК С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ ЦЕЛЕКОКСИБА А.И. Алходри, С.Н. Суслина	12
ТВЁРДЫЕ ДИСПЕРСИИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ Р. Альрухаие, С.Н. Суслина	14
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С.С. Белокуров	16
КАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ОКСО-ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА А.Р. Григорьева, Е.Н. Колобова, Р. Mäki-Arvela, S.A.C. Carabineiro, D.Yu. Murzin, А.Н. Пестряков	17
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СТАДИИ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ КРИОПРОТЕКТОРА В ДИСПЕРСИЮ ЛИПОСОМ ЦИФЕТРИЛИНА М.В. Дмитриева.....	19
РАЗРАБОТКА ЭМУЛЬСИОННОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ГРАМИЦИДИНА С И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕЕ ВЛИЯНИЯ НА БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДА А.А. Дранников, Ватлин И.С., М.Е. Трусова, А. Ди Мартино, А.М. Гурьев, М.В. Белоусов.....	21
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА В СОСТАВЕ ПРЕССОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ ТАБЛЕТОК К.С. Кацал, Е.Ю. Загорулько	22
РАЗРАБОТКА И ТРАНСФЕР ТЕХНОЛОГИИ ПРЕПАРАТА «ТРИМЕБУТИН ТАБЛЕТКИ 100 МГ, 200 МГ» А.С. Рыболов, В.В. Шейкин, М.С. Коровин, В.С. Чучалин	25
ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ 4,4'-(ПРОПАНДИАМИДО)ДИБЕНЗОАТА НАТРИЯ ИЗ ПЕРОРАЛЬНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ Ю.М. Коцур, Е.В. Флисюк	27
МЕТОД СФЕРИЧЕСКИХ ДИАГРАММ КАК ИНСТРУМЕНТ ОПТИМИЗАЦИИ ФАРМАЦЕВТИКО- ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СУХИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ П.Г. Мизина, А.С. Гуленков, Е.О. Бахрушина, В.М. Аймасова	29
ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ТЕРАПИИ ОСТЕОАРТРОЗА У.В. Ногаева, Ю.М. Коцур, Е.В. Флисюк	31
ДИЗАЙН РАЗРАБОТКИ ФОРМУЛЯЦИИ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ ЦИТИКОЛИНА И МЕМАНТИНА Д.Х. Салахетдинов, Б.Б. Сысуев.....	32
РАЗРАБОТКА МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ С ФУНКЦИЕЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В.В. Шейкин, В.С. Чучалин	34
ОЦЕНКА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ТАБЛЕТОК МЕТОПРОЛОЛА ТАРТРАТА Н.Б. Шестопалова, А.В. Пичугина, Ю.А. Фомина.....	35
Регуляторные вопросы фармацевтической разработки и фармацевтической деятельности	37
ПРИМЕНЕНИЕ АВС-АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ АССОРТИМЕНТА ФЕЛЬДШЕРСКО-АКУШЕРСКИХ ПУНКТОВ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ И.А. Джупарова, А.С. Джупаров, И.А. Харина.....	37
МЕНЕДЖМЕНТ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПОМОЩИ: КОНЦЕПЦИЯ И ИНСТРУМЕНТЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ФАРМАКОТЕРАПИИ Е.В. Каракулова, Л.Ю. Черникова, А.А. Гражданкина	39

О ТЕКУЩИХ СЛОЖНОСТЯХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В СТРАНАХ ЕАЭС И.А. Наркевич	41
АНАЛИЗ РОССИЙСКОГО РЫНКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПАРАЦЕТАМОЛ Н.Б. Шестопалова, А.А. Колоярцева, Ю.А. Фомина	43
Контроль качества лекарственных средств и специализированных продуктов питания.....	46
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В НА НОВЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СЕНСОРАХ В. Богословский	46
РАЗРАБОТКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА Е.Ю. Жеребцова, С.В. Терентьева, Т.Г. Шинко	48
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО МОДИФИКАТОРА – АЦЕТОНИТРИЛА НА РАЗДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЗОННОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА М.М. Жиляков	50
СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ФИТОМАССЕ ЗВЕРОБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО И КУРИЛЬСКОГО ЧАЯ, ВЫРАЩЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ГИДРОПОННОГО МЕТОДА И.В. Кравченко, М.А. Мулюкин, З.А. Самойленко, Т.А. Макарова, Н.М. Гулакова	52
ПОЛУЧЕНИЕ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ СЫРЬЯ <i>RHODIOLA QUADRIFIDA</i> А.В. Лёзина, И.И. Тернинко, М.А. Романова	54
ТВЕРДОФАЗНОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ (ГРОССГЕМИНА И ЦИНАРОПИКРИНА) ИЗ ЭКСТРАКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ВАСИЛЬКА ШЕРОХОВАТОГО (<i>CENTAUREA SCABIOSA L.</i>) В.Э. Мамедова.....	56
ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕТУЛИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ Е. Нурпейис, Г.Б. Слепченко	58
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХИНОЛИЗИДИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ В СЕМЕНАХ ЛЮПИНА ДИКОРАСТУЩЕГО И ТЕРМОПСИСА ЛАНЦЕТНОГО МЕТОДАМИ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ВЭЖХ М.В. Сандрюхина, Т.Г. Никитина	60
ВОЗМОЖНОСТИ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, БАД И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ Г.Б. Слепченко, О.Л. Мезенцева, В.П. Крюковский.....	62
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СУММЫ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В РАЗНЫХ ВИДАХ И СОРТАХ СЫРЬЯ <i>APIUM GRAVEOLENS L.</i> Е.С. Сурбеева, И.И. Тернинко	64
МЕТОДИКА ПРОСТОГО И ЭКСПРЕССНОГО ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В СОСТАВЕ СЛОЖНОЙ ЛИПОФИЛЬНОЙ МАТРИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРЕНОСНО-ЗАРЯДОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ Е.В. Упыренко, Д.А. Кургачев.....	66
ОСОБЕННОСТИ АНАЛИТИЧЕСКОГО И ПРЕПАРАТИВНОГО РАЦЕМИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСЕЙ β_2 -АДРЕНОМИМЕТИКОВ МЕТОДОМ СФХ В.Н. Царев, Н.Г. Базарнова, И.В. Микушина	68
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИС-[3-(3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-4-ГИДРОКСИФЕНИЛ)ПРОПИЛ]СУЛЬФИДА И ДОДЕЦИЛ(3,5-ДИМЕТИЛ-4-ГИДРОКСИБЕНЗИЛ)СУЛЬФИДА Т.Г. Шинко, С.В. Терентьева	70

Системы доставки лекарственных средств для диагностики и терапии	72
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ HER2/NEU В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАРКАСНЫХ БЕЛКОВ МЕЧЕННЫХ ТЕХНЕЦИЕМ-99М О.Д. Брагина, В.И. Чернов, С.М. Деев, В.М.Толмачев	72
NANOCARRIERS FOR TARGETED THERAPY S.M. Deyev	74
ДИАГНОСТИКА ЛИМФОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА ^{99m} Tc-1-ТИО-Д-ГЛЮКОЗА Е.А.Дудникова, В.И.Чернов, А.В.Муравлева, А.А.Медведева, Р.В.Зельчан, О.Д.Брагина, А.Н.Рыбина, В.С.Скуридин, Е.С.Стасюк, В.Е.Гольдберг	75
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА « ^{99m} Tc-1-ТИО-Д-ГЛЮКОЗА» Р.В. Зельчан, В.И. Чернов, А.А. Медведева, О.Д. Брагина, А.Н. Рыбина	77
ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОЙ ТАРГЕТНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ЭКЗОТОКСИНА А PSEUDOMONAS И HER2- СПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА Е.А. Безверхняя, М.С. Ларькина, М.С. Третьякова, Е.В. Плотников, Е.В. Подрезова, Ю.В. Шабанова, А.А. Шульга, Р.В. Зельчан, В.И. Чернов, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов, В.М. Толмачев, С.М. Деев	79
РАЗРАБОТКА НОВЫХ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЦЕНТРЕ ЯДЕРНОЙ МЕДИЦИНЫ ФГБУ ФСНКЦ ФМБА РОССИИ А.В. Озерская, К.В. Белугин	82
THERANOSTICS FOR PROSTATE CANCER: COMBINED TARGETED RADIONUCLIDE IMAGING AND THERAPY А.М. Orlova, А. Abouzaed, F. Lundmark, S.S. Rinne, А.Н. Rybina, А.Г. Vorobyeva, V.M. Tolmachev, V.I. Chernov	84
PHASE I EVALUATION OF ^{99m} Tc-RM2 FOR IMAGING OF GRPR EXPRESSION: INTERMEDIATE RESULTS А.Н. Rybina, V.I. Chernov N.A. Lushnikova, А. V. Doroshenko, Е.А. Usynin, R.V. Zelchan, А. Abouzayed ³ V.M. Tolmachev, А.М. Orlova	86
МЕЧЕННЫЙ ТЕХНЕЦИЕМ-99М МОНОСАХАРИД: РАЗРАБОТКА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО НАБОРА И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА Е.С. Стасюк, В.С. Скуридин, Е.А. Нестеров, А.С. Рогов, В.Л. Садкин, Е.А. Шелихова	88
TUMOR TARGETING USING SCAFFOLD PROTEINS (REVIEW) V.M. Tolmachev, А.М. Orlova, А.Г. Vorobyeva, O.D. Bragina, V.I. Chernov, А. Schulga, S.M. Deyev	89
ВОЗМОЖНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОСТЕОМИЕЛИТА В.Д. Удодов, В.Д. Завадовская, А.Г. Першина, М.А. Зоркальцев, М.С. Ларькина, Е.С. Стасюк, В.В. Иванов, А.С. Рогов, А.Я. Лущик, А.В. Янцевич	90
ТРАНС-1,2-ДИАМИНОЦИКЛОГЕКСАН-N,N,N',N'-ТЕТРАУКСУСНАЯ КИСЛОТА (ДЦТА) КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ХЕЛАТОР ДЛЯ МРТ- И ОФЭКТ -ВИЗУАЛИЗАЦИИ, В ВИДЕ КОМПЛЕКСОВ С MN (ЦИКЛОМАНГ) И ^{99m} Tc (ЦИКЛОТЕХ) В.Ю. Усов, М.Л. Беянин, О.Ю. Бородин, В.Д. Филимонов, А.И. Безлепкин, М.А. Зоркальцев, В.В. Удут, А.А. Чурин, Ю.Б. Лишманов, Н.Л. Шимановский	92
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СТОРОЖЕВЫХ УЗЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОКОЛЛОИДНОГО ПРЕПАРАТА ^{99m} Tc-АЛОТЕХ В.И.Чернов, А.А.Медведева, Р.В.Зельчан, О.Д.Брагина, А.Н.Рыбина ¹ В.С.Скуридин, Е.С.Стасюк, А.В.Гольдберг , Е.Ю.Гарбуков	94
ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ – ИСТОЧНИК НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ	96
Высокомолекулярные и супрамолекулярные природные соединения	96
КОРРЕКЦИЯ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ ГИДРОКСОКОМПЛЕКСАМИ Fe(III), СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ГУМИНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ, НА МОДЕЛИ ОСТРОЙ ПОСТГЕМОРАГИЧЕСКОЙ АНЕМИИ	

Ю.Р. Белым, К.А. Братишко, В.В. Иванов, Е.Е. Буйко, А.А. Уфандеев, М.В. Зыкова, А.М. Жиркова, И.В.Перминова.....	96
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ТОРФА К.А. Братишко, М.В. Зыкова, В.В. Иванов, М.В. Белоусов	98
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРООКСИДАНТНОЙ И АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БИОНАНОМАТЕРИАЛОВ И КОМПОЗИЦИЙ С АНТИМИКРОБНЫМИ И РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК <i>IN VITRO</i> В ПРИСУТСТВИИ ПРООКСИДАНТОВ Е.Е. Буйко, К.А. Братишко, А.А. Уфандеев, В.В. Иванов, М.В. Зыкова, М.В. Белоусов, И.В. Перминова	100
ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ УГЛЯ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА НА БАЛАНС АРГИНИНА В АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ МЫШЕЙ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ М.Г. Данилец, Е.С. Трофимова, М.В. Зыкова, Е.Ю. Шерстобоев, А.А. Лигачева, А.В. Цупко, Д.А. Михалев ² М.В. Белоусов	102
КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА (III) С ГУМИНОВЫМИ И ПОЛИСАХАРИДНЫМИ МАКРОЛИГАНДАМИ ДЛЯ БОРЬБЫ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ А.М. Жиркова, А.Б. Воликов, Д.С. Волков, Е.Е. Буйко, М.В. Зыкова, И.В. Перминова	104
ХИМИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В СОСТАВЕ ПИЩЕВЫХ ГУМИНОВЫХ ПРОДУКТОВ КОМПАНИИ ООО «НОВОЛЭНД» М.В. Зыкова, В.В. Иванов, К.А. Братишко, Е.Е. Буйко Л.А. Логвинов, М.Г. Данилец А.А. Уфандеев, А.В. Цупко, Д.А. Михалёв, А.П. Зима, А.С. Горбунов, Е.С. Трофимова, А.А. Лигачева, Т.В. Ласукова, И.А. Передерина, Е.С. Рабцевич, М.В. Белоусов.....	105
КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НИЗИННОГО ДРЕВЕСНО- ТРАВЯНОГО ВИДАТОРФА Л.А. Логвинова, М.В. Зыкова, Т.В. Ласукова, А.А. Госюхина, Т.А. Замощина, М.В. Белоусов.....	108
ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ БИОНАНОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК Д.А. Михалёв, М.В. Зыкова, Е.Е. Буйко, В.В. Иванов, К.А. Братишко, А.В. Цупко, И.В. Перминова, М.В.Белоусов.....	111
РАЗРАБОТКА НАПИТКА БЕЗАЛКОГОЛЬНОГО НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ И ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ А.В. Цупко, М.В. Зыкова, Л.А. Логвинова, Д.А. Михалёв, М.В.Белоусов.....	113
Вторичные метаболиты растений – перспективные лекарственные кандидаты.....	115
КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЦИКЛОСИВЕРСИОЗИДА F ИЗ РАСТЕНИЯ <i>ASTRAGALUS</i> <i>PTEROCERPHALUS</i> МЕТОДОМ HPLC-ELSD М.А. Агзамова, Fatih Goger, А.А. Жанибеков, Gulmira Ozek	115
СЕМЕНА (ПЛОДЫ) ЛОПУХА БОЛЬШОГО – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР) А.К.Х. Али, Р.С. Боев, Н.Э. Коломиец.....	117
ВЛИЯНИЕ 8-С-,4'-О-ДИГЛЮКОЗИДА АПИГЕНИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ А.М. Богоутдинова, М.Ю. Гончаров, С.П. Гамбарян	119
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 5,8-ДИГИДРОКСИФЛАВОНОВ ИЗ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ <i>SCUTELLARIA COMOSA</i> А.М. Каримов, Ю.В. Остроушко, М.А.Мулюкин, М.А. Маматханова, Ш.А.Эргашева, О.К. Аскарлова, Э.Х. Ботиров.....	121
НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПОБЕГОВ БОЯРЫШНИКА В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ Н.А. Волкова, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева, И.Х. Шайхутдино	123
ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КОЛЮРИИ ГРАВИЛАТОВИДНОЙ (<i>COLURIA GEOIDES</i> (PALL.) LEDEV.), <i>ROSACEAE</i>) – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИММУНОКОРРЕКТОРЫ С.В. Дутова, М.А. Лебедева.....	124

ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОИДОВ КОРЫ ОРЕХА ЧЕРНОГО (<i>JUGLANS NIGRA</i> L.) Н.И. Зименкина, В.А. Куркин	127
ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНЫХ ЭКСТРАКТОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР РОДОПHYLLUM RELTATUM, В ОТНОШЕНИИ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА М.П. Китаева, Т.А. Федотчева, А.В. Семейкин.....	129
СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ <i>URTICA DIOICA</i> L. В УСЛОВИЯХ СРЕДНЕЙ ТАЙГИ И.В. Кравченко, Л.Ф. Шепелева	131
МЕСТО И РОЛЬ ФАРМАКОГНОЗИИ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ В.А. Куркин	133
АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В.А. Куркин	135
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ <i>ECHINOCYSTIS LOBATA</i> TORR. & A.GRAY МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ Г.Р. Кутателадзе	137
СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА K ₁ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ Ю.Н. Логинова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин	139
АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРАВЫ <i>MELILOTUS OFFICINALIS</i> С.И. Михайлова, В.Ю. Андреева, Е.А. Трофимович	141
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ЭКСТРАЦИИ АРАЛОЗИДОВ ИЗ КОРНЕЙ АРАЛИИ МАНЬЧЖУРСКОЙ И.Ю. Михайловская, Е.В. Флисюк, А.Н. Шиков	142
ТЕРПЕНОИДЫ И ФЛАВОНОИДЫ <i>ARTEMISIA JUNCEA</i> – ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ Б.С. Охундедаев, Р.Ф. Мухаматханова ¹ И.Д.Шамьянов, С.Ф. Арипова, Н.А. Aisa, Ш.Ш. Сагдуллаев.....	144
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЦВЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ (<i>TAGETES PATULA</i> L.) А.Е. Савельева, В.А. Куркин, А.В. Куркина.....	146
РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТА ЛАПЧАТКИ ГУСИНОЙ Е.Е. Савельева, Н.А. Булгакова, Е.З. Лапкина, О.Ф. Веселова, К.Г. Алешенцев.....	149
КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭКСТРАКТЕ ТРАВЫ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО О.Л. Сайбель, А.И. Радимич, Т.Д. Даргаева.....	150
ИССЛЕДОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПЛОДАХ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО Н.С. Соколов, К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова	151
ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА, ПРИМЕНЯЕМОГО ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ П.К. Турдалиева, А.А. Ибрагимов, Ф.Х. Расулов	152
ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ НЕКОТОРЫХ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ ЯКУТИИ Л.К. Федорова ¹ Н.К. Чирикова	154
ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЕ ВЕЩЕСТВ – АНТИОКСИДАНТОВ В ТРАВЕ ГОРЦА ПЕРЕЧНОГО И ГОРЦА МАЛОГО А.С. Чистякова, А.С. Болгов, А.А. Гудкова	156
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТОЦИАНОВ В ЦВЕТКАХ ФАЦЕЛИИ ПИЖМОЛИСТНОЙ (<i>RHASCALIA TANACETIFOLIA</i> BENTH.) П.А. Шейхмагомедова.....	158

ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫЕ ПИРАНОКУМАРИНЫ: ОТ ВЫДЕЛЕНИЯ ДО ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	
Э.Э. Шульц, Ж. Ганбаатар, В.В. Тараскин, Б.М. Урбагарова, Л.Д. Раднаева	160
FRAXINELLONE FROM <i>SILENE CLAVIFORMIS</i>	
U.Yu. Yusupova, R. Okmanov	160
Рациональное природопользование	162
ФИТОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ	
Е.В. Вихарева, А.А. Селянинов, Е.А. Тюмина	162
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БИОСТИМУЛЯТОРОВ НА АГРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ <i>CALENDULA OFFICINALIS L.</i>	
А.Л. Ковалева, Н.С. Зиннер ¹	164
ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ <i>HEDYSARUM ALPINUM</i>	
Д.Г. Курашев, Н.С. Зиннер, А.Л. Ковалева	166
ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ШАЛФЕЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО (<i>SALVIA OFFICINALIS L.</i>) И ЕЁ ХАРАКТЕРИСТИКА	
Н.С. Пивоварова, Т.С. Шебитченко	168
ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПОЧЕК ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (<i>QUERCUS ROBUR L.</i>)	
Н.А. Рябов, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, Л.В. Тарасенко, Т.М. Жавкина	170
СЫРЬЕВЫЕ ЗАПАСЫ ТРАВЫ ПОЛЫНИ ЗЕЛЕННОЙ (<i>ARTEMISIA VIRIDIS WILLD.</i>) В НЕКОТОРЫХ ОБЛАСТЯХ КЫРГЫЗСТАНА	
Ч.Т. Табылдиева, К.С. Чолпонбаев, Н.А. Рогова, К.Т. Шалпыков	173
ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА ПОСЕВНЫЕ КАЧЕСТВА СЕМЯН <i>RHODIOLA ROSEA L.</i>	
А.В. Щукина, Н.С. Зиннер	174
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ	177
Фундаментальные и прикладные аспекты исследований фармакодинамики и фармакокинетики новых лекарственных кандидатов	177
НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ И ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДИБОРНОЛА-ГЭК У КРЫС ПОСЛЕ ТОТАЛЬНОЙ ТРАНЗИТОРНОЙ ИШЕМИИ	
А.М. Анищенко, Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова, О.И. Алиев, А.В. Сидехменова, М.Б. Плотников, А.В. Кучин, И.Ю. Чукичева	177
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ И ТЕРАТОГЕННОСТИ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО (<i>CICHORIUM INTYBUS L.</i>) ТРАВЫ ЭКСТРАКТА СУХОГО	
А.Н. Бабенко, Л.В. Крепкова, М.В. Боровкова	179
ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ СУБТИЛИЗИНОВ НА ВАЗОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ ВОРОТНОЙ ВЕНЫ КРЫСЫ	
Г.И. Байкалов, К.И. Ершов, Р.А. Князев, К.И. Бахарева, П.Г. Мадонов	181
АНТИГИПЕРТЕНЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО СТИМУЛЯТОРА РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ	
В.В. Быков	182
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ СЛОЖНОЭФИРНОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОМЕТАЦИНА ПРИ АДЪЮВАНТНОМ АРТРИТЕ	
А.В. Быкова, В.В. Быков	184
ПОИСК СРЕДСТВ ОБЛАДАЮЩИХ АНТИГИПЕРТЕНЗИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ СРЕДИ СОЕДИНЕНИЙ ИНДОЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ	
О.И. Дунаева, О.И. Алиев, М.Б. Плотников	186
4,10-ДИ(ЭТОКСИАЦЕТИЛ)-2,6,8,12-ТЕТРААЦЕТИЛ-2,4,6,8,10,12-ГЕКСААЗАТЕТРАЦИКЛО [5,5,0,0 ^{3,11} ,0 ^{5,9}] ДОДЕКАН КАК НОВОЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО	
Е.А. Киселева, Л.А. Бахолдина	187
ПРОИЗВОДНЫЕ ГЕКСААЗАИЗОВЮРЦИТАНА В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ	

С.Г. Крылова, Т.Н. Поветьева, К.А. Лопатина, Ю.В. Нестерова, О.Г. Афанасьева, Е.П. Зуева, Е.Н. Амосова, Т.Г. Разина, О.Ю. Рыбалкина, П.В. Кульпин, Е.А. Киселева, Н.И. Суслов, С.В. Сысолятин, Р. Терье, А.Б. Ворожцов	190
АРНИКА – ПЕРСПЕКТИВНОЕ РАСТЕНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С.В. Лемясева, Л.В. Крепкова, А.Н. Бабенко, О.С. Кузина	192
ФАРМАКОКИНЕТИКА И МЕТАБОЛИЗМ ИННОВАЦИОННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА – АНТИАГРЕГАНТА К.А. Леонов, Д.А. Вишенкова, В.В. Быков, В.И. Павловский	194
ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ¹ H ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПЛЕКТНОСТИ К ТЕРАПИИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ Е.М. Моисеева, В.В. Рафальский, Г.С. Куприянова, И.Г. Мершиев, А.Ю. Зюбин	196
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА ИНДУЦИРУЕМОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА В.С. Мотов	198
ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЛЕЙ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА ПРИ ОСТРОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ С ГИПЕРКАПНИЕЙ Г.А. Плиско	200
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ SGLT-2 ИНГИБИТОРА НА ХРОНИЧЕСКУЮ СЕРДЕЧНУЮ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ, ИНДУЦИРОВАННУЮ ВВЕДЕНИЕМ ДОКСОРУБИЦИНА Е.Д. Семивеличенко	201
ВЛИЯНИЕ ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ А.В. Сидехменова, О.И. Алиев, А.М. Анищенко, А.Ю. Шаманаев, М.Б. Плотников	202
ВОЗМОЖНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ МЕКСИДОЛА В КОРРЕКТИРОВАНИИ ПАРАМЕТРОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛЬЮ НА ФОНЕ ХИМИОТЕРАПИИ ЛИПОСОМАЛЬНЫМИ ЦИТОСТАТИКАМИ А.В. Сипров, М.А. Соловьева	204
АНТИОКСИДАНТНЫЕ И РЕПАРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ НОВОГО АНАЛОГА ТИМОГЕНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТРАВМЫ КОЖИ М.Ю. Смахтин, Г.С. Маль, А.М. Смахтина	206
Онкофармакология и химиопрофилактика рака	208
ИММУНОТЕРАПИЯ В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ ОПЕРАБЕЛЬНОГО РАКА ЖЕЛУДКА: ОПЫТ РАБОТЫ УЧРЕЖДЕНИЯ А.В. Августинович, С.Г. Афанасьев, Л.В. Спирина	208
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ МУЖСКОЙ ВОСПРОИЗВОДЯЩЕЙ ФУНКЦИИ, ВЫЗВАННЫХ ЦИТОСТАТИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ В.А. Григорьева, Т.Г. Боровская	208
ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ: СВЯЗЬ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков	210
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ КОСТНОГО МОЗГА И СИСТЕМУ КРОВИ О.В. Неупокоева, Е.П. Федорова, М.В. Филонова, О.Л. Воронова, А.А. Чурин	211
КОРРЕКЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА ЭРИТРОПОЭЗ ЖИВОТНЫХ С КАРЦИНОМОЙ ЛЁГКИХ ЛЬЮИС С ПОМОЩЬЮ АНТОЦИАНСОДЕРЖАЩЕГО КОМПЛЕКСА ИЗ <i>SORBUS AUCUPARIA L.</i> О.Ю. Рыбалкина, Е.Ф. Федорова, А.В. Чайковский, Т.Г. Разина, Г.И. Калинкина, Н.В. Исайкина ² , В.В. Жданов	213

ИССЛЕДОВАНИЯ РАДИОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ СОЛЕЙ ЛИТИЯ НА МОДЕЛИ ОПУХОЛЕВОЙ КУЛЬТУРЫ М.С. Третьякова, М.Н. Аникин, Е.В. Плотников	215
Иммунофармакология и молекулярная иммунология	216
ВЛИЯНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ИЗ СЫРЬЯ <i>COLURIA GEOIDES</i> (ROSACEAE) НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ГРАНУЛОЦИТАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ С.В. Дутова, М.Р. Карпова, Ю.В. Саранчина	216
ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ЭКСТРАКЦИИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ РАСТЕНИЙ РОДА <i>SAUSSUREA</i> НА АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗЫ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ А.А. Лигачёва, Е.И. Гулина Ю.В. Шабанова, Е.С. Трофимова, С.В. Кривошеков, Н.В. Гуркин, Е.Ю. Шерстобоев, М.Г. Данилец, М.В. Белоусов	219
ЭКСПРЕССИЯ PD-1, PD-L1, PD-L2 В ТКАНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ Л.В. Спирина, А.В. Августинovich, З.А. Юрмазов, С.Г. Афанасьев, Е.А. Усынин, И.В. Кондакова	221
УЧАСТИЕ КАСКАДА ИКК-2/NF-КВ В АКТИВАЦИИ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ГУМИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ ТОРФА Е.С. Трофимова, М.В. Зыкова, А.А. Лигачева, М.Г. Данилец, Е.Ю. Шерстобоев, А.В. Цупко, Д.А. Михалев, М.В. Белоусов	222
Нейробиология и психофармакология	Ошибка! Закладка не определена.
ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ЛИХНИСА ХАЛЬЦЕДОНСКОГО НА ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ЭМОЦИОНАЛЬНУЮ РЕАКЦИЮ ЖИВОТНЫХ О.Г. Афанасьева, Т.Н. Поветьева, Н.И. Суслов, Ю.В. Нестерова, П.В. Кульпин, Л.Н. Зибарева, С.Г. Крылова, Е.П. Зуева	225
РОЛЬ ПРОЛОНГИРОВАННЫХ ФОРМ АНТИПСИХОТИКОВ В РАЗВИТИИ АКАТИЗИИ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ А.А. Гончарова, Е.Г. Корнетова	227
СВЯЗЬ УРОВНЯ КАТЕХОЛ-О-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ (СОМТ) С БЕЗНАДЕЖНОСТЬЮ И СУИЦИДАЛЬНЫМ РИСКОМ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ, ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИПСИХОТИЧЕСКУЮ ТЕРАПИЮ И.А. Меднова, Л.А. Левчук, Е.Г. Корнетова, В.И. Герасимова, А.Н. Корнетов, С.А. Иванова	229
РОЛЬ CD147 И RAGE В РАЗВИТИИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ АМИЛОИДНОЙ АНГИОПАТИИ <i>IN VITRO</i> А.И. Мосягина, Е.Б. Бойцова, Е.Д. Хилажева, Е.А. Тепляшина, А.В. Моргун, А.Б. Салмина	231
ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ДИТЕРПЕНОВОГО АЛКАЛОИДА ЗОНГОРИНА Ю.В. Нестерова, Т.Н. Поветьева, Н.И. Суслов, Г.Н. Зюзьков	233
СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К УПРАВЛЕНИЮ НЕЙРОГЕНЕЗОМ А.Б. Салмина, Ю.К. Комлева, О.Л. Лопатина, Ю.А. Панина, Н.А. Малиновская	235
УРОВНИ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ, ПОЛУЧАЮЩИХ КОНВЕНЦИОНАЛЬНЫЕ И АТИПИЧНЫЕ АНТИПСИХОТИКИ В.В. Тигунцев, И.А. Меднова, О.А. Лобачёва, Е.Г. Корнетова, С.А. Иванова	236
ВЛИЯНИЕ КОФЕИНА НА КРАТКОВРЕМЕННУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА ПРИ СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ АТАКСИИ I ТИПА А.Н. Шуваев, О.С. Белозор, Я.В. Фрицлер, А.Н. Шуваев	238
Регенеративная медицина и клеточные технологии	240
CALCIUM PHOSPHATE COATINGS TO IMPROVE BIOCOMPATIBILITY OF POLYETHERETHERKETONE WITH BONE TISSUE I.O. Akimchenko, G.E. Dubinenko, S.I. Tverdokhlebov	240
ГИБРИДНЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ ПОКРЫТИЯ ОСТЕОСТИМУЛИРУЮЩИХ ИМПЛАНТАТОВ ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ К.Н. Верзунова, А.И. Козельская, С.И. Горенинский, Е.А. Солдатова, С.И. Твердохлебов	242
ОСОБЕННОСТИ СКРИНИНГА ДОНОРОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА М.А. Водякова, Е.В. Мельникова	244

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ НА КРЕМНИЙ-УГЛЕРОДНЫЕ ПОКРЫТИЯ А.С. Гренадёр, А.А. Соловьёв, В.В. Малашенко, Л.С. Литвинова, О.Г. Хазиахматова, Н.Д. Газатова, И.А. Хлусов	246
СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРА ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ С ТОНКИМ АЗОСОДЕРЖАЩИМ ТИТАНОВЫМ ПОКРЫТИЕМ П.В. Марьин, С.И. Твердохлебов	248
ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КОМПОЗИЦИОННЫХ ПОКРЫТИЙ С ФУНКЦИЕЙ ДЕПО ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ Г.М. Медетова, А.А. Волохова	250
РОЛЬ ГЕПАРИНА В РЕГУЛЯЦИИ ОСТЕОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ММСК IN VITRO И.К. Норкин, К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, Е.С. Мелашенко, В.В. Малашенко, Е.О. Шунькин, И.А. Хлусов, Л.С. Литвинова	252
СВОЙСТВА КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ ПОКРЫТИЙ, СФОРМИРОВАННЫХ МЕТОДОМ РЕАКТИВНОГО ВЧМР В АЗОСОДЕРЖАЩИХ ГАЗОВЫХ СМЕСЯХ А.Ю. Федоткин, П.В. Марьин.....	254

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА

Химическая технология лекарственных средств и технология лекарственных форм

ПОЛУЧЕНИЕ ТАБЛЕТОК С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ ЦЕЛЕКОКСИБА

А.И. Алходри^{1,2*}, С.Н. Суслина¹

¹ *Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия*

² *LEM pharma, Медицинская компания, г. Хама, Сирия*

e-mail: Ahmedalkhodri@gmail.com

Ключевые слова: НПВС, целекоксиб, пролонгированное действие, артрит.

Введение. По данным ВОЗ за 2021 год, 1,71 миллиарда человек во всем мире страдают заболеваниями опорно-двигательного аппарата. Среди которых, наиболее распространенными являются ревматоидный артрит, остеоартрит (Cieza A. et al., 2019; WHO, 2021). Согласно статистике центров по контролю и профилактике заболеваний в США, в настоящее время около 63 миллиона человек страдают от ревматоидного артрита, и ожидается, что это число достигнет 78 миллионов в 2040 году (Hootman J.M. et al., 2016). Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) - самая важная группа в лечении этих заболеваний. Они разделены на восемь групп: салицилаты - 11 соединений (Аспирин), производные пропионовой кислоты - 16 соединений (Ибупрофен), производные уксусной кислоты - 12 соединений (Диклофенак), производные еноловой кислоты - 8 соединений (Пироксикам), производные антралиновой кислоты - 4 соединения (Мефенамовая кислота), производные пиразолидина - 10 соединений (Фенилбутазон), Сульфанилиды (Нимесулид) и последнего поколения- коксибы - 7 соединений (Целекоксиб). Целекоксиб - самый безопасный из своей группы. Он ингибирует только циклооксигеназу 2 (ЦОГ₂), что не приводит к развитию эрозивно-язвенного процесса в пищеварительном тракте, но может вызвать инфаркт миокарда и отрицательно влияет на свертываемость крови (Tive L., 2020). Для снижения побочных эффектов целесообразно уменьшение дозы, а также кратности приема препарата, при использовании лекарственных форм пролонгированного высвобождения, что также улучшит соблюдение пациентом режима лечения и снизит затраты на лечение.

Цель. Разработка состава таблеток целекоксиба пролонгированного высвобождения для лечения артрита и острой боли.

Материалы и методы. Действующее вещество - целекоксиб и вспомогательные вещества закуплены у ведущих мировых компани (табл. 1). Таблетки получали с предварительной влажной грануляцией с использованием изопропилового спирта (99%) в качестве увлажнителя. Процесс грануляции проводили вручную через 600 μ m размера сита. Сушку гранул осуществляли в течение 30 минут при 55 °C в сушильном шкафе JSON-050 (JSR, Корея). Прессование таблеток проводили с помощью однопуансонного пресса (Erweka AR402, 14mm, Германия). Высвобождение целекоксиба (in vitro) из таблеток оценивали в приборе с лопастной мешалкой (Apparatus 2, Paddle Apparatus, Erweka DT 128 Light, Германия) при 50 об / мин в 900 мл Фосфатного буфера (pH= 7.4) с 1% SLS при температуре 37 \pm 0,5C. Определение технологических характеристик экспериментальных образцов таблеток целекоксиба проведено с использованием фармакопейных методов и устройств в соответствии с ГФ 14. однородность массы таблеток - весы sartorius TE1502S (Sartorius, Япония), прочность на раздавливание- прибор ТВН 125 GmbH (Erweka, Германия), прочность на истирание TAR 220 (Erweka, Германия). Количественное определение целекоксиба и однородность его дозирования проводили с использованием спектрофотометрического метода UV1800 [2UV/33] (Shimadzu, Япония).

Результаты. Определены технологические характеристики 6 экспериментальных составов таблеток целекоксиба, представленные таблице 2. На рисунке 1 представлены результаты кинетики высвобождения всех составов в течение указанного времени в щелочной среде.

Заключение. Впервые с использованием различных полимеров предложены составы таблеток целекоксиба с пролонгированным высвобождением. Составы 1, 2, 3, 5 обеспечивали высвобождение целекоксиба до 16 часов, состав 4 - в течение 12 часов. Состав 6 обеспечивает высвобождение около половины своего содержимого активного ингредиента в течение 20 часов, поэтому высвобождение длится больше суток. Таким образом, ГПМЦ и ЭЦ могут быть использованы в качестве основного агента, регулирующего скорость высвобождения плохо растворимого лекарственного вещества целекоксиба (Wise D.L., 2000; Tiwari S.B. et al., 2003).

Таблица 1. Субстанции, используемые в работе

Материал / CAS	Компания	Страна
Целекоксиб / 169590-42-5	Chemfine chemicals	Индия
ГПМЦ-К100М / 9004-65-3	SUNHERE	Китай
ГПЦ- high / 9004-64-2	Nippon Soda	Япония
ЭЦ-10cps / 9004-57-3	chemist group	Перу
КМЦ / 9004-32-4	Vega	Китай
Карбопол 940 / 9003-01-4	Medulla	Испания
Авицил PH102 / 9004-34-6	MINGTAI	Тайвань
Поливинилпиролон-К30 / 9003-39-8	Farmasino	Китай
Лаурилсульфат натрия / 151-21-3	BASF	Сирия
лактоза моногидрат / 10039-26-6	DFE pharma	Германия
Стеарат магния / 557-04-0	GREVEN	Малайзия
Изопропиловый спирт / 67-63-0	Merck	Германия

Таблица 2. Технологические характеристики модельных состав таблеток целекоксиба пролонгированного действия

Технологические характеристики	Модельные составы таблеток целекоксиба					
	1	2	3	4	5	6
Марка полимера	ГПМЦ-к100м	ГПМЦ-к100м и ЭЦ	ГПМЦ-к100м и КМЦ	Карбопол 940	ЭЦ-10 cps	ГПЦ- high
Время высвобождения, ч	20	20	20	12	16	20
Высвобождение целекоксиба, %	Более 90	81,47	86,56	92,28	90,38	53,56
Средняя масса, мг	596,65 ± 10,99	605 ± 6,79	607,8 ± 7,61	604,7 ± 12,34	603 ± 16,30	606,3 ± 20,89
Прочность на раздавливание, кг/см ²	11,02±0,62	8,89 ± 0,57	9,93±0,64	11,61±0,34	9,79±0,41	9,44±1,85
Истираемость, %	Менее 1,0					
Содержание целекоксиба, %	100,422	100,076	101,205	101,561	103,61	102,93

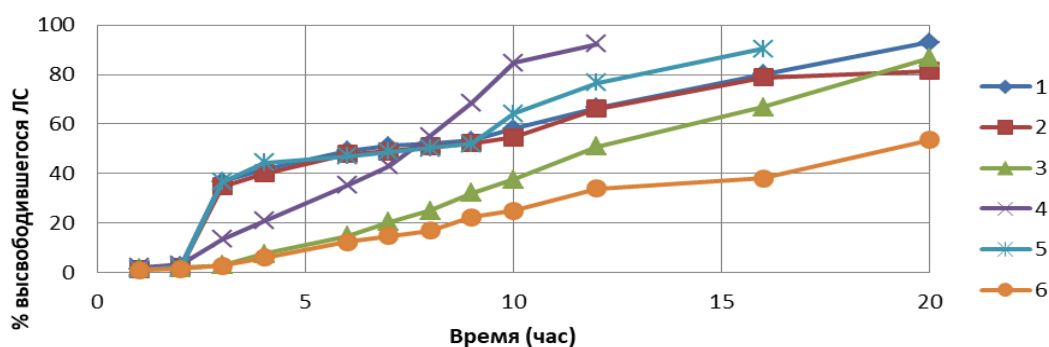


Рис. 1. Кинетика высвобождения целекоксиба из модельных составов (среда - фосфатный буферный раствор с pH 7,4)

Литература

1. Государственная фармакопея российской федерации (ГФ 14), XIV издание, Москва 2018.
2. Cieza A., Causey K., Kamenov K., Hanson S.W., Chatterji S., Vos T. Global estimates of the need for rehabilitation based on the Global Burden of Disease study 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2020;396(10267):2006-2017.
3. Hootman J.M., Helmick C.G., Barbour K.E., Theis K.A., Boring M.A. Updated projected prevalence of self-reported doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation among US adults,

- 2015-2040. *Arthritis & Rheumatol.* 2016;68(7):1582-1587. DOI: 10.1002/art.39692. PubMed PMID: 27015600.
4. Tive L. Celecoxib clinical profile. *Rheumatology.* 2020;39(2):21-28.
 5. Tiwari S.B., Murthy T.K., Raveendra Pai M. Controlled release formulation of tramadol hydrochloride using hydrophilic and hydrophobic matrix system. *AAPS PharmSciTech.* 2003;4:18–23. DOI: 10.1208/pt040331.
 6. Wise D.L. Handbook of pharmaceutical controlled release technology. UK: CRC press. 2000. 902 P. ISBN 9780824703691
 7. World health organization (WHO). Musculoskeletal conditions. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions> (дата обращения – 08.02.2021).

ТВЁРДЫЕ ДИСПЕРСИИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ

Р. Альрухаие*, С.Н. Суслина

Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

email: 1042205169@rudn.ru

Ключевые слова: твёрдые дисперсии, пролонгированное высвобождение, полимеры.

Введение. лекарственные формы с пролонгированным высвобождением направлены на улучшение соблюдения пациентом режима дозирования лекарств за счет уменьшения кратности приема. Они помогают пациентам снизить общую дозу, обеспечить равномерную и продолжительную концентрацию действующего вещества в системном кровотоке и минимизируют побочные эффекты (Darandale A. et al., 2017). В фармацевтической практике было предложено много различных лекарственных форм (ЛФ) с пролонгированным высвобождением, в том числе и использованием твердых дисперсий (ТД).

Цель. Целью данной работы является представление краткого обзора о твердых дисперсиях и перспективе их использования при пролонгированном высвобождении.

Материалы и методы. Изучены данные литературы по твердым дисперсиям, принципам получения, вспомогательным веществам, целям их использования и т.д.

Результаты. Определение твердых дисперсий несколько раз менялось, однако их можно определить, как системы, в которых лекарственное вещество (ЛВ) диспергировано на молекулярном уровне в биологически инертной матрице или носителе, который может быть сахаром, системой на основе воска и, чаще, полимером. Основная цель получения ТД - улучшить растворимость и, следовательно, биодоступность ЛВ (Dharna A. et al., 2013). ТД можно классифицировать в соответствии с типом носителя или корреляцией со стабильностью и растворимостью, методами получения и показателям качества. По типу носителя ТД выделяют четыре поколения. ТД первого поколения представляли собой ЛВ и носитель, которые находились в кристаллическом состоянии (Modica de Mohac L. et al., 2019). В ТД второго поколения ЛВ молекулярно диспергировано в инертной полимерной матрице, которая в целом является полимерной. В ТД третьего поколения, носители могут быть сополимерной системой или смесью поверхностно-активных веществ (ПАВ) и полимеров, что улучшает профиль высвобождения ЛВ благодаря поверхностной активности носителя или способности к самоэмульгированию, что свою очередь, может уменьшить перекристаллизацию ЛВ и улучшить стабильность ТД (Nguyen N.S.M. et al., 2020). Наконец, носители, обладающие солюбилизующими и поверхностно-активными свойствами, составляют четвертое поколение ТД (Uchiyama H. et al., 2019). Согласно классификации ТД основанной на корреляции их стабильности и растворимости, методов получения и показателей качества, различают шесть классов: С-С, С-А, А-С, А-А, М-С, М-А. Класс С-С и класс С-А, где ЛВ присутствует в кристаллическом состоянии, а носитель является кристаллическим или аморфным соответственно. таким образом, эти два класса считаются стабильными, но менее растворимыми. В классах А-С и А-А аморфное лекарство диспергировано в кристаллическом или аморфном носителе, что увеличивает растворимость лекарства. Когда лекарство молекулярно диспергировано в кристаллическом или аморфном носителе, мы получаем класс М-С и класс М-А, которые обладают улучшенными характеристиками растворения лекарственного средства с большой физической стабильностью (Taran K.G. et al., 2012). Совсем недавно ТД были приготовлены для пролонгирования высвобождения с использованием нерастворимых материалов-носителей. В этих дисперсиях предлагают различные потенциальные преимущества для биодоступности лекарства и длительного его действия. Таким образом, мы получаем преимущества как твердых дисперсий, так и систем доставки с замедленным высвобождением, с больших возможностей избегания риска взрывного высвобождения (Patil S.A. et al., 2010). ТД можно сразу получить с использованием полимеров для замедленного высвобождения, или эти полимеры могут быть добавлены к ТД, которые обычно получают с использованием полимеров, улучшающих растворимость без продления высвобождения. Например, ТД дисульфирама –препарат от алкоголизма, с использованием Kolliphor1 P 188 и P 237 и таблетки с Kollidon1 SR и НРМС, специально разработаны для обеспечения замедленного высвобождения (Shergilla M. et al., 2016).

Носители, используемые в твердых дисперсиях с пролонгированным высвобождением: Нерастворимые в воде носители, обычно используются для получения ТД пролонгированного высвобождения, принимая во

внимание, что свойства носителей существенно влияют на профиль высвобождения диспергированного лекарственного средства (ЛС). Используемые полимеры включают следующее (Moorthy S. et al., 2011; Kaushik R. et al., 2020; Nair A.R. et al., 2020):

Этилцеллюлоза (ЕС): это гидрофобный полимер, используемый в твердой дисперсии для водорастворимых лекарств или умеренно растворимых в воде лекарств. Могут использоваться различные концентрации ЕС, что напрямую влияет на скорость высвобождения лекарственного средства. Например, ЕС использовали для приготовления ТД с замедленным высвобождением дименгидрината в соотношении от 1:1 до 1:5 (лекарственное средство:ЕС). Исследование высвобождения *in vitro* также показало, что для ТД требуется меньшее количество полимера, чем для влажной грануляции для получения аналогичных профилей высвобождения. **Гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ):** имеются в различных классах вязкости с молекулярной массой находится в диапазоне от 46000 до 12,46000. Гранулы ТД с замедленным высвобождением оксепренолола гидрохлорида были получены с использованием ЕС и четырех видов ГПЦ, имеющих разные молекулярные массы. Скорость высвобождения оксепренолола гидрохлорида снижается с увеличением количества ГПЦ и становится почти равной постоянной при соотношении состава 3% и более. Также были приготовлены ТД флурбипрофена и ГПЦ. Было замечено, что флурбипрофен образует водородную связь с ГПЦ в ТД в процентном отношении, увеличивающемся с уменьшением молекулярной массы ГПЦ или с увеличением количества ГПЦ, и была продемонстрирована линейная зависимость между скоростью высвобождения флурбипрофена и процентов его водородной связи в приготовленных ТД. **Гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ):** представляет собой смешанный эфир алкилгидроалкилцеллюлозы, содержащий метокси- и гидроксипропильные группы, и в зависимости от степени замещения метокси- и гидроксипропокси различают четыре различных типа ГПМЦ. ТД верапамила гидрохлорида с замедленным высвобождением были получены с использованием таких полимеров, как НРМС К4М, Eudragit RSPO и их смеси. Исследование высвобождения *in vitro* показало, что высвобождение ЛС было увеличено до 16 часов с твердыми дисперсиями, содержащими ГПМЦ; и до 10 часов в ТД, содержащей Eudragit, в то время как твердая дисперсия, содержащая оба полимера, продлила высвобождение до 12 часов. Было высказано предположение, что ГПМЦ действует как лучший замедлитель высвобождения модельного лекарственного средства.

Фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (ФГПМЦ): доступны различные типы ФГПМЦ с молекулярной массой от 20 000 до 2 000 000. ТД ацетаминофена с замедленным высвобождением были приготовлены с ФГПМЦ и хитозаном. Взаимодействие водородной связи было подтверждено между карбонильной группой ФГПМЦ с аминогруппой ацетаминофена. Также известна разработка ТД альбендазола с использованием ФГПМЦ. **Eudragit:** это торговое название полиакрилатов и полиметакрилатов. Различные типы Eudragit коммерчески доступны и могут быть получены в виде сухого порошка, водной дисперсии или органического раствора. Для приготовления ТД с замедленным высвобождением обычно используют Eudragit L, Eudragit RL, Eudragit RS, Eudragit RLPO и Eudragit RSPO. Типы Eudragit RL обладают высокой проницаемостью по сравнению с типами Eudragit RS. Обширные исследования влияния комбинаций Eudragit RL и Eudragit RS на профиль высвобождения препарата показали, что состав, содержащий больше Eudragit RS, вызывает более медленное высвобождение лекарства, чем состав, содержащий большее количество Eudragit RL. Кроме того, ТД метопролола с замедленным высвобождением была приготовлена с использованием Eudragit RLPO и Eudragit RSPO. ТД, содержащая большее количество Eudragit RSPO, показала более медленные скорости высвобождения, чем та, содержащая большее количество Eudragit RLPO.

Для приготовления ТД с замедленным высвобождением также можно использовать другие материалы, такие как поливинилпирролидон-винилацетат 62 [PVP-VA62], плуроник F-66,44, компритол 888 АТО, поллоксамер 188,9 метилцеллюлоза, пербутаноил-*b*- циклодекстрин, хитозан, 25 коллидон®SR и этилвинилацетат.

Закключение. ТД являются хорошим выбором для решения проблемы плохой растворимости лекарств, однако их приготовление с использованием определенных носителей, такие как нерастворимые полимеры дает им возможность пролонгировать высвобождение как плохо растворимых, так и растворимых лекарственных средств. Так что можно сказать, что ТД являются перспективными.

Литература

1. Darandale A., Prashant J.G., Abhijeet A. Sustained release dosage form: a concise review. *International journal of pharmaceutics & drug analysis*. 2017;5(5):153-160.
2. Dharna A., Neelam S., Sukhbir S., Sandeep A. Solid dispersions: a review on drug delivery system and solubility enhancement. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2013;4(6):2094-2105.
3. Kaushik R., Budhwar V., Kaushik D. An Overview on Recent Patents and Technologies on Solid Dispersion. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 2020;14(1):63-74.
4. Modica de Mohac L., Keating A.V., de Fátima Pina M., Raimi-Abraham B.T. Engineering of Nanofibrous Amorphous and Crystalline Solid Dispersions for Oral Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(1):7. doi:10.3390/pharmaceutics11010007

5. Moorthy S., Madan K., Sambamoorthy U. Formulation of sustain release solid dispersions of verapamil hydrochloride using ethyl cellulose and Eudragit RSPO. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011;3(1):116-122.
6. Nair A.R., Lakshman Y.D., Anand V.S.K., Sree K.S.N., Bhat K., Dengale S.J. Overview of Extensively Employed Polymeric Carriers in Solid Dispersion Technology. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21:309. DOI: 10.1208/s12249-020-01849-z.
7. Nguyen N.S.M., Yuta O., Yayoi K., Takehisa H. Preparation and Characterization of Solid Dispersions Composed of Curcumin, Hydroxypropyl Cellulose and/or Sodium Dodecyl Sulfate by Grinding with Vibrational Ball Milling. *Pharmaceutics*. 2020;12;13(11):383. doi:10.3390/ph13110383.
8. Uchiyama H., Wada Y., Hatanaka Y., Hirata Y., Taniguchi M., Kadota K., Tozuka Y. Solubility and permeability improvement of quercetin by an interaction between α -glucosyl stevia nanoaggregates and hydrophilic polymer. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;108(6):2033-2040.
9. Patil S.A., Kuchekar B.S., Chabukswar A.R., Jagdale S.C. Formulation and Evaluation of Extended-Release Solid Dispersion of Metformin Hydrochloride. *Pharmaceutics*. 2010;2(2):121-129.
10. Shergilla M., Patela M., Khana S., Bashira A., McConvilleb Ch.. Development and characterisation of sustained release solid dispersion oral tablets containing the poorly water soluble drug disulfiram. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;497:3-11.
11. Tapan K.G, Kulesh K., Amit A., Ajazuddin Hemant B., Dulal K.T. A novel and alternative approach to controlled release drug delivery system based on solid dispersion technique. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 2012;50(2):147-159.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

С.С. Белокуров*

ФГБОУ ВО СПбФУ Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: ser.j.b.777@mail.ru

Ключевые слова: экстрагирование, лекарственное растительное сырье, виброкавитационный гомогенизатор.

Введение. Традиционные способы, предлагаемые для интенсификации процесса экстрагирования, например, мацерация с перемешиванием позволяют сократить длительность процесса, но, за счет измельчения сырья и вымывания высокомолекулярных веществ из разрушенных клеток, извлечения загрязняются балластными веществами и тонкодисперсной твердой фазой растительного материала. Поэтому поиск способов интенсификации процесса экстрагирования, которые позволят получать извлечения за короткое время, а также без потерь биологически активных веществ (БАВ) является актуальной задачей современной отечественной фармацевтической технологии (Хмелев В.Н. и др., 2010; Белокуров С.С. и др., 2019а).

Цель. Целью данной работы является сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования лекарственного растительного сырья (ЛРС), имеющего различную гистологическую структуру (семена, плоды, корни).

Материалы и методы. В качестве объектов исследования выбрали пажитника сенного семена, цикория обыкновенного корни и брусники обыкновенной ягоды. В качестве методов экстрагирования использовали следующие методы: мацерация с перемешиванием, ультразвуковая экстракция (УЗ-экстракция) и виброкавитационная экстракция. Во всех методах экстрагирования время экстракции составило 1 час. Температура экстракции так же являлась константой и составляла 60 °С. При использовании мацерации с перемешиванием и виброкавитационной экстракции изменяли параметры: скорость вращения мешалки и гомогенизатора. Она составляла 1000, 3000 и 5000 об/мин (Флисюк Е.В. и др., 2020). При использовании УЗ-экстракции изменяли параметры мощности ультразвукового излучения. Оно составляло 17, 20 и 22 кВт. Перед экстракцией ЛРС не измельчали. После экстракции измеряли размер частиц шрота методом ситового анализа. В качестве экстрагента для пажитника сенного семян использовали 60 % водный раствор этанола, для цикория обыкновенного корней - воду очищенную, для брусники обыкновенной ягод - 60 % водный раствор этанола (Белокуров С.С. и др., 2019б). В связи с тем, что по экспериментальным данным, полученным нами ранее, эти экстрагенты позволяют получить наибольший выход экстрактивных веществ из сырья. Во всех извлечениях определяли количество экстрактивных веществ, согласно государственной фармакопее XIV издания. Так же, в извлечениях из пажитника сенного определяли содержание сапонинового комплекса методом ВЭЖХ-МС, на приборе Agilent QTOF-6530 в пересчете на диосцин, в извлечениях из цикория обыкновенного определяли содержание инулина методом спектрофотометрии в УФ области спектра в пересчете на фруктозу, в извлечениях из брусники обыкновенной ягод определяли содержание арбутина методом спектрофотометрии в УФ области спектра. Спектрофотометрия проводилась на приборе СФ-2000.

Результаты. В результате экспериментов было установлено, что наибольший выход экстрактивных веществ во всех случаях был получен при использовании виброкавитационного метода экстракции при

скорости вращения гомогенизатора 5000 об/мин ($48,52 \pm 0,96\%$ для семян пажитника сенного, $53,94 \pm 1,24\%$ для ягод брусники обыкновенной, $56,71 \pm 2,41\%$ для корней цикория обыкновенного). Так же можно отметить, что в отличие от мацерации с перемешиванием и УЗ-экстракцией, полученные извлечения были полностью прозрачными без опалесценции. Средний размер частиц шрота после виброкавитационной экстракции имеет нормальное распределение и наибольшее количество частиц шрота ($42,3 \pm 0,78\%$) имело размер $0,25-0,1$ мм. При виброкавитационной экстракции при частоте вращения гомогенизатора 3000 и 5000 об/мин происходило полное разделение шрота и извлечения, что позволило отделить последнее и получить целевой продукт. При определении содержания БАВ лучшим показал себя виброкавитационный метод экстракции (содержание сапонинового комплекса в пересчете на диосцин в семенах пажитника сенного составило $5,5 \pm 0,34\%$, содержание инулина в корнях цикория обыкновенного составило $67,41 \pm 1,22\%$, содержание арбутина в ягодах брусники обыкновенной составило $0,48 \pm 0,01$). Так же было установлено, что при экстракции в УЗ поле более 40 минут происходит разрушение целевых БАВ в семенах пажитника сенного и ягодах брусники обыкновенной. В случае с корнями цикория уменьшения его содержания при УЗ-экстракции не наблюдалось.

Заключение. На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что виброкавитационный метод экстрагирования, благодаря тому, что в нем протекают сразу несколько процессов, позволяет ускорить экстрагирование и получить извлечения из пажитника сенного семян, цикория обыкновенного корней и брусники обыкновенной ягод с высоким содержанием БАВ без дополнительных технологических операций для данного ЛРС.

Литература

1. Белокуров С.С., Наркевич И.А., Флисюк Е.В., Каухова И.Е., Ароян М.В. Современные методы экстрагирования лекарственного растительного сырья (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2019а;56(6):45-50 DOI:10.30906/0023-1134-2019-53-6-48-53.
2. Белокуров С.С., Флисюк Е.В., Наркевич И.А., Лужанин В.Г., Шилов С.В., Новикова К.О. Сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019б;8(3):49-55 DOI:10.33380/2305-2066-2019-8-3-49-55.
3. Флисюк Е.В., Белокуров, С.С., Наркевич И.А., Шиков А.Н., Флисюк О.М., Ивкин Д.Ю. Кинетика экстрагирования диосцина из растительного сырья в виброкавитационном гомогенизаторе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):77-81 DOI:10.33380/2305-2066-2020-9-2-77-81.
4. Хмелев В.Н., Сливин А.Н., Барсуков Р.В., Цыганок С.Н., Шалунов А.В. Применение ультразвука высокой интенсивности в промышленности. - Барнаул: Изд-во АлтГТУ; 2010. - 171 с.

КАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ОКСО-ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА

А.Р. Григорьева^{1*}, Е.Н. Колобова¹, Р. Mäki-Arvela²,
S.A.C. Carabineiro³, D.Yu. Murzin², А.Н. Пестряков¹

¹Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий

НИ ТПУ, г. Томск, Россия

²Johan Gadolin Process Chemistry Centre, Abo Akademi University, Turku, Finland

³LAQV-REQUIMTE, Universidade NOVA de Lisboa - FCT, Caparica, Portugal

e-mail: bar0710@mail.ru

Ключевые слова: оксо-производные бетулина, наночастицы серебра и золота, жидкофазное окисление.

Введение. Оксо-производные бетулина обладают ценными биологически активными свойствами и представляют исключительный интерес для фармацевтической промышленности, в первую очередь, как перспективные противоопухолевые и противовирусные препараты. На данный момент основным методом получения этих производных является окисление бетулина токсичными соединениями хрома. Этот метод экономически не выгоден в связи с низким выходом целевых продуктов, а также образованием большого количества токсичных отходов (Tolstikov G.A. et al., 2005). Наиболее перспективным путем решения этой проблемы является разработка новых гетерогенно-каталитических методов получения оксо-производных бетулина, включающая, в первую очередь, разработку новых высокоэффективных катализаторов. В этом отношении наиболее перспективными являются катализаторы на основе наночастиц золота и серебра, так как они позволяют реализовать процесс в мягких условиях с использованием доступного и дешевого окислителя - воздуха.

Цель. Разработка высокоэффективных катализаторов на основе наночастиц золота и серебра для гетерогенно-каталитического метода получения оксо-производных бетулина.

Материалы и методы. В качестве носителей катализаторов использовались: $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, AlOOH (бемит) и AlOOH_t , полученный отжигом бемита. Содержание серебра и золота в катализаторе - 3 и 4 масс% соответственно. Катализаторы были приготовлены методом контролируемого осаждения с мочевиной (для Au), с NaOH (для Ag) и предобработаны в атмосфере водорода или кислорода. Реакцию жидкофазного

окисления бетулина проводили в реакторе периодического действия с использованием в качестве окислителя воздуха. Образование/выход продуктов и конверсию бетулина через определенные промежутки времени оценивали на основе анализа аликвот методом ГХ (PerkinElmer AutosystemXL, Уолтем, Массачусетс, США). Для характеристики катализаторов были использованы следующие методы: РФА (исследование фазового состава носителей и соответствующих катализаторов) на MiniFlex II (RIGAKU, Токио, Япония), БЭТ (определение текстурных свойств катализаторов) на ASAP 2060 (Micromeritics Instrument Corporation, Норкросс, Джорджия, США), ПЭМ ВР (определение размера наночастиц благородного металла) на JEM-2100F (JEOL Ltd., Токио, Япония) и другие.

Результаты. В предыдущих исследованиях было выявлено, что наиболее подходящим носителем для золотосодержащих катализаторов реакции окисления бетулина является оксид алюминия (Kolobova E. et al., 2021). Было решено использовать алюминиевые носители для синтеза серебряносодержащих катализаторов и сравнить с ранее полученными результаты для Au катализаторах. На основе каталитических исследований золото- и серебряносодержащих катализаторов на алюминиевых носителях было обнаружено, что наибольшая конверсия бетулина достигается на катализаторах, в качестве носителя в которых выступает γ -Al₂O₃ (таблица 1). Однако, выход оксо-производных для этих образцов был в 1,2 – 1,7 раз меньше наблюдаемой конверсии бетулина. Данное несоответствие между наблюдаемой конверсией бетулина и выходом продуктов реакции было обусловлено протеканием побочных реакций этерификации/олигомеризации/полимеризации на поверхности катализаторов с участием сильных Льюисовских кислотных центров носителя (ЛКЦ). Данное предположение было подтверждено на основе каталитических исследований образцов в качестве носителя, в которых был использован бемит, характеризующийся меньшим содержанием ЛКЦ. Конверсия бетулина для этих катализаторов была в 1,3 – 2,7 раз меньше по сравнению с соответствующими катализаторами на основе золота и серебра на γ -Al₂O₃, а сходимость материального баланса была в 1,2-1,5 раза выше. В результате, в случае золотосодержащих катализаторов, выход продуктов на бемите оказался больше, чем на гамма-оксиде алюминия, несмотря на меньшую конверсию. Для серебряносодержащих катализаторов, в силу использования в качестве осаждающего агента щелочи, а в качестве прекурсора нитрата серебра (в отличие от золотосодержащих образцов, для приготовления которых использовалась мочеви́на (осаждающий агент) и золотохлористоводородная кислота) выход продуктов оказался выше для образцов, в которых серебро было нанесено на γ -Al₂O₃, что было обусловлено частичным отравлением ЛКЦ на поверхности γ -Al₂O₃ щелочью во время приготовления катализатора, и, соответственно, для серебряносодержащих катализаторов на γ -Al₂O₃ сходимость баланса масс оказалась выше, чем для соответствующих золотых катализаторов. Стоит отдельно отметить, что Ag-содержащие катализаторы оказались более селективными в отношении бетулонового альдегида, а Au-содержащие в отношении бетулону. Данное различие между золотыми и серебряными катализаторами можно использовать, как инструмент для получения желаемого оксо-производного бетулина посредством замены активного металла.

Таблица 1. Каталитические результаты окисления бетулина

№	Катализатор	X (%)	GCLPA (%)	Σ продуктов (%)	Селективность (%)					Средний размер частиц Au/Ag (нм)
					C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	
1	Au/ γ -Al ₂ O ₃ _pH ₂	97	59	57	29	64	0	0	7	3.1
2	Au/AlOOH_pH ₂	77	91	69	47	34	0	2	17	2.9
3	Au/AlOOH t°_pH ₂	92	64	-	55	30	0	15	0	-
4	Au/AlOOH_S_pH ₂	74	81	56	56	21	0	0	23	4.2
5	Au/AlOOH_L_pH ₂	97	65	62	35	56	0	0	9	3.2
6	Au/AlOOH_N_pH ₂	90	72	62	40	48	0	0	12	3.7
7	Ag/ γ -Al ₂ O ₃ _pH ₂	83	77	67	8	53	1	38	0	3.0
8	Ag/ γ -Al ₂ O ₃ _pO ₂	19	88	17	3	70	3	24	0	11.5
9	Ag/AlOOH_pH ₂	31	91	29	7	71	2	20	0	3.4
10	Ag/AlOOH_pO ₂	33	86	29	6	72	2	20	0	3.4
11	Ag/AlOOH t°_pH ₂	51	90	47	7	68	2	22	0	2.6
12	Ag/AlOOH t°_pO ₂	42	96	41	7	70	2	20	0	2.3

*pH₂(pO₂) – предобработка в атмосфере водорода или кислорода; X - конверсия бетулина через 6 ч. (%); GCLPA – сходимость баланса масс (%); Σпродуктов – общий выход продуктов после 6ч. реакции; Селективность по C₁ - бетулоноу, C₂ - бетулоновому альдегиду, C₃ - бетулоновой кислоте, C₄ - бетулоновому альдегиду, C₅ - бетулиновой кислоте.

Как было отмечено выше наибольшая конверсия бетулина наблюдалась для образцов, в которых в качестве носителя был использован γ - Al_2O_3 , что, как было выявлено при более детальном изучении физико-химических свойств исследуемых катализаторов, было обусловлено формированием наночастиц золота и серебра на γ - Al_2O_3 по размеру близких к оптимальному. Для дополнительного подтверждения выдвинутой гипотезы была подготовлена серия серебряных и золотых катализаторов на разных алюминиевых носителях и предложена математическая модель, позволяющая описать зависимость TOF (скорости реакции) от среднего размера наночастиц золота и серебра на поверхности носителей. Из рисунка 1 видно, что предложенная модель адекватно описывает экспериментальные данные. Таким образом, можно сделать вывод, что окисление бетулина является структурно-чувствительной реакцией, требующей оптимального размера наночастиц золота 3,3 нм (рисунок 1а) (Kolobova E. et al., 2021) и серебра- 2,9-3 нм (рисунок 1б) (Grigoreva A. et al., 2021).

Заключение. Наибольшую значимость в процессе окисления бетулина катализаторами с нанесенными наночастицами Au и Ag играет природа носителя, определяющая селективность реакции, а также средний размер и распределение наночастиц золота и серебра. Несоответствие между конверсией бетулина и выходом продуктов реакции обусловлено протеканием побочных реакций, которые катализируются сильными кислотными центрами Льюиса носителя. Реакция окисления бетулина является структурно-чувствительной, требующей определенного размера наночастиц золота и серебра, 3,3 и 2,9-3 нм, соответственно.

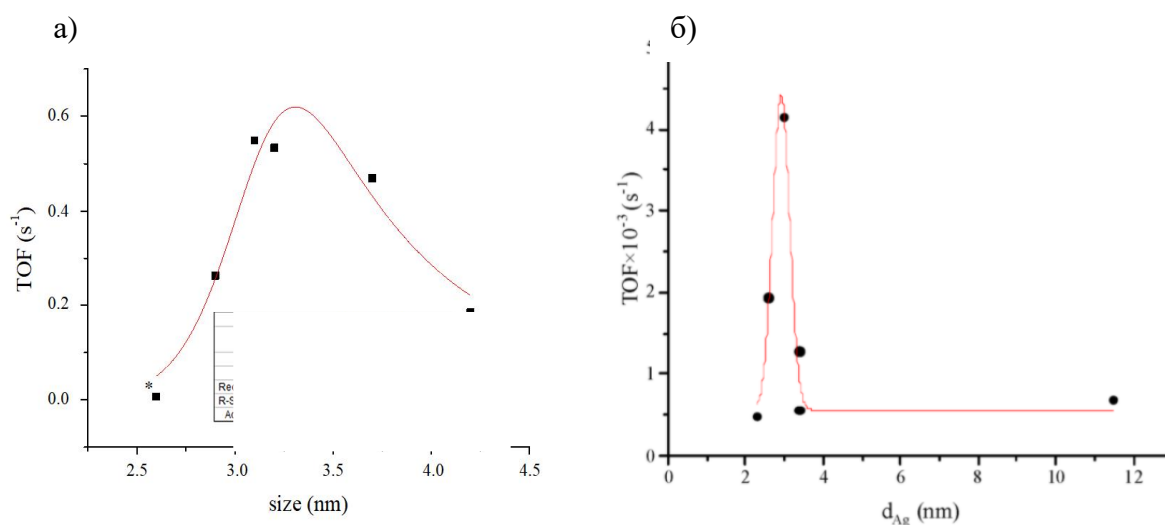


Рис. 1. Зависимость TOF от среднего размера наночастиц золота(а) и серебра(б)

Литература

1. Grigoreva A., Kolobova E., Pakrieva E., Mäki-Arvela P., Carabineiro S.A.C., Gorbunova A., Bogdanchikova N., Murzin D.Yu., Pestryakova A. Supported silver nanoparticles as catalysts for liquid-phase betulin oxidation. *Nanomaterials*. 2021;11:469. DOI: 10.3390/nano11020469.
2. Kolobova E., Maki-Arvela P., Grigoreva A., Pakrieva E., Carabineiro S.A.C., Peltonen J., Kazantsev S., Bogdanchikova N., Pestryakov A., Murzin D.Yu. Catalytic oxidative transformation of betulin to its valuable oxo-derivatives over gold supported catalysts: Effect of support nature. *Catalysis Today*. 2021;367:95-110. DOI: 10.1016/j.cattod.2020.07.051.
3. Tolstikov G.A., Flekhter O.B., Shultz E.E., Baltina L.A., Tolstikov A.G. Betulin and its derivatives. Chemistry and biological activity. *Chemistry for Sustainable Development*. 2005;13:1-29.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СТАДИИ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ КРИОПРОТЕКТОРА В ДИСПЕРСИЮ ЛИПОСОМ ЦИФЕТРИЛИНА

М.В. Дмитриева*

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва, Россия

e-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

Ключевые слова: криопротектор, липосомы, технологическая стадия, цифетрилин.

Введение. Для стабилизации липосомальной мембраны в процессе сублимационного высушивания в состав препарата включают специальные вспомогательные вещества – криопротекторы (КП). КП может быть введен в липосомальную дисперсию на различных технологических стадиях. Во-первых, при формировании липосом посредством растворения КП в дисперсионной среде, предназначенной для гидратации липидной пленки. При этом КП будет находиться как снаружи, так и внутри липосом. Во-

вторых, посредством добавления КП в полученную дисперсию многослойных липосом (МСЛ) до экструзии. В-третьих, непосредственно перед лиофилизацией путем растворения в готовой дисперсии однослойных липосом (ОСЛ), в этом случае молекулы КП образуют только внешний защитный слой.

Цель. Определение технологической стадии получения липосом цифетрилина, подходящей для введения криопротектора в состав дисперсии.

Материалы и методы. Липосомы цифетрилина получали методом гидратации липидной пленки. Цифетрилин (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), соевый фосфатидилхолин S PC (СФХ, Lipoid, Германия), холестерин $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Japan) и полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолламин (Lipoid, Германия), взятые соответственно в молярном соотношении 1:60:12:0,24 (Dmitrieva M. et al., 2020), растворяли в хлороформе. Полученный раствор переносили в круглодонную колбу и упаривали на испарителе роторном Heidolph Hei-VAP Advantage (Heidolph, Германия) при пониженном давлении и температуре водяной бани +40 °С до формирования полупрозрачной пленки. Пленку досушивали под вакуумом до полного удаления хлороформа и гидратировали с образованием дисперсии МСЛ с концентрацией цифетрилина 1 мг/мл. МСЛ фильтровали и измельчали на экструдере Lipex™ Thermobarrel Extruder (Northern Lipids, Канада) под давлением с использованием нейлоновых мембран с диаметром пор 1,2, 0,45 и 0,22 мкм (ООО Палл Евразия, Россия) и поликарбонатных мембран с диаметром пор 0,2 мкм (Whatman, Великобритания). В качестве КП использовали сахарозу ЧДА (Химмед, Россия) в молярном соотношении КП/СФХ 4:1. Контроль качества образцов дисперсий МСЛ и ОСЛ цифетрилина проводили по критериям: размер и дзета (ζ)-потенциал везикул, индекс полидисперсности (PDI).

Результаты. В зависимости от стадии введения сахарозы в состав липосомальной формы цифетрилина в процессе получения были проанализированы 3 технологических схемы (таблица 1). Данные исследования показали, что способ введения сахарозы существенно влияет на характеристики получаемых продуктов. Наилучшие результаты по показателю «размер» МСЛ и ОСЛ цифетрилина отмечаются при использовании раствора сахарозы в качестве дисперсионной среды – 190 и 163 нм, соответственно. При приготовлении липосом по технологии 3 на стадии гидратации формируется более гомогенная дисперсия, при экструзии которой получаются везикулы с более высоким отрицательным зарядом -22,4 мВ относительно других образцов ОСЛ и средним размером 169 нм. Введение сахарозы в дисперсию МСЛ хотя и способствует стабилизации липосомальной структуры (ζ -потенциал -29,8 мВ), однако при их измельчении образуются более крупные липосомы, характеризующиеся меньшим по модулю поверхностным зарядом по сравнению с образцами, полученными по технологическим схемам 1 и 3.

Таблица 1. Сравнительный анализ технологий получения липосомальной лекарственной формы цифетрилина

Параметр сравнения		Технологические схемы		
		1	2	3
Стадия введения КП		Гидратация липидной пленки	После гидратации липидной пленки	После экструзии
Показатели качества дисперсии МСЛ	Размер везикул, нм	190±14	266±23	444±21
	PDI	0,809±0,029	0,698±0,041	0,368±0,026
	ζ -потенциал везикул, мВ	-(25,5±1,1)	-(29,8±0,8)	-(23,5±1,4)
Показатели качества дисперсии ОСЛ	Размер везикул, нм	163±4	190±9	169±6
	PDI	0,085±0,015	0,223±0,017	0,126±0,012
	ζ -потенциал везикул, мВ	-(20,7±0,9)	-(17,0±1,0)	-(22,4±0,6)

Заключение. Обобщая результаты, можно сделать вывод о возможности использования при получении липосом цифетрилина технологических схем 1 и 3. Однако недостатком 3-й технологии является необходимость включения в схему дополнительной операции по проведению стерилизующей фильтрации после растворения КП в дисперсии ОСЛ цифетрилина. Поэтому для получения липосомальной лекарственной формы цифетрилина выбрана технологическая схема 1, характеризующаяся введением сахарозы на стадии гидратации липидной пленки.

Литература

1. Dmitrieva M., Shprakh Z., Orlova O., Ignatyeva E., Lantsova A., Nikolaeva L., Krasniuk I. Selection of the composition of a liposomal dosage form of a russian somatostatin analogue with antitumor activity. *International journal of applied pharmaceutics*. 2020;12(6):65–68. DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijap.2020v12i6.39253>.

РАЗРАБОТКА ЭМУЛЬСИОННОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ГРАМИЦИДИНА С И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕЕ ВЛИЯНИЯ НА БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДА

А.А. Дранников^{1,2*}, Ватлин И.С.^{1,2}, М.Е. Трусова¹,

А. Ди Мартино¹, А.М. Гурьев³, М.В. Белоусов^{1,3}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

²АО «Производственная фармацевтическая компания «Обновление», г. Новосибирск, Россия

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

e-mail: alexdr2037@gmail.com

Ключевые слова: грамицидин С, антибиотик, эмульсия.

Введение. Грамицидин С находит клиническое применение в терапии заболеваний, вызванных грамположительными, грамотрицательными бактериями и грибами на около 70 лет (Gause G.F., Brazhnikova M.G., 1944). Антибиотик входит в состав лекарственных препаратов (ЛП) исключительно для местного и наружного применения, что связано с низкой системной абсорбцией пептида, обусловленной его низкой растворимостью в воде. В большинстве случаев ЛП, содержащие грамицидин С выпускают в виде таблеток для рассасывания, растворов или спрея для местного применения. Последние содержат в своем составе поверхностно-активные вещества (ПАВ), повышающие растворимость пептида. Применение ПАВ является одним из наиболее изученных способов солюбилизации субстанций, а при определенных условиях ПАВ способны образовывать самоэмульгирующиеся системы, требующие минимальных энергетических и временных затрат на их изготовление. Эффект самоорганизации достигается благодаря преодолению силы межфазного натяжения при применении ПАВ. Для стабилизации подобного рода эмульсий активно используют соразтворители, которые также содержатся в ЛП Грамицидин С, спрей для местного применения дозированный. Данная категория веществ представлена спиртом этиловым, пропиленгликолем и глицерином, которые обладают более низким значением гидрофильно-липофильного баланса и способны взаимодействовать с наружным слоем дисперсной фазы, определяя термодинамическую устойчивость эмульсии. В зависимости от размера частиц подразделяют микро- и наноэмульсии (Kale S.N., Deore S.L., 2017). Также установлено, что размер частиц дисперсной фазы оказывает значительное влияние на свойства действующих веществ, в том числе, на их антимикробные свойства (Ram K.P., Sameer S.K., 2020).

Цель. Разработать эмульсионную систему доставки грамицидина С и определить ее влияние на биофармацевтические свойства пептида.

Материалы и методы. Грамицидина С дигидрохлорид (АО «ПФК Обновление», Россия), пропиленгликоль (EP, USP), полисорбат-80 (EP, NF), этиловый спирт и вода очищенная (ГФ РФ XIV) были использованы для приготовления эмульсии следующим образом: в 60 мл воды очищенной при перемешивании со скоростью 400 об/мин последовательно загружали 16 мл спирта этилового, 10 мл пропиленгликоля и 1 мл полисорбата-80, перемешивали в течение 10 минут, после чего вносили в полученный раствор 1 г грамицидина С дигидрохлорида. Увеличивали скорость перемешивания до 700 об/мин, загружая при этом воду очищенную до 100 мл. Перемешивали полученную смесь в течение 30 минут. Полученную эмульсию фильтровали через шприцевой фильтр рейтингом 0,45 мкм (Glueck, Россия). Формирование эмульсии подтверждали с использованием метода рамановской спектроскопии (Bruker BRAVO Raman spectrometer, Bruker, Германия) в диапазоне 3200-400 см⁻¹, проводя трехкратную регистрацию спектров. Тип эмульсии устанавливали посредством проведения теста на разбавление с использованием УФ-спектрофотометра (UV-1900i, Shimadzu, Япония) сравнивая пропускающую способность эмульсии и разбавленного в 10 раз образ образца при 610 нм, используя дистиллированную воду в качестве образца сравнения. Метод динамического рассеяния света (Zetasizer, Malvern Instruments, Великобритания) использовали для определения размера и ζ-потенциала частиц эмульсии. Образцы анализировали после приготовления. Высвобождение грамицидина С из эмульсии проводили с использованием полупроницаемой мембраны (Spectra/Por[®]7, Thermo Fisher Scientific Inc, США) с размером пор 3,5 кДа, исключая протекание образца. 18,75 мг эмульсии помещали в колбу, содержащую 100 мл фосфатного забуференного физиологического раствора с pH = 7,4. В качестве образца сравнения использовали субстанцию грамицидина С дигидрохлорида. Образцы перемешивали с использованием орбитального шейкера (Biogus, Россия), периодически отбирая пробы и добавляя в колбу буферный раствор для поддержания объема. Количественное определение грамицидина С определяли с применением метода ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы использовали градиентный поток водного раствора хлорной кислоты, фосфорной кислоты раствора с pH 2,50 ± 0,05 и ацетонитрила для хроматографии. Хроматографические условия: колонка Luna C18, 250×4,6 мм, 5 мкм, Phenomenex, скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 25 °С, детектор УФ, 210 нм, объем пробы 20 мкл. Валидацию разработанной методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV. Исследование антимикробного действия грамицидина С в составе эмульсии проводили в соответствии с ГФ РФ XIV.

Результаты. Анализ полученного образца эмульсии методом рамановской спектроскопии позволил выявить наличие сигналов, характерных для спирта этилового и пропиленгликоля в составе дисперсионной среды. При этом на спектре отделенной дисперсной фазы наблюдаются сигналы грамицидина С и полисорбата-80, что позволяет определить качественный состав фаз. В подтверждение полученных

результатов, отсутствие инверсии фаз и увеличение прозрачности испытуемого образца при разбавлении эмульсии дистиллированной водой позволил сделать вывод о том, что разработанная эмульсия имеет тип «м/в». Анализ разработанной системы методом динамического рассеяния света позволил установить размер частиц эмульсии в пределах от 5 до 50 нм. Среднее значение ζ -потенциала частиц составил +3,36 мВ с величиной допустимого отклонения 4,5 мВ, что коррелирует с литературными данными для эмульсий, образованных неионогенными ПАВ (Guo L. et al., 2020). В ходе исследования влияния эмульсии на биофармацевтические свойства грамицидина С установлено, что антибиотик из разработанной системы высвобождается с высокой скоростью (более 75 % за 1 ч), в то время как исходная субстанция полностью не растворима в среде с pH = 7,4 (рис. 1 а). Данное свойство способно обеспечить более высокую эффективность пептида, которая выражается в повышенной антимикробной активности (рис.1б):

Из представленных на рисунке 1 результатов можно сделать вывод, что грамицидин С в составе микроэмульсии демонстрирует более высокий уровень антимикробной активности, что связано с повышенной растворимостью антибиотика в воде, а также с синергетическим взаимодействием с ПАВ, которые оказывают аналогичное действие на мембрану клеток.

Таким образом, в рамках настоящего исследования разработана эмульсионная система доставки грамицидина С, а также установлено положительное влияние данной системы на биодоступность и антимикробные свойства антибиотика.

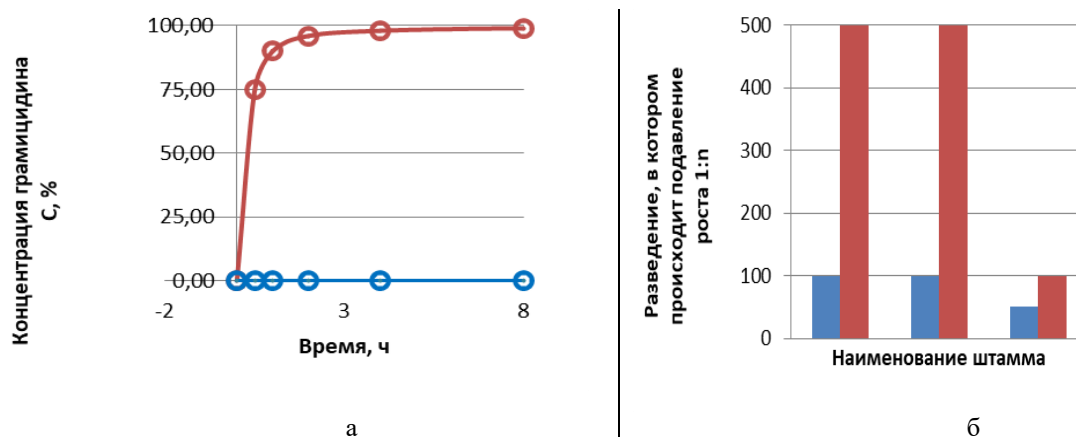


Рис. 1. Сравнение параметров высвобождения (а) и антимикробного действия (б) грамицидина С дигидрохлорида в исходном состоянии (синий) и в составе эмульсии (оранжевый)

Литература

2. Gause G.F., Brazhnikova M.G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature*. 1944;154:703-703. DOI: 10.1038/154703a0.
3. Guo L., Fang Y.Q., Liang X.R., Xu Y.Y., Chen J., Li Y.H., Meng Y.C.. Influence of polysorbates (Tweens) on structural and antimicrobial properties for microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119939. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119939.
4. Kale S.N., Deore S.L. Emulsion microemulsion and nanoemulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2017;8(1):39-47. DOI: 10.5530/srp.2017.1.8.
5. Ram K.P., Sameer S.K. Effect of surfactants and co-surfactants on phase behaviour and physicochemical properties of self-nanoemulsifying drug delivery system loaded with plumbagin. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;10(1):1-11. DOI: 10.35652/IGJPS.2020.10101.

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА В СОСТАВЕ ПРЕССОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ ТАБЛЕТОК

К.С. Кацал*, Е.Ю. Загоруйко

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: kacal.kseniya@pharminnotech.com

Ключевые слова: таблетки, покрытие, прессование, модифицированное высвобождение.

Введение. Таблетки с прессованным покрытием получают напрессовыванием смеси вспомогательных веществ на таблетки-ядра. Такие покрытия имеют ряд преимуществ по сравнению с дражированными и пленочными оболочками: технология не требует использования растворителей и их удаления при нагревании, поэтому подходит для термолabileльных активных фармацевтических субстанций (АФС); позволяет вносить АФС в состав оболочки, в том числе создавать комбинированные лекарственные формы (ЛФ) с физически несовместимыми АФС в ядре и оболочке таблетки. Прессованные покрытия представляют интерес так же и как средство создания ЛФ с модифицированным высвобождением, что

достигается путём введения в покрытие вспомогательных веществ с заданными свойствами (Bose S., Bogner R.H., 2007; Gaikwad S.S., Kshirsagar S.J., 2020).

Цель. Рассмотреть особенности использования вспомогательных веществ в составе прессованных покрытий таблеток.

Материалы и методы. Метод исследования – поиск и анализ научной информации (научные статьи (ресурсы PubMed, Science direct и др.), базы данных лекарственных препаратов, техническая информация производителей вспомогательных веществ) о составе и назначении вспомогательных веществ в составе прессованных покрытий.

Результаты. В состав прессованных покрытий могут входить следующие группы вспомогательных веществ: наполнители, связующие и пролонгаторы, дезинтегранты, антифрикционные и смазывающие вещества, красители, солюбилизаторы, корригенты вкуса и другие (Rane A.B. et al., 2009; Shah R. Et al., 2011; Malik D., Singh I., 2012; Ashok Ch. T al., 2015; Mannan A., Rao K.P., 2015; Patil R. Et al., 2016; Hales D. Et al., 2017; Liu T. Et al., 2018). Между прессованным покрытием и ядром таблетки может находиться дополнительный слой пленочной оболочки, что позволяет контролировать время высвобождения (рис. 1) (Hales D. Et al., 2017).

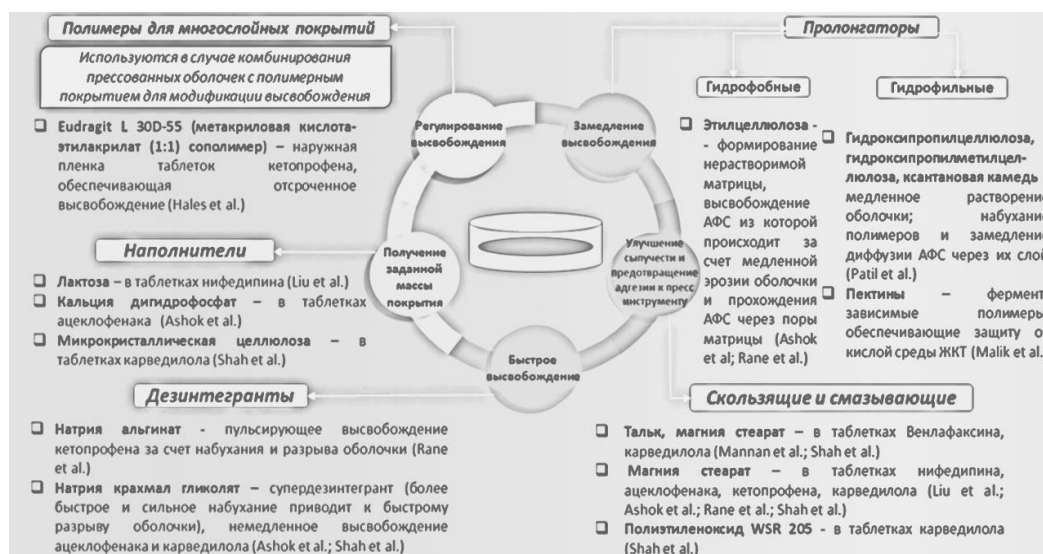


Рис. 1. Основные группы вспомогательных веществ в составе прессованных покрытий и примеры их использования в разработке таблеток

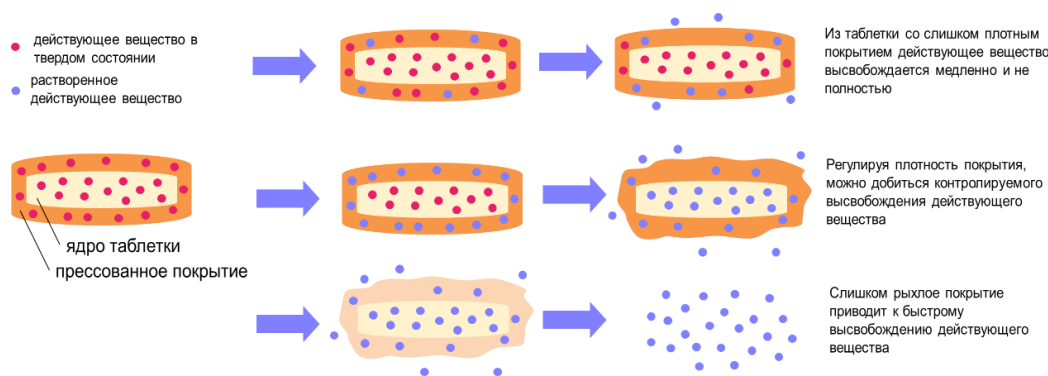


Рис. 2. Высвобождение АФС из таблеток с напрессованным покрытием

Ключевыми требованиями ко вспомогательным веществам для прессованных покрытий являются обеспечение хороших технологических свойств массы для прессования, а также заданного типа высвобождения АФС. Достижение требуемых значений сыпучести, прессуемости и насыпной плотности достигается введением наполнителей (предпочтительно использовать марки вспомогательных веществ, подходящие для прямого прессования), скользких и смазывающих веществ (рис. 1). Высвобождение АФС из таблеток с прессованным покрытием зависит от свойств веществ в составе оболочки, характеристик массы для прессования, толщины и равномерности покрытия, давления прессования и других (рис. 2) (Malik D., Singh I., 2012; Picart L. Et al., 2021).

Разрушение оболочки может происходить вследствие ее растворения, набухания с последующим растворением или разрыва (Ozeki Y. Et al., 2004; Rane A.B. et al., 2009). В качестве примера рассмотрим таблетки преднизона с модифицированным высвобождением производителя Horizon Pharma (США). На

территории стран Европейского союза данный препарат зарегистрирован под торговым наименованием LODOTRA[®], в США – RAYOS[®].

Препарат предназначен для лечения ревматоидного артрита и представляет собой таблетки с прессованным покрытием, которое содержит наполнитель (дигидрофосфат кальция), связующее (поливинилпирролидон), скользящее вещество (кремния диоксид коллоидный), лубриканты (глицерила бегената и магния стеарат) и краситель (оксид железа желтый). В состав ядра таблетки в качестве супердезинтегранта входит краскармеллоза натрия. При разработке таблеток Horizon Pharma использовала запатентованную технологию прессованных покрытий Geoclock[®] от Skyepharma (Великобритания). Оболочка задерживает начало высвобождения АФС на 3,5–4 часа, а наличие супердезинтегранта в ядре таблетки приводит к быстрому его разрушению после растворения оболочки, что позволяет точно локализовать всасывание преднизона в кишечнике. Интересным способом модификации высвобождения АФС является комбинация гидрофильных и гидрофобных полимеров в составе прессованного покрытия. Этилцеллюлоза формирует нерастворимый каркас оболочки, через поры которого высвобождается АФС. Для достижения отсроченного высвобождения её комбинируют с гидрофильной гидроксипропилметилцеллюлозой (ГПМЦ), молекулы которой, набухая, образуют гель в порах нерастворимой матрицы, что задерживает движение молекул АФС. Этот подход использован при разработке таблеток с отсроченным высвобождением ингибитора протонной помпы лансопризола: сочетание этилцеллюлозы с ГПМЦ средней и низкой вязкости (марки Е15 и К4М) в составе прессованного покрытия обеспечивало доставку лансопризола в кишечник и препятствовало его разрушению в кислой среде желудка (Prasanthi D. Et al., 2019). В исследовании (Rane A.V. et al., 2009) подобный подход был использован для создания таблеток кетопрофена с модифицированным высвобождением, которое достигалось за счет комбинации этилцеллюлозы и натрия альгината в составе оболочки. В этом случае натрия альгинат, набухая, разрывал гидрофобную матрицу, что обеспечивало быстрое высвобождение кетопрофена через 6 часов задержки. Данная система может быть рекомендована в терапии ревматоидного артрита, что позволяет уменьшить боль и утреннюю скованность пациентов при приёме таблетки перед сном (Rane A.V. et al., 2009; Hersh E.V., Dionne R.A., 2017).

Заключение. Прессованные покрытия могут являться механическим барьером, защищающим таблетку, носителем АФС в комбинированных препаратах, а также способом модификации высвобождения АФС. Рациональный выбор комбинаций вспомогательных веществ в составе покрытия позволяет создавать ЛФ с заданными свойствами.

Литература

1. Ashok Ch., Bhaskar V., Prakash R. Design and Characterization of Press Coated Tablets of Aceclofenac for Pulsatile Delivery. *International journal of Pharmaceutical sciences and research*. 2015;6(7):2902-2912. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(7).2902-12.
2. Bose S., Bogner. R.H. Solventless Pharmaceutical Coating Processes: A Review. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2007;12(2):115–131. DOI: 10.1080/10837450701212479.
3. Gaikwad S.S., Kshirsagar S.J. Review on Tablet in Tablet techniques. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2020;9(1). DOI: 10.1186/s43088-019-0027-7.
4. Geoclock[®] technology by Skyepharma. Available at: <https://www.skyepharma.com/geoclock/> (дата обращения – 28.05.2021).
5. Hales D., Dumitraşcu D. L., Tomuţa, I., Briciu C., Muntean D.M., Tefas L. R., Vlase L. Formulation, preparation and in vitro – in vivo evaluation of compression-coated tablets for the colonic-specific release of ketoprofen. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;53(4). DOI: 10.1590/s2175-97902017000400266.
6. Hersh E.V., Dionne R.A. Nonopioid Analgesics. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. 2017;257–275. DOI:10.1016/b978-0-323-39307-2.00017-5.
7. Liu T., Shi Y., Li J., Jiang W., Yin T., Zhang Y., He H., Wang Y., Tang X. Nifedipine di-matrix depot tablets prepared by compression coating for obtaining zero-order release. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2018;44(9):1426-1433. DOI: 10.1080/03639045.2018.1458859.
8. LODOTRA[®] modified release tablets. Available at: <https://gp2u.com.au/static/pdf/L/LODOTRA-PI.pdf> (дата обращения 28.05.2021).
9. Malik D., Singh I. Formulation and evaluation of press coated tablets of esomeprazole for colonic delivery. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2012;6(4):252-258. DOI:10.4103/0973-8398.107560.
10. Mannan A., Rao K.P. Novel Chewable Tablet-In-Tablet Dosage Form of Orlistat and Venlafaxine Hydrochloride; Development and Evaluation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5(03):091-097. DOI: 10.7324/JAPS.2015.50315.
11. Ozeki Y., Ando M., Watanabe Y., Danjo K. Evaluation of novel one-step dry-coated tablets as a platform for delayed-release tablets. *Journal of Controlled Release*. 2004;95(1):51–60. DOI:10.1016/j.jconrel.2003.10.028.
12. Patil R., Bobade D., Sawant L., Marathe P. Emerging Trends in Compression Coated Tablet Dosage Forms: A Review. *International journal of Pharmaceutical sciences and research*. 2016;7(3): 930-938. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(3).930-38.

13. Picart L., Mazel V., Moulin A., Tchoreloff P. Effect of the compaction parameters on the final structure and properties of a press-coated tablet (Tab-in-Tab): Experimental and numerical study of the influence of core and shell dimensions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;596(1). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120260.
14. Prasanthi D., Prashanti S., Meghana G. Formulation and evaluation of press coated tablets of lansoprazole. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019;11(4):49-56. DOI:10.22159/ijap.2019v11i4.32617.
15. Rane A.B., Gattani S.G., Kadam V.D., Tekade, A.R. Formulation and Evaluation of Press Coated Tablets for Pulsatile Drug Delivery Using Hydrophilic and Hydrophobic Polymers. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 2009;57(11):1213–1217. DOI:10.1248/cpb.57.1213.
16. Shah R., Patel S., Patel H., Pandey S., Shah S. Formulation development of Carvedilol compression coated tablet. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2011;18(4):1–10. DOI: 10.3109/10837450.2011.598167.

РАЗРАБОТКА И ТРАНСФЕР ТЕХНОЛОГИИ ПРЕПАРАТА
«ТРИМЕБУТИН ТАБЛЕТКИ 100 МГ, 200 МГ»

А.С. Рыболов¹, В.В. Шейкин², М.С. Коровин^{2*}, В.С. Чучалин²

¹ООО «Гротекс», г. Санкт-Петербург, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

*e-mail: korovin.ms@ssmu.ru

Ключевые слова: тримебутин, разработка технологии, фармацевтико-технологические испытания.

Введение. Освоение производства нового лекарственного препарата, равно как и перенос такого производства с одной производственной площадки на другую, предполагает проведение работ, обеспечивающих качество, безопасность и эффективность такого продукта, выпускаемого в условиях конкретного фармацевтического предприятия. При этом требует специального рассмотрения характеристики лекарственного препарата и параметры технологических процессов, которые могут быть затронуты в процессе отработки его состава и технологии (Береговых В.В., Спицкий О.Р., 2013). С учетом этих требований целесообразным представляется проведение работ по экспериментальному обоснованию состава, технологии производства нового лекарственного препарата и изучению его стабильности.

Цель. Разработка и трансфер технологии препарата «Тримебутин таблетки 100 мг, 200 мг».

Материалы и методы. Научно-исследовательская работа (НИР) направлена на подбор вспомогательных веществ и разработку технологии лекарственного препарата «Тримебутин, таблетки 100 мг, 200 мг». Референтным лекарственным препаратом является «Тримедат» компании Валента Фарм, Россия (ООО «Гротекс»). В качестве объекта исследования использовали образцы фармацевтической субстанции тримебутина малеата производства MOENS Katalana, Испания и East-Asia и вспомогательные вещества, предоставляемые ООО «Гротекс». Физико-химические и технологические свойства субстанции и порошков, определяющих поведение материала в процессе его таблетирования, изучали путем проведения фармацевтико-технологических испытаний образцов материала по методикам, регламентированным Государственной фармакопеей РФ XIV издания: оценивали форму и размер частиц, сыпучесть, угол естественного откоса, насыпную плотность. В работе использовали приборы и оборудование, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Приборы и оборудование, использованные в работе

№ п/п	Наименование, модель	Производитель, страна
1	Весы электронные HL-400	AND, Япония
2	Весы электронные HL-4000	AND, Япония
3	Весы Электронные HR200	AND, Япония
4	Микроскоп медицинский "Биомед-3"	Биомед, Россия
5	Электронный тестер истираемости таблеток, Erweka TAR 120	Erweka, Германия
6	Электронный тестер контроля распада таблеток Erweka ZT 222	Erweka, Германия
7	Электронный тестер насыпной плотности гранулята в компл. со стеклян. цилиндром 1, Erweka SVM 101	Erweka, Германия
8	Электронный тестер определения прочности таблеток, Erweka ТВН 125	Erweka, Германия
9	Электронный тестер сыпучести гранулята и порошков Erweka GTL	Erweka, Германия
10	Вибрационная воронка ВП-12А	Мариупольский завод, СССР
11	Шейкер с платформой IRS 4000i control	ИКА, Германия
12	Таблеточный пресс ТП-1	ООО «Минипресс», Белоруссия

Результаты

Разработка состава и технологии таблеток тримебутина малеата. В связи с плохими реологическими характеристиками субстанции тримебутина малеата необходимо было подобрать и обосновать выбор вспомогательных веществ, марку лактозы, и крахмала, так данные вещества входят в референтный препарат в качестве наполнителей. Для выполнения этой задачи мы изучили влияние различных марок лактозы, МКЦ крахмала, связующего компонента, состава опудривающей смеси на технологические характеристики таблетлируемой массы и на показатели качества готовых таблеток. Состав разработанных таблеточных смесей представлен в таблице 2.

Таблеточную массу готовили путем смешивания предварительно просеянных порошков, для тримебутина малеата была использована стадия измельчения. Порошки перемешивали с помощью смесителя (химический стакан Simax, Чехия). Сначала в течение 5 минут перемешивали тримебутина малеат, крахмал и лактозу моногидрат. К полученной массе добавляли тальк, кремния диоксид коллоидный и магния стеарат и перемешивали полученную массу в течение 20 минут. Смесь просеивали через стальное сито с диаметром отверстий 0,3 мм (Экрос, Россия). Для процесса влажной грануляции в качестве связующего раствора использовали раствор коллидона К-30 различных концентраций. Полученные таблеточные массы оценивали по показателю сыпучести и угол откоса. Полученные таблеточные массы делили на две части, из одной части получали Тримебутин таблетки 100 мг (круглые двояковыпуклые диаметр 8 мм, средняя масса 103 мг), из другой части получали Тримебутин таблетки 200 мг (круглые двояковыпуклые, диаметр 11 мм, средняя масса 206 мг). Полученные таблетки оценивали по показателям внешний вид, средняя масса, прочность на раздавливание, прочность на истирание, распадаемость. На основании сопоставления полученных данных следует, что лучшие значения показателей качества обеспечили смеси, полученные влажным гранулированием с использованием 5 % раствора коллидона К-30, МКЦ марки 102, крахмала марки Starch 1500, и кальция стеарата. Использование в качестве наполнителя лактозы нерационально, поскольку при этом наблюдалось зависание и слеживание таблеточной массы в воронке таблеточного пресса, применение кальция стеарата вместо магния стеарата позволило получить таблетки с надлежащим внешним видом без сколов и заливок.

Таблица 2. Составы таблеточной смеси тримебутина малеата (на 100,0 г смеси)

Вещество	Номер прописи				
	1	2	3	4	5
Тримебутина малеат	50	50	50	50	50
Микрокристаллическая целлюлоза 102_JRS Vivapur			35	35	35
Крахмал Meritena		20	20		
Крахмал Starch 1500	10			20	20
Лактоза моногидрат, SuperTab 14SD	20				
Лактоза моногидрат, SuperTab 30GR	35	35			
Коллидон 30	2	2	2	2	
Тальк	1	1	1	1	1
Аэросил 300 (Кремния диоксид)	1	1	1	1	1
Магния стеарат	1	1			
Кальция стеарат			1	1	1

Наработка образцов Тримебутин таблеток 100 мг и 200 мг. На следующем этапе проводили трансфер технологии и наработку образцов Тримебутин таблеток 100 мг и 200 мг для оценки стабильности препарата, определения сроков его хранения. В процессе наработки образцов также устанавливались отдельные параметры технологического процесса для оформления лабораторного регламента. Таблетки получали в количестве 5000 штук, по предложенной ранее технологии, на основе МКЦ 102, крахмала Starch 1500, талька, аэросила 300, кальция стеарата.

Заключение. Изучены физико-химические и технологические свойства субстанции тримебутина малеата. Установлено, что за счет формы и фракционного состава частиц исследованные субстанции характеризуются неприемлемыми для прямого прессования реологическими свойствами: плохой сыпучестью и низкой насыпной плотностью и способны к комкованию. Для формирования таблетлируемой смеси в качестве наполнителя наиболее рационально использовать МКЦ марки 102, крахмал Starch 1500, кальция стеарат в смеси с аэросилом и тальком. Указанные наполнители позволяют получить таблетки методом влажной грануляции. Нарботаны Тримебутин таблетки 100 мг 200 мг на площадке ООО «Гротекс» для трансфера технологии и изучения сроков хранения на основе МКЦ марки 102, крахмала Starch 1500, кальция стеарата в смеси с аэросилом и тальком. Полученные таблетки удовлетворяют требованиям ГФ XIV издания и подтверждают, что разработанный состав на базе СибГМУ позволяет получать качественный продукт при переносе технологии на производственную площадку.

Литература

1. Береговых В.В., Спицкий О.Р. Перенос технологий при создании производства лекарственного средства. *Вестник РАМН*. 2013;68(12):49-57.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. В 4 томах. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb/pharmacopea.php> (дата обращения 14.07.2021 г.).

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ 4,4'-(ПРОПАНДИАМИДО)ДИБЕНЗОАТА НАТРИЯ ИЗ ПЕРОРАЛЬНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

Ю.М. Коцур*, Е.В. Флисюк

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,

г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: uliya.kocur@spcru.ru

Ключевые слова: пролонгированное высвобождение, кинетика высвобождения, матричные таблетки

Введение. Одним из ключевых параметров при фармацевтической разработке лекарственных форм (ЛФ) с модифицированным, в частности, пролонгированным действием, является изучение скорости высвобождения действующего вещества (ДВ) в среду растворения. Данный показатель позволяет оценить время и степень высвобождения вещества в предполагаемом месте сорбции, и на основании полученных данных сделать вывод о приемлемости разработанного состава и технологии получения ЛФ. Для активной фармацевтической субстанции (АФС), 4,4'-(пропандиамидо)добензоата натрия в качестве оптимальной была выбрана ЛФ в виде матричных таблеток с пролонгированным действием. Данная АФС разработана для применения в терапии хронических заболеваний печени, таких как неалкогольная жировая болезнь печени, стеатогепатит и т.д., среди взрослого населения. Благодаря сходством с сукцинатом, АФС может препятствовать избыточному сукцинированию регуляторных белков, наблюдающемуся при широком спектре метаболических заболеваний (ожирение, метаболический синдром, сахарный диабет, жировая болезнь печени). В результате уменьшается повреждающее действие сукцината, реализующееся как через неспецифическое сукцинирование, так и через специфические сукцинатные рецепторы (Радько С.В. и др., 2017). Преимуществами выбранной ЛФ для доставки 4,4'-(пропандиамидо)добензоата натрия является увеличение комплаентности пациентом, уменьшение концентрационно зависимых побочных эффектов за счет нивелирования пиковых концентраций АФС в крови, а также возможность доставки АФС в кишечник, где происходит более быстрое ее растворение, за счет чего возможно увеличение биодоступности препарата (Joshi A., Dashora K., 2014).

Цель. Изучить кинетику высвобождения АФС из систем доставки, содержащих различные полимеры в качестве матрицеобразующих и выбор состава, наиболее полно отвечающий требованиям растворения.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования выступали матричные таблетки на основе 4,4'-(пропандиамидо)добензоата натрия массой 360 мг и диаметром 10 мм. Составы представлены в таблице 1. Изучение кинетики высвобождения проводилось на основании требований, изложенных в ГФ РФ XIV изд. ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» (2018). В качестве среды растворения использовали: для первых 2 ч – 0,01М раствор кислоты хлористоводородной, для последующих 10 ч – фосфатный буферный раствор с рН 6,8. Объем среды составлял 1000 мл, температура $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. По истечении двух часов испытания производили полную замену 0,01М раствора кислоты хлористоводородной на фосфатный буферный раствор с рН 6,8. Для осуществления испытания использовали аппарат I «Вращающаяся корзинка» со скоростью вращения 100 об/мин. Для установления кинетики высвобождения были выбраны следующие интервалы отбора проб: 2-4-6-8-10-12 ч. Отбор проб производили с восполнением среды. Количество перешедшего в среду растворения вещества определяли спектрофотометрически на приборе СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия). Согласно ГФ РФ, XIV изд. (2018) для таблеток пролонгированного действия устанавливают не менее трех временных интервалов для нормы растворения. Исходя из данного требования, а также для достижения необходимого терапевтического эффекта, для исследуемых ЛФ были установлены следующие нормы: через 2 часа должно высвободиться не менее 20% ДВ, через 6 часов – не менее 50, но не более 70%, через 12 часов – не менее 90% ДВ. Данное требование являлось предварительным и использовалось для определения оптимальных составов ЛФ.

Результаты. В ходе работы была изучена кинетика высвобождения АФС 4,4'-(пропандиамидо)добензоата натрия из матричных таблеток пролонгированного действия. Результаты представлены графически на рисунке 1.

Установлено, что наиболее полное высвобождение в течение 12 часов обеспечивают составы, содержащие в качестве матрицеобразующих полимеров Methocel K4M и Eudragit L100-55, кроме того, высвобождение АФС из указанных таблеток является наиболее равномерным, что позволит избежать появления пиковых концентраций препарата в крови. Таблетки, содержащие Protanal PH 6160, обеспечивают минимальное высвобождение препарата в 0,01М растворе соляной кислоты, однако на 12 часу испытаний высвобождение АФС составило около 63%, что может негативно сказаться на эффективности препарата. Составы, содержащие Kollicoat IR, Kollidon SR, Kollicoat MAE 100P также обладают неудовлетворительной кинетикой высвобождения.

Заключение. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что для создания систем доставки с пролонгированным действием на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, наиболее подходящими являются такие матрицеобразующие полимеры, как: Methocel K4M и Eudragit L100-55, позволяющие добиться равномерного и полного высвобождения АФС в течение 12 часов. Полученные в исследовании данные будут использованы для оптимизации составов ЛФ, а также для разработки методики теста «Растворение» для включения в нормативный документ на разработанную ЛФ.

Таблица 1. Составы матричных таблеток

Компонент, %	Состав 1	Состав 2	Состав 3	Состав 4	Состав 5	Состав 6
4,4'-(пропандиамидо)-дibenзоат натрия	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Methocel K4M	27,78					
SuperTab 30GR	21,22	13,00	24,00	1,78	2,90	1,00
Kollidon SR		36,00				
Kollicoat IR			25,00			
Kollicoat MAE 100P				47,22		
Eudragit L100-55					46,10	
Protanal PH6160						48,00
Стеарат магния	1,00	1,00	1,00	1,00	1,0	1,0
Итого	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

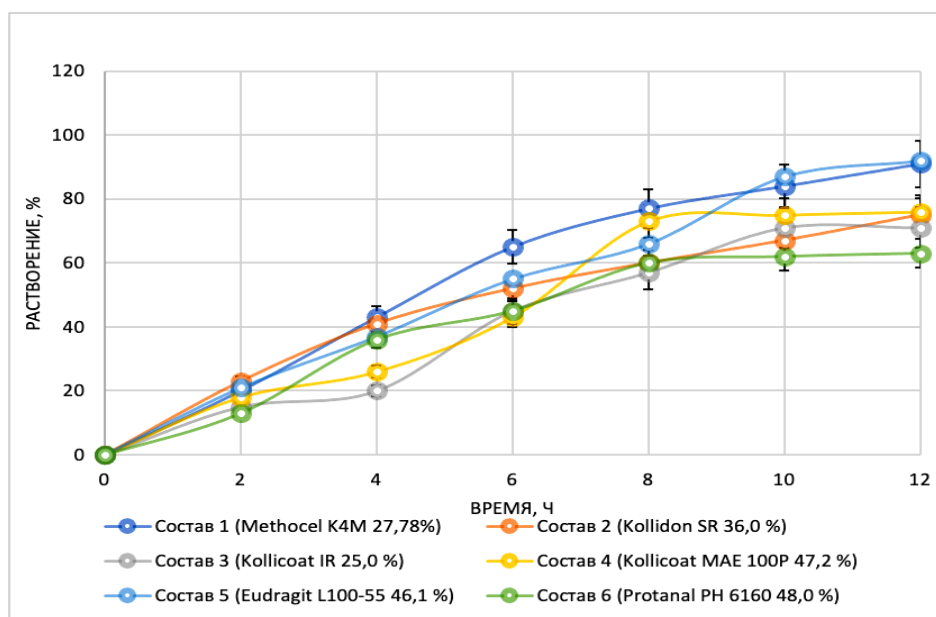


Рис. 1. Кинетика высвобождения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия из таблеток пролонгированного действия

Литература

1. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» [Электронное издание]. Режим доступа на: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
2. Радько С.В., Болотина Ю.Д., Поверяева А.М. Оценка влияния 4,4'' – (пропандиамидо)дibenзоата натрия на физическую работоспособность мышей к экспериментальным стеатозом печени. Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». СПб: СПХФУ; 2017: 29-32.
3. Joshi A., Dashora K. Modified release drug delivery system and its significance. *Current research in biological and pharmaceutical sciences*. 2014;3(5):1-6.

МЕТОД СФЕРИЧЕСКИХ ДИАГРАММ КАК ИНСТРУМЕНТ ОПТИМИЗАЦИИ ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СУХИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

П.Г. Мизина¹, А.С. Гуленков^{1*}, Е.О. Бахрушина², В.М. Аймасова²

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, г. Москва, Россия*

² *ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Министрства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), г. Москва, Россия*
e-mail: gulenkov@vilarnii.ru

Ключевые слова: метод сферических диаграмм, SeDeM expert system, прямое прессование, direct compression, твёрдые лекарственные формы, solid dosage forms.

Введение. Сухие растительные экстракты часто используются в качестве активной фармацевтической субстанции (АФС) для получения дозированных лекарственных форм, таких как таблетки, капсулы, суппозитории и др. (Семкина О.А. и др., 2018; Качалина Т.В. и др., 2020). Особое внимание заслуживают твёрдые лекарственные формы (ТЛФ), как наиболее широко представленные во многих фармакотерапевтических группах. АФС используется в чистом виде или в комбинации со вспомогательными веществами, которые могут обеспечить получение ТЛФ прямым прессованием (Мизина П.Г., Гуленков А.С., 2018).

Цель. Выявить факторы сыпучего материала сухих растительных экстрактов, требующие корректировки для получения ТЛФ путём прямого прессования.

Материалы и методы.

Материалы:

- сухой экстракт лопуха (корень) – дата производства: 04.12.2020 (ООО «Казанский завод экстракт», Россия);
- сухой экстракт цикория (корень) – дата производства: 18.10.2020 (ООО «Казанский завод экстракт», Россия);
- сухой экстракт одуванчика (корень) – дата производства: 11.11.2020 (ООО «Казанский завод экстракт», Россия).

Методы: метод сферических диаграмм заключается в экспериментальной оценке 12 технологических показателей сыпучего материала, их преобразовании в радиусы сферических диаграмм (SeDeM) со значением от 0 до 10, по которым рассчитывали 5 факторов, параметрический индекс (IP), параметрический индекс профиля (IPP) и индекс хорошего прессования (GCI), характеризующие пригодность сыпучего материала для прямого прессования (Suñé Negre J.M. et al., 2005).

Объёмный фактор (Dimension) рассчитывали, как среднее значений радиусов SeDeM диаграмм насыпной плотности до уплотнения (далее Da) и после уплотнения (далее Dc), которые определяли в соответствии с ОФС 1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» на тестере насыпной плотности SWM 102 (Erweka, Германия).

Фактор сжимаемости (Compressibility) рассчитывали, как среднее значений радиусов SeDeM диаграмм индекса Карра (далее – IC), межчастичной пористости (далее Ie) и прочности таблеток, полученных из сыпучего материала, на раздавливание (далее – Icd) (проводили по ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» на тестере прочности ТВН 325 (Erweka, Германия)).

Фактор сыпучести (Flowability/Powder Flow) рассчитывали, как среднее значений радиусов SeDeM диаграмм индекса Хауснера (далее IH), сыпучести (далее – t) и угла естественного откоса (далее – α), которые определяли в соответствии с ОФС 1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» на электронном тестере для измерения сыпучести GTB (Erweka, Германия) и 2.9.36. Powder Flow (European Pharmacopoeia - 8th edition).

Фактор устойчивости (Lubricity/Stability) рассчитывали, как среднее значений радиусов SeDeM диаграмм влажности (далее – %LoD) (определяли на влагомере весомом ML-50 (A&D, Япония)) и гигроскопичности (далее – %H), которую определяли в эксикаторе при температуре (20±2) °С и относительной влажности (75±1) % (термогигрометр ИВА-6Н, НПК «Микрофор», Россия) создаваемой насыщенным раствором натрия хлорида в течение 24 часов (Dai S. Et al., 2018; ГОСТ 29244-91).

Фактор дозирования (Lubricity/Dosage) рассчитывали, как среднее значений радиусов SeDeM диаграмм количества частиц менее 50 мкм (далее – %Pf) и индекса гомогенности (далее – IӨ) [5].

Результаты. Результаты фармацевтико-технологического исследования сухих экстрактов корней лопуха, одуванчика и цикория представлены в таблице 1 и на рисунке. Полученные результаты свидетельствуют, что индекс хорошего прессования (GCI) для всех изученных сухих растительных экстрактов менее 5, что характеризует сыпучий материал не пригодным для прямого прессования, однако значения близки к минимальным рекомендуемым для прямого прессования, что позволяет производить корректировку фармацевтико-технологических показателей посредством введения вспомогательных веществ. Для оптимизации выбора эксципиентов рассчитали факторы сыпучего материала (табл. 2).

Наименьшие значения, для всех изученных сухих экстрактов, установили для фактора сжимаемости, что ориентирует дальнейшие исследования на выбор вспомогательных веществ, корректирующих межчастичную пористость, индекс Карра и прочность таблеток на раздавливание.

Заключение. Для получения ТЛФ с сухими растительными экстрактами корней лопуха, одуванчика и цикория в качестве АФС необходимо осуществить подбор вспомогательных веществ, корректирующих фактор сжимаемости сыпучего материала.

Таблица 1. Значения радиусов SeDeM диаграмм сухих экстрактов

ФТП*	Радиусы SeDeM диаграмм сухих экстрактов		
	Лопуха	Одуванчика	Цикория
Da	5,62	5,94	5,70
Dc	6,61	6,24	5,94
Ie	2,22	0,76	0,59
IC	3,00	1,08	0,80
Icd	6,18	3,62	5,54
ИH	9,12	9,72	9,79
a	1,85	2,69	3,76
t	5,95	4,14	7,67
%LOD	5,45	5,80	5,95
%H	3,77	3,90	3,67
%Pf	5,77	7,57	7,90
IO	3,98	4,11	5,54
IP	0,50	0,42	0,67
IPP	4,96	4,63	5,24
GCI	4,72	4,41	4,99

*ФТП – фармацевтико-технологические показатели

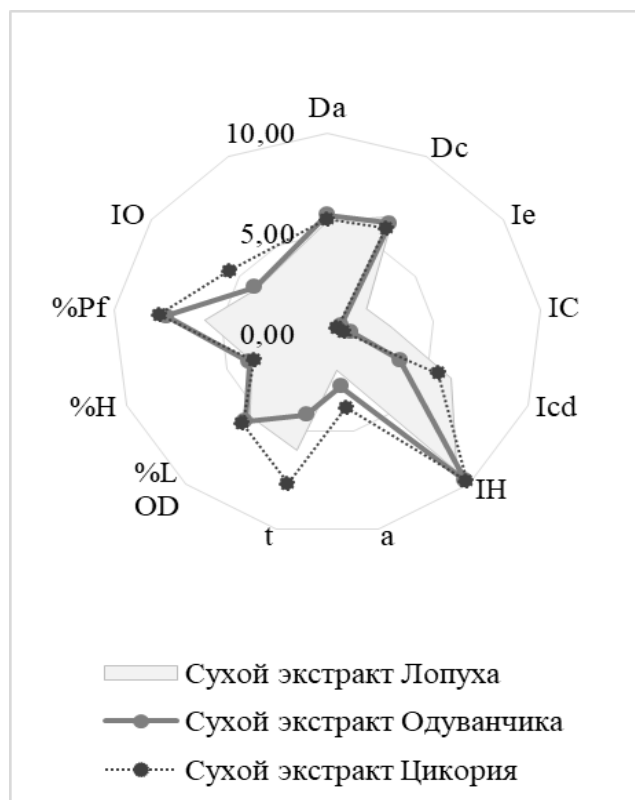


Рис. SeDeM диаграмма сухих экстрактов корней лопуха, одуванчика и цикория

Таблица 2. Факторы SeDeM диаграмм сухих экстрактов

Сухой экстракт корней	Объемный фактор	Фактор сжимаемости	Фактор сыпучести	Фактор устойчивости	Фактор дозирования
Лопух	6,12	3,80	5,64	4,61	4,87
Одуванчик	6,09	1,82	5,51	4,85	5,84
Цикорий	5,82	2,31	7,07	4,81	6,72

Литература

- ГОСТ 29244-91 (ИСО 483-88) Пластмассы. Небольшие контейнеры для кондиционирования и испытания с использованием водных растворов для поддержания постоянного значения относительной влажности.
- Качалина Т.В., Малышева Н.А., Семкина О.А., Джавахян М.А. Разработка состава и технологии капсул, содержащих винограда культурного листьев красных экстракт сухой. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2020;23(8):19-25 DOI: 10.29296/25877313-2020-08-03.
- Мизина П.Г., Гуленков А.С. Таблетки для рассасывания: достижения и перспективы (обзор). *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2018;21(2):3-11. DOI: 10.29296/25877313-2018-02-01.
- Семкина О.А., Качалина Т.В., Малышева Н.А., Сагарадзе В.А. Технологические аспекты разработки таблеток сухого экстракта лапчатки белой. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2018;21(12):9-14 DOI: 10.29296/25877313-2018-12-02.
- Dai S., Xu B., Shi G., Liua J., Zhangc Z., Shiab X., Qiaoab Y. SeDeM expert system for directly compressed tablet formulation: A review and new perspectives. *Powder Technology*. 2018;342:517-527 DOI: 10.1016/j.powtec.2018.10.027.
- Suñé Negre J.M., Roig Carreras M., Fuster García R., Hernández Pérez C., Ruhí Roura R., García Montoya E., Miñarro Carmona M., Pérez Lozano P., Ticó Grau J.R. Nueva metodología de preformulación galénica para la caracterización de sustancias en relación a su viabilidad para la compresión: Diagrama SeDeM. *Cienc tecnol pharm*. 2005;15(3):125-136.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ТЕРАПИИ ОСТЕОАРТРОЗА

У.В. Ногаева*, Ю.М. Коцур, Е.В. Флисюк

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»

Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: uljana.nogaeva@pharminnotech.com

Ключевые слова: реологические свойства, мягкие лекарственные формы, вязкость.

Введение. Структурно-механические характеристики мягких лекарственных форм во многом определяют свойства данных терапевтических систем, в том числе биологическую доступность и вопрос об удобстве применения. Для гелей, как для упруго-пластичных и вязко-пластичных масс, наиболее часто определяют такую характеристику, как динамическая вязкость. Вязкость – свойство текучих тел оказывать сопротивление перемещению одной их части относительно другой. Динамическая вязкость является характеристикой системы в процессе движения: относительное перемещение слоев под действием прилагаемых извне усилий. Динамическая вязкость – это приходящаяся на единицу поверхности тангенциальная сила, называемая также напряжением сдвига, которую необходимо приложить для того, чтобы переместить слой жидкости площадью 1 м^2 со скоростью 1 м/с , находящийся на расстоянии 1 м относительно другого слоя, параллельно плоскости скольжения (ОФС 1.2.1.0015.15). Для определения динамической вязкости, как правило, используют ротационные вискозиметры Брукфилда, «Реотест», вискозиметр Гепплера (с падающим шариком). Изучение структурно-механических свойств гелей, обусловленных внутренней структурой упруго-пластичных материалов, при отсутствии механического перемещения слоев представляет интерес при разработке состава и технологии геля и имеет практическое и теоретическое значение для: определения консистенции, густоты, предела текучести материала в состоянии покоя, например, при хранении или технологической экспозиции; - определения остаточного сопротивления материалов (консистенции, густоты, предела текучести) после некоторого разрушения структуры, например, в процессе применения или технологической обработки; - изучения параметров релаксации напряжений (скорости и степени изменения) в материале и тиксотропного восстановления структуры после приложения определенной нагрузки (Вайнштейн В.А., 2017).

Цель. Изучить структурно-механические свойства разработанного геля, для их сопоставления с характеристиками референтного средства, а также прогнозирования удобства применения нового препарата для пациентов.

Материалы и методы. Объектом исследования стал разработанный на базе GMP тренинг-центра, комбинированный противовоспалительный гель на основе альгината натрия. В качестве референтного препарата был взят зарегистрированный на рынке карбомерный гель, содержащий 1 % мелоксикама. Динамическую вязкость измеряли на ротационном вискозиметре Anton Paar DV-2P, Австрия. Сопротивление структуры гелей определяли на специальном приборе, сконструированном в Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете под руководством профессора доктора фармацевтических наук В.А. Вайнштейна (Вайнштейн В.А., 2017).

Результаты. Анализ полученных данных показал, что разработанный гель имеет меньшее напряжение сопротивления и предел текучести, что связано с природой используемого гелеобразователя (альгинат натрия в разработанном геле, карбомер в геле сравнения). Кроме того, разработанный гель характеризовался меньшим периодом полурелаксации – 11 секунд, в то время как для референт-препарата он составляет 17 секунд. Изученные свойства полученного средства позволяют сделать вывод о том, что гель обладает более мягкой консистенцией, чем референтный препарат. Разработанный гель способен легче распределяться на коже, не вызывая при этом затруднений при извлечении из первичной упаковки. На рисунке 1 для разработанного и референтного гелей показана зависимость напряжения сопротивления структуры от логарифма времени при введённом тестере.

При исследовании динамической вязкости был использован шпиндель L4. Измерение проведено в диапазоне скоростей сдвига от 50 до $0,5 \text{ с}^{-1}$ и от $0,5$ до 50 с^{-1} при температуре 20°C . Для каждого состава в диапазоне скоростей сдвига находилось значение крутящего момента в пределах от 10 до 100%. Результаты определения представлены на рисунке 2.

При уменьшении скорости вращения шпинделя вязкость обоих гелей последовательно увеличивается, а затем уменьшается при увеличении числа оборотов в минуту. Данный эффект говорит о наличии структуры в гелях и о способности структуры восстанавливаться после снятия напряжений. Вязкость референтного геля значительно увеличивается при уменьшении скорости сдвига, что свидетельствует о более плотной структуре материала, которая определяется типом выбранного гелеобразователя.

Заключение. На этапе фармацевтической разработки комбинированного противовоспалительного средства для терапии остеоартроза проведена оценка реологических свойств полученного геля по сравнению с препаратом сравнения, содержащим 1 % мелоксикама. Определено, что структурно-механические свойства нового состава будут обеспечивать удобство применения: гель легко распределяется на поверхности кожи, устойчив при механическом воздействии, а также легко извлекается из первичной упаковки.

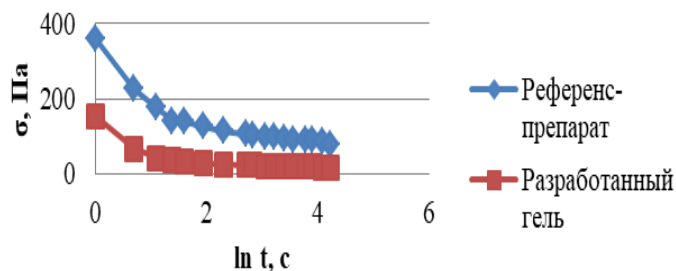


Рис. 1. Зависимость напряжения сопротивления структуры гелей от логарифма времени (по оси ординат – напряжение в Па, по оси абсцисс – $\ln t$, с.)

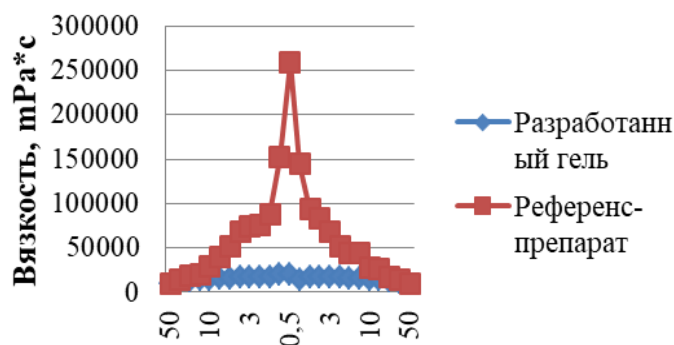


Рис. 2. Зависимость динамической вязкости от скорости вращения шпинделя при постоянной температуре 20° С

Литература

1. Вайнштейн В.А. Исследование структурно-механических свойств мягких лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):70-78.
2. Государственная фармакопея. XIV изд. ОФС 1.2.1.0015.15. Вязкость. 2018:595- 609.

ДИЗАЙН РАЗРАБОТКИ ФОРМУЛЯЦИИ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ ЦИТИКОЛИНА И МЕМАНТИНА

Д.Х. Салахетдинов^{1,2*}, Б.Б. Сысуев³

¹НоваМедика Иннотех, г. Москва, Россия

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск, Россия

³ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), г. Москва, Россия

e-mail: erabahche04@gmail.com

Ключевые слова: мемантин, цитиколин, модифицированное высвобождение, фармацевтическая разработка.

Введение. Наиболее доказанным подходом к медикаментозной терапии когнитивных нарушений является применение лекарственных средств, воздействующих на холинергическую и глутаматергическую системы. Базисная терапия деменции предусматривает использование антагонистов NMDA-рецепторов, например, мемантина, хорошо зарекомендовавшего себя в терапии хронической цереброваскулярной недостаточности и нейродегенеративных процессов. Одним из дополнительных препаратов является цитиколин. В связи с недостаточной эффективностью отдельной терапии амилоидной либо сосудистой патологий, высказывается мнение о перспективности комбинированной фармакотерапии когнитивных нарушений - разработки лекарственных форм, содержащих комбинации мемантина и цитиколина с модифицированным высвобождением (WHO, 2020; МЗ РФ, 2020).

Цель. Дизайн разработки формуляции с модифицированным высвобождением цитиколина и мемантина.

Материалы и методы. Работа проводилась в соответствии с директивами ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development, ICH guideline Q9 on quality risk management, а также с данных научной и справочной литературы (EMA/CHMP, 2021).

Результаты. Разрабатываемый продукт относится к нейропротективным средствам и является комбинацией известных и зарегистрированных в России действующих веществ в новой лекарственной

форме для однократного приема в день, что позволит пациентам соблюдать комплаенс. Оба компонента достаточно изучены и широко используются в качестве монопрепаратов для лечения цереброваскулярных заболеваний и слабых умеренных когнитивных расстройств, а также для лечения деменции. На российском фармацевтическом рынке не представлены таблетированные формы с модифицированным высвобождением мемантина или цитиколина.

С учетом создаваемой лекарственной формы и действующих требований к фармацевтической разработке и испытаниям комбинированных форм разработан алгоритм исследования, в котором условно можно выделить следующие этапы:

- обоснование фармакологической и клинической целесообразности предложенной фиксированной комбинации мемантина и цитиколина;
- фармацевтическая разработка (выбор оптимальной лекарственной формы и оптимальных вспомогательных веществ);
- фармакологические исследования безопасности и эффективности фиксированной комбинации: исследования острой и хронической токсичности, сравнительные фармакокинетические исследования.

На первом этапе проведен анализ данных литературы для оценки потенциальных преимуществ и учета возможных недостатков предполагаемой комбинации, подтвердивший целесообразность предложенной фиксированной комбинации мемантин+цитиколин. Начальным этапом фармацевтической разработки являлась формулировка целевого профиля комбинированного препарата мемантин+цитиколин, характеризующая качество, эффективность и безопасность с учетом пути введения (пероральный путь) и лекарственной формы (таблетки с модифицированным высвобождением). Для этого суммированы все показатели качества, предъявляемые к лекарственному препарату мемантин+цитиколин в форме таблетки с модифицированным высвобождением, включая показатели, которые были классифицированы как CQAs: количественное определение, однородность дозирования, растворение и родственные примеси, которые могут влиять на состав и/или параметры процесса, и которые необходимо определять в процессе исследования. С учётом профиля осуществлен дизайн таблеток мемантин+цитиколин с модифицированным высвобождением, предусматривающий заключение цитиколина в ядро и включение мемантина в оболочку. Далее предполагалось проведение оценки рисков влияния активных фармацевтических субстанций мемантина и цитиколина на критические показатели качества лекарственного препарата. Выявлены высокие риски для цитиколина: параметр «гигроскопичность», влияющий на количество адсорбированной воды и далее на физические свойства таблеток (несоответствие таблеток по показателям «Прочность» и «Внешний вид») и профиль высвобождения API (показатель «Растворение»). Также выявлено, что в процессе фармацевтической разработки следует контролировать такие параметры как «химическая стабильность» (примеси и количественное определение) и «сыпучесть» (может влиять на показатели «количественное определение» и «однородность дозирования»). Для субстанции мемантина показатель «содержание влаги» характеризуется высокими рисками. Данные риски обуславливают необходимость изучения поведения API в условиях повышенной температуры и влажности. Параметр «химическая стабильность» может влиять на количественное определение (снижение показателя и/или рост примесей), однородность дозирования, растворение и родственные примеси. Следует отметить, что разработка многокомпонентного препарата предусматривает химическую оценку совместимости API, что являлось одним из фрагментов исследований по разработке состава. Одним из этапов предполагался выбор вспомогательных компонентов с учетом анализа свойств API, оценка рисков влияния API и вспомогательных веществ на критические показатели качества таблеток, а также экспериментальная оценка совместимости API и вспомогательных веществ. Рассматривалась также первоначальная оценка рисков производственного процесса, позволившая выявить параметры, влияющие на качество итогового продукта. Так, при использовании технологии влажной грануляции на стадии сушки параметры процесса могут оказывать влияние на рост примесей посредством воздействия горячим воздухом (температура входящего воздуха и длительность процесса могут оказывать влияние на рост примесей) на стадии калибровки гранулята необходимо учитывать фракционный состав, влияющий на однородность дозирования. На стадии смешивания и опудривания гранулята перемешивание компонентов может влиять на параметры однородности дозирования и профиль высвобождения API. Параметры процесса таблетирования - скорость подачи смеси и скорость таблетирования, могут привести к получению таблеток, выходящих за пределы спецификации. Также изменение параметров процесса таблетирования могут привести к получению таблеток различной твердости, что будет влиять на профиль высвобождения API. Параметры процесса нанесения оболочки могут влиять на рост примесей посредством длительного воздействия горячего воздуха (температура входящего воздуха и длительность процесса могут оказывать влияние на рост примесей) в течение процесса. Проведены исследования по снижению возможных рисков и выбору оптимальной технологии. Кроме того, проведена оценка стабильности после предварительной разработки критериев оценки качества и установлен срок годности разрабатываемого препарата. Определена острая и хроническая токсичность и получены данные, подтверждающие безопасность разрабатываемого лекарственного препарата в исследованиях *in vivo*. Сравнительное фармакокинетическое изучение разработанного комбинированного лекарственного препарата позволили предварительно охарактеризовать

профиль высвобождения и получить его основные фармакокинетические характеристики для проведения дальнейших исследований.

Заключение. Таким образом, представлен дизайн создания формуляции с модифицированным высвобождением цитиколина и мемантина, позволивший проводить исследования с учётом всех современных требований к процессу фармацевтической разработки лекарственных препаратов.

Литература

1. Когнитивные расстройства у лиц пожилого и старческого возраста. Клинические рекомендации МЗ РФ, 2020.
2. Guideline on clinical development of fixed combination medicinal products 2-nd revision (2017) EMA/CHMP/158268/2017. Available at: <https://www.ema.europa.eu> (дата обращения - 22.06.2021).
3. ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. Available at: <https://www.ema.europa.eu> дата обращения - 22.06.2021).
4. ICH guideline Q9 on quality risk management. Available at: <https://www.ema.europa.eu> (дата обращения - 22.06.2021).
5. WHO - World health organization (WHO). Dementia. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (дата обращения 21.09.2020).

РАЗРАБОТКА МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ С ФУНКЦИЕЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

В.В. Шейкин*, В.С. Чучалин

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия
«e-mail: sheikin.vv@ssmu.ru

Ключевые слова: имплантат, кальцийфосфатное покрытие, ципрофлоксацин.

Введение. Различные медицинские изделия (имплантаты, протезы, сшивающие и скрепляющие материалы) достаточно широко используются в хирургической практике и показывают высокую эффективность в восстановлении функций тех или иных органов и тканей. При этом необходимо учитывать, что при размещении любого чужеродного тела в организме повышается риск развития инфекционно-воспалительных осложнений – особенно сразу же после имплантации. Это обусловлено способностью микроорганизмов образовывать на поверхности имплантата биопленку, инкорпорированную микроорганизмами. Обеспечить эффективные концентрации антибиотиков в очаге поражения весьма проблематично из-за локальных реологических нарушений компроментированных тканей и рисков проявления побочных эффектов. Означенная проблема может быть решена путем создания медицинских изделий с функцией носителей лекарственных средств, препятствующих контаминации и последующим осложнениям (Rau J.V. et al., 2019; Sedelnikova M.B. et al., 2019).

Цель. Иммобилизация лекарственного средства (ципрофлоксацина) на поверхности медицинских изделий.

Материалы и методы. Объектом исследования служили модельные титановые пластинки площадью 1 см². Поверхность медицинских изделий, изготовленных из титанового сплава, обладает низкой адсорбционной активностью, в силу чего ее подвергали модификации – наносили кальцийфосфатное покрытие для улучшения адгезионных свойств. Модификацию поверхности выполняли в ИФПМ СО РАН. Кальцийфосфатное покрытие наносили методом микродугового оксидирования на установке MicroArc-3.0. Варьируя рабочими параметрами установки можно получить кальцийфосфатное покрытие с различной пористой структурой с контролируемыми адгезионными свойствами (Шейкин В.В., 2013; Rau J.V. et al., 2019; Sedelnikova M.B. et al., 2019). В качестве модельного лекарственного средства был выбран ципрофлоксацин, ингибирующий фермент ДНК-гиразу и синтез клеточных белков микроорганизмов. Препарат действует как на размножающиеся микроорганизмы, так и на находящиеся в фазе покоя. При этом ципрофлоксацин устойчив в водных растворах и выдерживает стерилизацию. Количественное определение ципрофлоксацина в растворе проводили методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области при длине волны 280±2 нм.

Результаты. Ципрофлоксацин наносили на пластинки по следующей технологии. Точную навеску скобок помещали в раствор с заданными температурой и концентрацией лекарственного средства. Раствор перемешивали на магнитной мешалке с скоростью (IKA RCT basic) и вакуумировали (Vacuubrand MZ 2C+AK) при разрежении – 10 миллибар в течение 5 минут для удаления воздуха и лучшего смачивания кальцийфосфатного покрытия, после чего выдерживали систему необходимое время для завершения процесса адсорбции лекарственного средства (Шаркеев Ю.П. и др., 2015; Шейкин В.В., 2013). По истечении времени пластинки сушили в конвекционном сушильном шкафу (Memmert UF-55) при температуре не более 40⁰С до постоянной массы. В готовом изделии определяли содержание ципрофлоксацина в пересчете на массу пластинки. Полученные результаты представлены в таблице 1 и свидетельствуют, что количество лекарственного средства, удерживаемого пластинкой, характеризуется линейной зависимостью с его исходной концентрацией в растворе и толщиной покрытия. Так, при изменении толщины покрытия с 35 до 45 мкм концентрация вещества в растворе увеличивается в среднем

на 25-30%. В тоже время, варьируя концентрацией исходного раствора можно контролировать дозу лекарственного вещества. Более низкая температура системы обеспечивает максимальный уровень сорбции ципрофлоксацина. Перемешивание в течение 12 часов более эффективно по сравнению с вакуумированием активизирует процесс связывания препарата на кальцийфосфатном покрытии.

Таблица 1. Содержание ципрофлоксацина в кальцийфосфатном покрытии на титановых пластинках в зависимости от условий нанесения лекарственного средства

Условия	Толщина покрытия, мкм				
	без покрытия	35	37,5	42,5	45
Концентрация ципрофлоксацина в растворе, %	Содержание ципрофлоксацина в покрытие, %				
1	0,0052	0,032	0,037	0,045	0,051
2	0,0092	0,069	0,071	0,083	0,099
Температура раствора, °С					
+ 5	0,0071	0,072	0,077	0,092	0,11
+ 20	0,0068	0,068	0,070	0,085	0,092
+ 40	0,0043	0,062	0,063	0,079	0,083
Манипуляции, экспозиция					
Вакуумирование + 12 ч	0,0086	0,031	0,037	0,042	0,043
Перемешивание + 12 ч	0,013	0,068	0,072	0,083	0,099
Перемешивание + 24 ч	0,012	0,065	0,069	0,078	0,092

Заключение. Таким образом, на примере ципрофлоксацина показана возможность регулируемой иммобилизации лекарственного средства на кальцийфосфатном покрытии медицинского изделия. В качестве факторов управления процессом иммобилизации могут быть использованы концентрация исходного раствора препарата и толщина покрытия.

Литература

1. Шаркеев Ю.П., Седельникова М.Б., Легостаева Е.В., Комарова Е.Г., Шейкин В.В., Ермаков В.В., Осипов А.Н., Шелехова Е.А. Модифицирование поверхности титановых медицинских скобок для сшивающих аппаратов методом микродугового оксидирования. *Перспективные материалы.* 2015;10:46-55.
2. Шейкин В.В. Технология иммобилизации ципрофлоксацина на модифицированной поверхности титановых имплантатов. *Современная медицина: актуальные вопросы.* 2013;24:63-68.
3. Rau J.V., Buyko E.E., Ivanov V.V. Modification of titanium surface via Ag-, Sr- and Si-containing microarc calcium phosphate coating. *Surface and Coatings Technology.* 2019;4:224-235. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2019.07.001.
4. Sedelnikova M.B., Komarova E.G., Sharkeev Y.P., Sheikin V.V., Ugodchikova A.V., Mushtovatova L.S., Karpova M.R., Litvinova L.S., Khlusov I.A. Zn-, Cu- or Ag-incorporated microarc coatings on titanium alloys: Properties and behavior in synthetic biological media. *Surface and Coatings Technology.* 2019;369(15):52-68. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2019.04.021.

ОЦЕНКА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ТАБЛЕТОК МЕТОПРОЛОЛА ТАРТРАТА

Н.Б. Шестопалова *, А.В. Пичугина, Ю.А. Фомина

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского»

Минздрава России, г. Саратов, Россия

e-mail: shestopalovanb@yandex.ru

Ключевые слова: метопролола тартрат, тест сравнительной кинетики растворения, фармацевтическая эквивалентность.

Введение. Метопролол тартрат (МТ) относится к группе селективных β -адреноблокаторов и широко применяется в кардиологической практике при артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности. В России МТ включен в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЛП) для медицинского применения (Аляутдин Р.Н., 2019) и за время использования зарекомендовал себя как эффективное и безопасное лекарственное средство (ЛС) (Остроумова О.Д., Фомина В.М., 2015). В настоящий момент на фармацевтическом рынке России

зарегистрировано 29 различных ЛП с международным непатентованным наименованием метопролол в форме выпуска таблетки, среди которых помимо оригинального ЛП («Беталок», Швеция), имеются аналоги – «дженерики», отличающиеся по технологии производства, составу вспомогательных веществ (ВВ). Для оценки биоэквивалентности актуальным является исследование кинетики растворения воспроизведенного аналога и референтного ЛП в условиях, близких к физиологическим (Духанин А.С., Шимановский Н.Л., 2014; 6. Гребёнкин Д.Ю. и др., 2016). Количество высвободившегося вещества из ЛП в нескольких временных точках позволяет получить профиль растворения, а подобие профилей ЛС различных производителей может свидетельствовать о фармацевтической эквивалентности сравниваемых препаратов.

Цель: проведение сравнительного теста кинетики растворения двух препаратов, содержащих метопролол тартрат: «Метокард®» («ПОЛЬФАРМА» АО, Польша) и Эгилок® (ЗАО "Фармацевтический завод ЭГИС", Венгрия) для оценки фармацевтической эквивалентности.

Материалы и методы. Исследование кинетики растворения таблеток с содержанием метопролола 50 мг проводили в соответствии с ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» и Руководством по экспертизе лекарственных средств (том 3, 2014 г.). Были отобраны 12 таблеток каждого производителя одной серии. Тест проводили на приборе ERWEKA DT 820 (Erweka GmbH, Германия); тип аппарата «Лопастная мешалка», скорость вращения – 75 об/мин; среда растворения и ее объем – 500 мл 0,1 М HCl (рН 1,2); температура $37 \pm 0,5$ °С. Отбор проб объемом 5 мл проводили вручную через 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 и 45 минут после помещения образца таблетки исследуемого ЛП в тестер, объем среды незамедлительно восполняли таким же объемом дегазированной и термостатированной 0,1 М HCl. Каждую пробу фильтровали и измеряли оптическую плотность полученных растворов при длине волны 274 нм в кварцевых кюветках с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения 0,1 М HCl на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 (Япония). Количественное содержание МТ в фильтрах определяли с использованием стандартного образца МТ с концентрацией 0,01 мг/мл. Процент высвободившегося МТ из таблеток рассчитывали по формуле, учитывающей восполнение среды растворения. Обработку экспериментальных данных проводили методом математической статистики с помощью программы Microsoft Office Excel.

Результаты. В качестве референтного препарата был выбран Эгилок®, так как он является одним из первых, зарегистрированных в России препаратов метопролола, и имеет сопоставимую с оригинальным ЛП «Беталок®» клиническую эффективность. При сравнении состава таблеток было установлено различие в использованных вспомогательных веществах (табл. 1).

Таблица 1. Состав вспомогательных веществ препаратов метопролола

Вспомогательное вещество	Лекарственный препарат	
	Эгилок	Метокард
МКЦ	+	+
Карбоксиметилкрахмал натрия	+	нет
Кремния диоксид коллоидный безводный	+	нет
Повидон К 90	+	+
Магния стеарат	+	+
Лактоза	нет	+
Тальк	нет	+
Крахмал рисовый	нет	+

Предварительно было установлено полное соответствие спектральных характеристик растворов таблеток в 0,1 М HCl обоих производителей и стабильность МТ в среде растворения. Для построения профилей растворения рассчитывали среднее значение высвобождения активной фармацевтической субстанции для 12 единиц ЛП в каждой временной точке (рис. 1). Достоверность результатов оценивали по величине относительного стандартного отклонения для каждой временной точки.

Как видно из рисунка 1, полученные кинетические профили различны, что указывает на неэквивалентность воспроизведенного препарата «Метокард» референтному. Скорость высвобождения МТ из таблеток «Эгилок» более высокая, т.к. более 85% действующего вещества высвобождается в течении 15 минут. Высвобождение МТ из «Метокарда» происходит медленнее и лишь на 30 минуте фиксировали уровень высвобождения более 85%.

Поскольку профили не сопоставимы были рассчитаны коэффициент различия (f_1) и коэффициент подобия (f_2), значения которых составили 20,19 и 32,22 соответственно. Полученные значения коэффициентов не входят в диапазон допустимых значений, в связи с этим можно с достаточной уверенностью утверждать о фармацевтической неэквивалентности препаратов «Метокард» и «Эгилок».

Заключение. Проведенное изучение профилей высвобождения метопролола тартрата из таблеток «Эгилок» (Венгрия) и «Метокард» (Польша) показало, что исследуемые препараты фармацевтически не эквивалентны. Таблетки «Метокард» не могут в полной мере служить заменой референтному препарату,

биоэквивалентность которого оригинальному ЛП подтверждена, и, следовательно, их применение может сопровождаться снижением терапевтического эффекта.

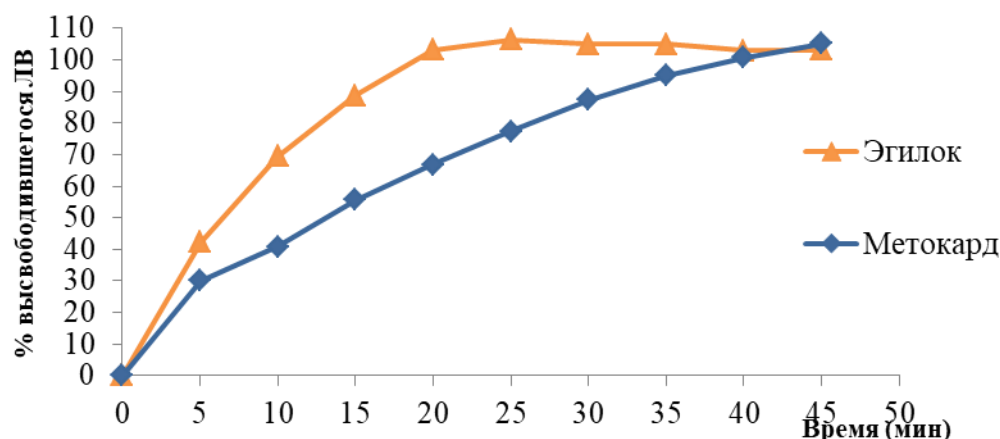


Рис. 1. Профили высвобождения метопролола тартрата из таблеток "Эгилок" и "Метокард" в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты

Литература

1. Гребёнкин Д.Ю., Станишевский Я.М., Шохин И.Е. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(1):166-171.
2. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. Минздрав России. – Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/>.
3. Духанин А.С., Шимановский Н.Л. Оригинальные и воспроизведенные лекарственные препараты: мифы и реальность *Международный медицинский журнал*. 2014;(1):81-83.
4. Остроумова О.Д., Фомина В.М. Применение бета-блокаторов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний: фокус на метопролол. *Медицинский Совет*. 2015;(12):72-77.
5. ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых лекарственных форм» Государственная фармакопея XIV изд.: Т.2. [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>
6. Распоряжение Правительства РФ от 12.10.2019 2406-р (ред. от 23.11.2020) «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи» (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2021). – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_335635/.
7. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. – М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014. 344 с.
8. Фармакология / под ред. Р.Н. Аляутдина. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2019. 352 с.

Регуляторные вопросы фармацевтической разработки и фармацевтической деятельности

ПРИМЕНЕНИЕ АВС-АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ АССОРТИМЕНТА ФЕЛЬДШЕРСКО-АКУШЕРСКИХ ПУНКТОВ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

И.А. Джупарова*, А.С. Джупаров, И.А. Харина

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

г. Новосибирск, Россия

e-mail: uefarm@mail.ru

Ключевые слова: АВС-анализ, фельдшерско-акушерский пункт, ассортимент.

Введение. Фельдшерско-акушерский пункт (ФАП) – ближайшее, и часто – единственное для сельских жителей подразделение медицинской организации, где они могут получить не только медицинскую, но и лекарственную помощь. Согласно приказу Министерства здравоохранения и социального развития России от 26.06.2010г. №735н отпуску из медицинских организаций и обособленных подразделений медицинских организаций подлежат лекарственные средства (ЛС), зарегистрированные в РФ в установленном порядке и включенные в перечень ЛС, сформированный с учетом потребности субъекта РФ. Надлежащее лекарственное обеспечение жителей через ФАПы может осуществляться только при правильном и

целесообразном управлении товарными запасами в них. Чтобы оптимизировать систему управления запасами, необходимо провести тщательный анализ ассортиментных групп, особо учитывая необходимость скорого реагирования в случаях введения карантинных мер и изоляционных ограничений.

Цель. Оценить ассортимент лекарственных препаратов (ЛП), затребованных ФАПами в Новосибирской области за 2019-2020 гг. на основе применения АВС-анализа.

Материалы и методы. Анализу подвергались данные требований-накладных ФАПов на отпущенные лекарственные препараты за 2019-2020 гг. Применялся контент-анализ, АВС-анализ, а также логический, ретроспективный и сравнительный методы. Для оптимизации расчетов использовалась программа Microsoft Excel.

Результаты. В соответствии с планом исследования, первоначально был составлен перечень всех затребованных ФАПами ЛП по международным непатентованным и торговым наименованиям, а также определены затраты на данные ЛП (тыс. руб.) и объем потребления в натуральном выражении (уп.) за период 2019–2020 гг. АВС-анализ проводился с целью выявления наиболее «затратных» среди затребованных ФАПами ЛП. С целью получения объективной картины для управления ассортиментом ЛП, используемых в терапии пациентов ФАПов, был применен двухпараметрический АВС-анализ: по объему потребления в натуральном выражении (Аq, Вq, Сq) и по объему затрат (Ар, Вр, Ср). Интегрированные результаты АВС-анализа по сумме затрат и по объему потребления представлялись в виде двухпараметрических матриц, которые дают информацию для стратегического изменения позиций номенклатуры при формировании заявки ФАПами Новосибирской области. На основании данных матриц ассортимент ЛП по торговым наименованиям дифференцировался на девять категорий с последующим распределением на три приоритетные группы за период 2019-2020 гг. Дана вербальная интерпретация полученным результатам (табл.).

Так в составе ассортимента категорий АрАq, и АрВq, составляющих I приоритетную группу, в 2019 г. наиболее часто закупались следующие ЛП: Натрия хлорид 10% 100 мл N.1 флакон, Цефтриаксон 1 гр N.1 флакон, Кеторолак 1 мл N.10 ампулы, Лозартан 50 мг N.30 таблетки, Арпеллю 100 мг N.30 таблетки, Беротек Н 100 мкг 200 доз N.1 аэрозоль и др. (всего 37 наименований). В 2020 г. в I приоритетную группу вошли 42 наименования ЛП (на 13,5 % больше). Среди них были Этамзилат 12.5% 2 мл N.10 ампулы, Калмирекс 150 мг N.30 таблетки, Тавегил 2 мл N.5 ампулы, Дротаверин 2% 2 мл N.10 ампулы, Местаமிдин-СЕНС 150 мл N.1 флакон и др.

Во II приоритетную группу в 2019 году вошли 27 наименований. В их числе: Местамидин-СЕНС 150 мл N.1 флакон, Фуросемид 1% 2 мл N.10 ампулы, Сальбутамол 90 Доз N.1 аэрозоль, Этамзилат 12.5% 2 мл N.10 ампулы и др. В 2020г. - Церекард 2 мл N.10 ампулы. Каптоприл 25 мг N.40 таблетки, Амиодарон 0.2 гр N.30 таблетки, Диклофенак 2.5% 3 мл N.10 ампулы и др. (всего 32 наименования, что на 18,5% больше, чем в 2019 г.).

III приоритетную группу в 2019 г. составили 66 наименований ЛП: Зилт 0.075 гр N. 28 таблетки, Гепарин 5000 ед/мл 5 мл N.5 флакон, Лефлобакт 250 мг N.10 таблетки, Строфантин-Г 1 мл N.10 ампулы и др. В 2020 г. в эту группу вошло 71 наименование ЛП (на 7,6 % больше, чем в 2019г.): Кардикет 0.04 гр N.20 таблетки, Спиринолактон 25 мг N.20 таблетки, Цианокобаламин 1 мл N.10 ампулы, Эуфиллин 2.4% 5 мл N.10 ампулы и др.

Также в условиях актуальной на сегодняшний день проблемы неблагоприятной эпидемиологической обстановки необходимо было провести исследование соответствия затребованных ФАПами ЛП региональному Перечню ЛП, утвержденному приказом Минздрава Новосибирской области от 11.12.2017 №3256 (ред. от 22.01.2019).

Так, в 2019 г. было затребовано 130 наименований, 76 из которых не входят в установленный Перечень; в 2020 г. из 145 наименований, обнаружено 70 наименований, не входящих в Перечень. Среди затребованных ЛП за два года из требований-накладных ФАПов в Перечень не входит большинство наименований, таких как: Цефтриаксон 1 гр N.1 флакон, Хлоргексидин 0.05% 100 мл N.1 флакон, Ацетилсалициловая кислота 0.5 гр N.10 таблетки, Тринальгин 5 мл N.5 ампулы, Тавегил 2 мл N.5 ампулы, Тексаред 20 мг N.1 флакон.

Заключение. В результате проведенного исследования затребованных ФАПами ЛП за период 2019-2020 гг. выявлена необходимость пересматривать Перечень ЛП, продажа которых может осуществляться обособленными подразделениями медицинских организаций (в т.ч. ФАПами), чаще. За год количество востребованных наименований в целом выросло на 3,4 %, причем качественный состав наименований существенно изменился. Такие изменения требуют особого внимания в периоды повышенной заболеваемости на фоне неблагоприятной эпидемиологической обстановки.

Таблица. Вербальная интерпретация двухпараметрического $A_p, B_p, C_p - A_q, B_q, C_q$ - анализа ЛП, затребованных ФАПами в Новосибирской области в 2019 и 2020 гг.

Группа	Интерпретация	Количество наименований ЛП	
		2019 г.	2020 г.
I приоритетная группа			
$A_p A_q$	Высокая потребительская стоимость ЛП, высокие затраты, большое количество отпущенных упаковок ЛП	21	18
$A_p B_q$	Высокая потребительская стоимость ЛП, высокие затраты, среднее количество отпущенных упаковок ЛП (ретардные формы ЛП, стоимость выше среднего диапазона)	16	24
Итого по I приоритетной группе		37	42
II приоритетная группа			
$A_p C_q$	Высокая потребительская стоимость ЛП, высокие затраты, низкое количество упаковок ЛП (дорогостоящие ЛП, ретардные формы)	1	4
$B_p A_q$	Средняя потребительская стоимость, средние затраты, большое количество упаковок ЛП (ЛП среднего и ниже среднего ценового диапазона)	7	13
$B_p B_q$	Средняя потребительская стоимость ЛП, средние затраты, среднее количество упаковок ЛП (ЛП среднего ценового диапазона)	19	15
Итого по II приоритетной группе		27	32
III приоритетная группа			
$B_p C_q$	Средняя потребительская стоимость ЛП, средние затраты, низкое количество упаковок ЛП (ЛП со стоимостью выше среднего диапазона)	12	17
$C_p A_q$	Низкая потребительская стоимость ЛП, низкие затраты, большое количество упаковок ЛП (ЛП низкого ценового диапазона)	0	0
$C_p B_q$	Низкая потребительская стоимость ЛП, низкие затраты, среднее количество упаковок ЛП (ЛП низкого ценового диапазона)	16	24
$C_p C_q$	Низкая потребительская стоимость ЛП, низкие затраты, низкое количество упаковок ЛП (ЛП низкого ценового диапазона)	38	30
Итого по III приоритетной группе		66	71

Литература

1. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26.08.2010 № 735н «Об утверждении правил отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения медицинскими организациями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность, и их обособленными подразделениями (амбулаториями, фельдшерскими и фельдшерско-акушерскими пунктами, центрами (отделениями) общей врачебной (семейной) практики), расположенными в сельских поселениях, в которых отсутствуют аптечные организации».
2. Приказ Минздрава Новосибирской области от 11.12.2017 № 3256 (ред. от 22.01.2019) «Об утверждении Перечня медицинских организаций, имеющих лицензию на фармацевтическую деятельность, и их обособленных подразделений (амбулаторий, фельдшерских и фельдшерско-акушерских пунктов, центров (отделений) общей врачебной (семейной) практики), расположенных в сельских поселениях Новосибирской области, в которых отсутствуют аптечные организации, и Перечня лекарственных препаратов (за исключением наркотических лекарственных препаратов и психотропных лекарственных препаратов), продажа которых может осуществляться медицинскими организациями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность, и их обособленными подразделениями (амбулаториями, фельдшерскими и фельдшерско-акушерскими пунктами, центрами (отделениями) общей врачебной (семейной) практики), расположенными в сельских поселениях Новосибирской области, в которых отсутствуют аптечные организации».

МЕНЕДЖМЕНТ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПОМОЩИ: КОНЦЕПЦИЯ И ИНСТРУМЕНТЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ФАРМАКОТЕРАПИИ

Е.В. Каракулова*, Л.Ю. Черникова, А.А. Гражданкина

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия
e-mail: karakulova.ev@ssmu.ru

Ключевые слова: менеджмент лекарственной помощи, фармакоэпидемиология, фармакоэкономика, приверженность фармакотерапии.

Введение. В настоящее время большинство стран мира, в том числе и Россия, испытывают противоречие между возрастанием роли здоровья населения как ключевого компонента человеческого капитала, и увеличением, вследствие происходящих демографических и эпидемиологических изменений, бремени хронических заболеваний, требующих длительной, часто пожизненной фармакотерапии, от результативности которой зависит качество медицинской помощи в целом (Berenguer B. et al., 2004; Овод А.И., 2021).

Цель. Целью исследования явился анализ этапов формирования концепции менеджмента лекарственной помощи и развитие подходов к изучению системы лекарственной помощи.

Материалы и методы. Исследование базировалось на применении системного и процессного подходов, контент-анализа.

Результаты. Проведенный анализ существующих подходов к управлению медицинской и лекарственной помощью показал, что патерналистская модель, ориентированная на неотложную медицинскую помощь, соответствует ситуации доминирования экзогенных причин смертности населения. Фокус данной модели – это снижение стоимости отдельных компонентов медицинской помощи, в том числе лекарственных препаратов (Bluml В.М., 2005; Le T. et al., 2020). Несоответствие данной модели потребностям больных хроническими заболеваниями определило появление концепции менеджмента заболевания. Данный подход носит системный характер, направлен на пациента как единицу управления, на поиск баланса между клинической эффективностью лечения и его стоимостью. Внедрение менеджмента заболевания в условиях увеличения роли фармакотерапии привело к изменению фармацевтической практики, смещению фокуса на пациента. Проблемы оптимизации фармакотерапии на индивидуальном уровне традиционно рассматриваются в рамках общепризнанной концепции фармацевтической помощи, которая получила поддержку ВОЗ и Международной фармацевтической федерации. В настоящее время данное направление вышло за рамки госпитального сегмента и получило свое развитие в виде программ менеджмента фармакотерапии в амбулаторной практике, которые реализуются специалистами аптек, получивших соответствующую подготовку. Параллельно с развитием фармацевтической помощи происходило становление представлений о совершенствовании системы на популяционном уровне в рамках концепции рационального использования лекарственных средств. В последнее десятилетие в США и европейских странах отмечается интеграция уровней управления качеством фармакотерапии в рамках концепции менеджмента лекарственной помощи, под которым понимается деятельность, направленная на улучшение использования лекарственных препаратов на индивидуальном и популяционном уровне с точки зрения достижения целей клинической эффективности, безопасности и рентабельности фармакотерапии (Scahill S.L, et al., 2017). Рассмотрение менеджмента лекарственной помощи в рамках системного подхода определяет необходимость выделения внешних факторов, оказывающих влияние на управление лекарственной помощью, к которым могут быть отнесены: политические условия, формирующие законодательные основы функционирования системы; социальные факторы, оказывающие влияние на систему (медико-демографические характеристики, уровень жизни населения, культурные особенности); экономические факторы, определяющие финансовые возможности оказания лекарственной помощи и задачи системы. Так, для одних стран первоочередной задачей является обеспечение доступности для широких слоев населения основных лекарственных препаратов, в то время как в наиболее развитых странах активно развиваются фармакогенетические подходы к оптимизации фармакотерапии для повышения ее эффективности и снижения рисков развития побочных эффектов. Еще одним фактором, непосредственно влияющим на качество и ассортиментную доступность лекарственных препаратов, является уровень развития фармацевтической промышленности, ее способность обеспечить национальную лекарственную безопасность. С позиции деятельностного подхода в системе менеджмента лекарственной помощи целесообразно выделить: субъектов деятельности (органы управления здравоохранением и лекарственным обеспечением, медицинские и фармацевтические работники, пациенты); объектов (безопасность, клиническая и экономическая эффективность лекарственной помощи); средств деятельности (аналитических, информационных, образовательных). Стратегический уровень в системе менеджмента лекарственной помощи представлен органами управления медико-фармацевтической деятельностью, использующими аналитические средства фармакоэпидемиологического мониторинга и фармакоэкономической оценки как инструменты для обоснования управленческих решений, направленных на повышение качества фармакотерапии. С целью реализации комплексной фармакоэпидемиологической оценки может быть рекомендован методический подход, заключающийся в последовательном рассмотрении статических характеристик и структурных сдвигов в используемом ассортименте лекарственных препаратов; перекрестном анализе частоты назначения и интенсивности потребления отдельных групп препаратов; соотношении полученных результатов с современными клиническими руководствами и стандартами лечения. Наряду со степенью тяжести заболевания на дифференциацию лекарственной помощи могут влиять другие факторы, которые необходимо учитывать при углубленной фармакоэпидемиологической оценке. В качестве подхода, позволяющего устранить возможное влияние различий в половозрастной структуре населения отдельных территорий, может быть рекомендован расчет стандартизованных показателей интенсивности потребления лекарственных препаратов. Тактический уровень системы менеджмента лекарственной помощи представлен медицинскими организациями, специалисты которых оказывают фармакотерапевтическую помощь больным, и аптечными организациями, которые реализуют задачи лекарственного обеспечения. На данном уровне функционирования системы

необходимо развитие административных баз данных о потреблении лекарственных препаратов и результатах фармакотерапии, обеспечивающих выполнение фармакоэпидемиологической и фармакоэкономической оценки. На операционном уровне эффективность функционирования системы зависит от профессионализма медицинских и фармацевтических работников, доступности для них источников объективной профессиональной информации о лекарственных препаратах, приверженности пациента рекомендациям лечащего врача. Проведенная оценка приверженности фармакотерапии хроническими заболеваниями обнаружила разнонаправленное влияние ряда демографических, социально-экономических, медицинских и фармацевтических факторов, учет которых может использоваться при разработке целевых программ фармацевтического консультирования, телефармации и способствовать повышению результативности фармакотерапии.

Заключение. Реализация концепции менеджмента лекарственной помощи может содействовать сохранению индивидуального и общественного здоровья посредством повышения эффективности использования лекарственных препаратов. Достижение обозначенной цели предполагает расширение взаимодействия основных субъектов системы, развитие информационного и кадрового ресурсов системы здравоохранения.

Литература

1. Овод А.И. Тенденции изменения структуры отечественного фармацевтического рынка в условиях пандемии. *Азимут научных исследований: экономика и управление*. 2021;2(35):261-263. DOI: 10.26140/anie-2021-1002-0051.
2. Berenguer B., La Casa C., de la Matta M.J., Martín-Calero M.J. Pharmaceutical care: past, present and future. *Current pharmaceutical design*. 2004;10(31):3931-46. DOI: 10.2174/1381612043382521.
3. Bluml B.M. Definition of medication therapy management: development of professionwide consensus. *Journal of the American Pharmacists Association*. 2005; 45(5):566-572. DOI: 10.1331/1544345055001274.
4. Le T., Toscani M., Colaizzi J. Telepharmacy: A New Paradigm for Our Profession. *Journal of pharmacy practice*. 2020; 33(2):176-182. DOI: 10.1177/0897190018791060.
5. Scahill S.L., Atif M., Babar Z.U. Defining pharmacy and its practice: a conceptual model for an international audience. *Integrated pharmacy research & practice*. 2017; 6:121-129. DOI:10.2147/IPRP.S124866

О ТЕКУЩИХ СЛОЖНОСТЯХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В СТРАНАХ ЕАЭС

И.А. Наркевич*

ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: igor.narkevich@pharminnotech.com

Ключевые слова: правовой разлом, долина смерти, GLP.

Введение. Введение единых требований к проведению фармацевтической разработки, в том числе, и доклинических исследований и создание общего правового поля в 5 странах ЕАЭС имело целью взаимное признание результатов исследований государствами-членами, с последующей регистрацией лекарственного препарата не в отдельно взятой стране, а на всей территории Таможенного союза. Доклинические исследования в Российской Федерации (РФ) и странах ЕАЭС, а также странах постсоветского пространства, не вошедших в союз, находятся в условиях глобальной смены подходов к их проведению и имеют ряд проблем. **Цель.** Провести анализ существующих сложностей в области проведения доклинических исследований.

Результаты. Для выполнения качественных доклинических исследований должен быть соблюден ряд следующих условий: наличие качественных животных, компетентного персонала, удовлетворительных условий окружающей среды, необходимого и достаточного парка оборудования, введение понятной и единой для всех регуляторной документации. Для того, чтобы можно было полностью оценить всю картину влияния испытуемого вещества на организм животных, сами животные должны быть здоровыми, чистыми и прошедшими все необходимые лабораторные анализы. К сожалению, в РФ нет достаточного количества питомников, которые могут обеспечить поставки таких животных. Кроме того, отдельные виды животных (приматы, собаки, кошки) разводят только в нескольких питомниках РФ, и доставка из них получается дорогой и недостаточно безопасной, так как во время перевозки животных никто не гарантирует того, что они придут целыми, невредимыми и здоровыми.

В РФ нет четкой законодательной базы, которая бы регламентировала работу питомников. Нет единых правил и требований к персоналу питомников, к их оснащению, к условиям, в которых должны содержаться животные. Также нет регуляторного органа, проводящего аудиты, который мог бы выявлять нарушения и контролировать их устранение. Сотрудники питомников, как правило, не имеют специального образования по ветеринарии, не говоря уже о генетике животных. Анализы, которые берут у животных в процессе их содержания и перед отправкой заказчику, недостаточно информативны и не отражают полной

картины состояния здоровья животных, в некоторых случаях такие анализы не несут информативных результатов и могут исказить результаты исследований. Для решения проблем, связанных с животными, необходимо создать единый свод правил и требований, которые регламентируют условия содержания животных, их состояние здоровья, которое включает все анализы и тесты, а также наличие необходимого количества обученного персонала, обеспечивающего контроль и поддерживающего надлежащее качество животных. В первую очередь, необходимо проверить все питомники, находящиеся на территории РФ на соблюдение данных правил, выявить у них недочеты и нарушения, дать им время на устранение, а затем провести повторную проверку. Кроме того, необходимо осветить основные проблемные стороны, касающиеся знаний персонала питомников (генетика, ветеринария и др.) и обучить их на специальных курсах. Также следует обязать все питомники сдавать от своих животных определенный набор анализов с определенной периодичностью в специализированные ветеринарные станции. В учебных заведениях РФ нет специализации, в рамках которой могли бы подготовить будущих сотрудников центров, занимающихся доклиническими исследованиями. В данной сфере в настоящий момент работают ветеринарные врачи, провизоры, медики, биологи и люди, которые близки к этим специальностям. К сожалению, подготовка «универсального специалиста», который обладает широким диапазоном навыков, начиная от эксперимента и заканчивая документальным сопровождением, является непосильной задачей, так как для моделирования различных патологий, гистологии, биохимии, молекулярной биологии, патоморфологии нужны специалисты узкого профиля. Однако нужно ориентироваться на то, чтобы основные сотрудники, принимающие участие в доклинических исследованиях, были компетентны, понимали всю суть эксперимента, могли выполнять поставленные задачи в рамках исследований без проблем, работать с научной и нормативной документацией и знали, где можно найти ту или иную информацию. Обязательно наличие персонала, который отвечает за обеспечение качества в лаборатории. Специалисты в такой области повышают свою квалификацию на курсах, внешних обучении, профильных выездных командировках, однако базового обучения по такой специальности нет. Для решения проблемы подготовки компетентных специалистов представляется актуальной возможность создания факультета или направления «Доклинические исследования». Сложностью является широкий по навыкам и в то же время узкий по области применения профиль обучения. Было бы разумным решением создать единый центр, в который бы приглашались специалисты для проведения курсов, освоения новых программ в рамках доклинических исследований, передачи опыта, приобретенного за счет стажировок в центрах РФ и/или зарубежных центрах. В лабораториях, проводящих доклинические исследования, оборудование должно проходить поверку, аттестацию (калибровку) и валидацию. Последнее есть только у небольшой части оборудования, а инженеры по валидации на вес золота, т.к. данной специализации не учат, и работникам исследовательских центров приходится самим выстраивать схему процесса и реализовывать его. Кроме того, не во всех лабораториях есть инженеры, которые сами могут осмотреть оборудование и оценить правильность его работы, а заключение контрактов на обслуживание этого оборудования с фирмами производителями или посредниками чаще всего затрагивает компетенцию данных фирм и финансовые последствия, возможность заключать контракты предоставляется не всегда. В центрах используется оборудование импортного производства, которое достаточно дорогостоящее, не имеющее отечественных аналогов. Чаще всего обслуживание такого оборудования представляет определенные сложности: квалификация обслуживания, высокая стоимость, время. Для того чтобы сделать приобретение качественного и приемлемого по цене оборудования возможным, необходимо самим разрабатывать его в РФ и/или наладить каналы взаимоотношений с зарубежными поставщиками. Условия окружающей среды являются одной из самых значимых проблем. Всем известно об отсутствии качественной вентиляции в помещениях лабораторий. Это приводит к нарушению температурного режима и влажности, что приводит к нарушениям условий хранения образцов и содержания тест-систем. Все это связано с отсутствием грамотного планирования при постройке помещений или с тем, что переоборудование старых зданий недостаточно качественно и не соответствует требованиям. Для того, чтобы в РФ были правильно построенные лаборатории, необходимы компании, которые будут точно знать, как спроектировать здания/помещения, таким образом, с соблюдением всех условий и требований, чтобы все параметры окружающей среды можно было легко отследить и при необходимости скорректировать. Пока в РФ нет единых требований и правил, которые регламентируют проведение доклинических исследований. Либо есть небольшие и не слишком понятные приказы, краткие руководства, не объясняющие подробно, как все должно функционировать. СанПин, выпущенный в 2014, настолько краток и неинформативен, что приходится искать недостающую информацию в иностранных документах. Чтобы решить данную проблему, необходимо найти компетентных специалистов в области доклинических исследований, которые могли бы собраться вместе и создать один или несколько документов, в которых подробно и на доступном языке было объяснено, как должны проводиться исследования, какие требования необходимо предъявлять к условиям содержания животных, как документально оформлять результаты эксперимента, что должно быть в окончательном отчете по препаратам, который подается на проверку экспертам, а эксперты, отвечающие за принятие или непринятие выполненного исследования, должны быть компетентны в основах проведения доклинических исследований, чтобы данное взаимодействие не было ограничено только в рамках отчета. Несмотря на большие пробелы в отечественной доклинической практике, в странах постсоветского пространства имеются куда большие проблемы с квалифицированными кадрами, оборудованием, качественными

животными, программами обучения и, как следствие, с проведением доклинических исследований в целом. Трудности, возникающие в РФ, связанные с доклиническими исследованиями можно решить, приложив должные усилия к подготовке кадров, квалификации и обслуживанию соответствующего оборудования, наличия сертифицированных питомников с должным уходом за здоровьем животных, проектированием новых зданий, соответствующих требованиям, либо перестройкой имеющихся, соответствием требованиям. И даже с учетом скорейшего выполнения всего вышеописанного, мы находимся в самом начале пути по становлению доклинических исследований, т.к. ещё одной важной проблемой, требующей решения, является правовой разлом (рис. 1), при котором достаточно жёстко регламентированы проводимые исследования безопасности лекарственных препаратов, а для исследований специфической активности регуляция фактически отсутствует, что приводит в т.ч. к появлению «долины смерти», связанной с трудностями в трансляции данных, полученных на животных, в клиническую практику.

Заключение. В силу обозначенных выше причин представляется логичным предоставить роль «законодателя мод» в доклинических исследованиях РФ с определением центров, способных оказывать консультационно-методическую, образовательную, научную и экспертную помощь нуждающимся в ней отечественным и зарубежным лабораториям. С целью избегания ситуации «семибоярщины» должен быть определён орган государственного и надгосударственного контроля, объединяющий в себе полноту консультационных и контролирующих/разрешающих функций.

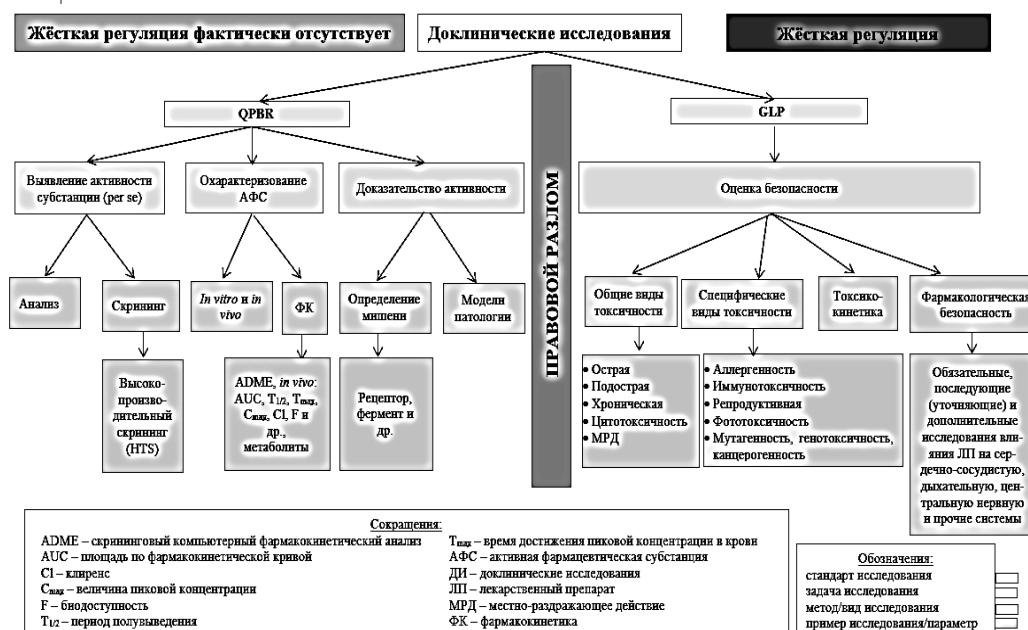


Рис. 1. Правовой разлом в регулировании доклинических исследований

Литература

1. Ивкин Д.Ю., Ивкина А.С. Надлежащая лабораторная практика как инструмент повышения достоверности и качества доклинических исследований. // Химия и химическое образование XXI века. 2019:15-16.
2. Наркевич И.А., Флисюк Е.В., Москвин А.В., Шигарова Л.В., Ивкин Д.Ю., Ивкина А.С. Сертификация на соответствие требованиям ИСО 9001 как первый этап внедрения надлежащей лабораторной практики в центре экспериментальной фармакологии. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018;1 (22):226-230.
3. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках ЕЭК. Т. 3. Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств – М.: Ремедиум, 2017. – 360 с.

АНАЛИЗ РОССИЙСКОГО РЫНКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПАРАЦЕТАМОЛ

Н.Б. Шестопалова*, А.А. Колоярцева, Ю.А. Фомина

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского»

Минздрава России, г. Саратов, Россия

e-mail: shestopalovanb@yandex.ru

Ключевые слова: парацетамол, лекарственные препараты, фармацевтический рынок, Государственный реестр лекарственных средств.

Введение. Парацетамол (ПЦ) широко применяется как анальгезирующее и жаропонижающее средство при болевом синдроме слабой и умеренной выраженности, острых респираторных и других инфекционно-воспалительных заболеваниях, сопровождающихся лихорадкой (Аляутдин Р.Н., 2019); входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, утверждённый распоряжением Правительства РФ от 12.10.2019 N 2406-р. Лекарственные препараты (ЛП), содержащие ПЦ характеризуются высокой эффективностью и безопасностью (Шифман Е.М., Ершов А.Л., 2007; Зайченко А.В., Мищенко О.Я., 2016). В связи с распространением новой коронавирусной инфекции ПЦ является рекомендуемым препаратом для снижения температуры тела при COVID-19 (Муравьев Ю.В., Муравьева Л.А., 2020). Учитывая широкую распространенность самолечения, информация, предоставляемая фармацевтическими работниками, имеет важное значение для пациентов. Обобщенная информация о зарегистрированных ЛП, содержащих ПЦ, представленных на фармацевтическом рынке РФ в виде моно- (действующее вещество – ПЦ) и комбинированных (ПЦ в сочетании с другими действующими веществами) позволит расширить возможности индивидуального подбора препаратов при фармацевтическом консультировании.

Цель. Провести анализ структуры российского фармацевтического рынка зарегистрированных лекарственных препаратов, содержащих парацетамол.

Материалы и методы. Для проведения анализа были использованы данные Государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС) о торговых наименованиях ЛП, лекарственных формах, производителях субстанций и ЛП. Для маркетингового анализа фармацевтического рынка использовали данные аналитических отчетов DSMGroup.

Результаты. Согласно данным ГРЛС (01.06.2021 г.) в РФ зарегистрировано 202 торговых наименования ЛП, содержащих ПЦ (действующее регистрационное удостоверение), из них моно- и многокомпонентные препараты составляют 27% и 73% соответственно, выпускаемые в различных лекарственных формах (ЛФ) (рис. 1, 2).

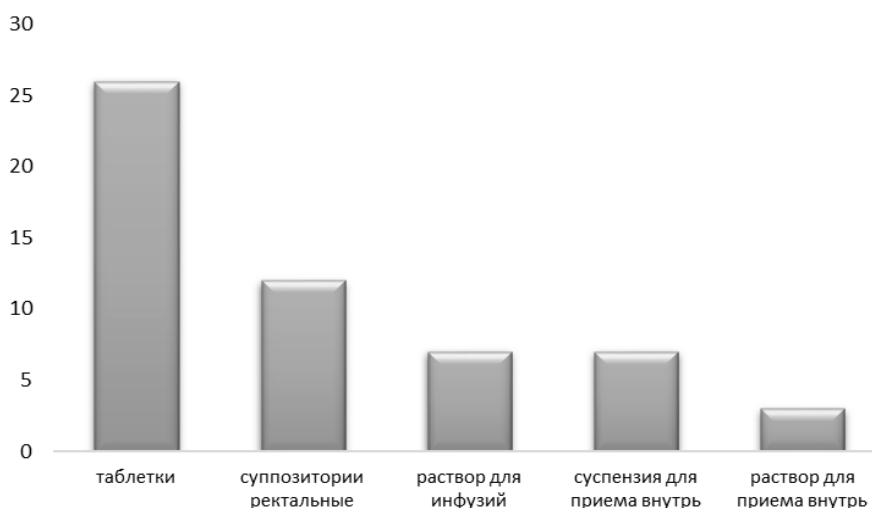


Рис. 1. Лекарственные формы монопрепаратов, содержащих парацетамол

Как видно из диаграммы на рисунке 1 основная доля выпускается в виде таблеток, в которых содержание действующего вещества ПЦ составляет 200 мг или 500 мг. Суппозитории ректальные выпускаются в дозировках 50, 100, 250, 500 мг ПЦ. Растворы для инфузий (10мг/мл) позволяют вводить парентерально 500 или 1000 мг ПЦ, когда внутривенное применение клинически оправдано или невозможно введение препарата другими путями. Суспензии для приема внутрь имеют дозировку 250 мг/5 мл.

На фармацевтическом рынке широко представлены комбинированные ЛП, содержащие от 2 до 6 действующих веществ в сочетании с ПЦ, предназначенные в основном для перорального приема. Как видно из представленной диаграммы (рис. 2), наибольшее количество ЛП выпускается в форме таблеток и порошков для приготовления раствора для приема внутрь. Следует отметить, что многокомпонентные препараты ПЦ не выпускаются в форме раствора для инфузий и суппозиториях. Комбинации с нестероидными противовоспалительными препаратами, другими анальгетиками (диклофенак, ибупрофен) рекомендованы для кратковременного купирования болевого синдрома при невралгии, артралгии, миалгии («Паноксен», «Ибуклин», «Некст»). Кодеинсодержащие препараты ПЦ («Страйк Плюс», «Солпадеин Фаст», «Мигрениум», «Седалгин-Нео») также обладают выраженным анальгетическим эффектом. «Седалгин-Нео», помимо кодеина, содержит фенобарбитал, что оказывает успокаивающее, снотворное, спазмолитическое и миорелаксирующее действие. Препараты, содержащие кофеин, обладают тонизирующим и аналептическим действием, усиливают действие анальгетиков («Цитрамон», «Аскофен Ультра», «Цитрапак»).

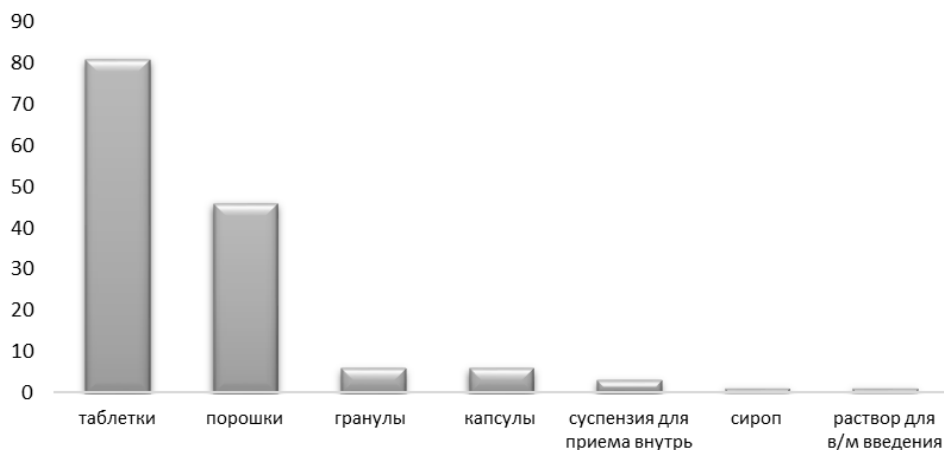


Рис. 2. Лекарственные формы многокомпонентных препаратов, содержащих парацетамол

Препараты ПЦ с дицикловерином, дротаверина гидрохлоридом, гиосцина бутилбромидом обладают спазмолитическим действием. Спазмолитик гиосцина бутилбромид и местный анестетик лидокаин входят в состав единственного комбинированного препарата ПЦ для внутримышечного введения – «Спазмо-Апотель». Комбинированные ЛП рекомендуются в комплексной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта и глотки, что позволяет успешно устранять симптомы ОРВИ и гриппа. В состав могут входить блокаторы гистаминовых H_1 -рецепторов (дифенгидрамин, хлорфенамин, фенирамин и лоратадин). Фенилэфрин и псевдоэфедрин снимают заложенность носа, т.к. сужают сосуды слизистой оболочки полости носа, уменьшают её отечность и гиперемиию. Противокашлевое действие оказывают гвайфенезин («Викс АнтиГрипп КОМПЛЕКС»), бромгексин гидрохлорид («Пентафлуцин-Бронхо»), терпингидрат («Колдрекс»), а декстрометорфан («Каффетин Колд») уменьшающее возбудимость кашлевого центра. Аскорбиновая кислота повышает адаптационные способности организма и его сопротивляемость к инфекциям («Парацетамол Экстра», «Колдрекс», ТераФлю» и др.). В состав противопростудных препаратов могут входить: кальция глюконат, обладающий противоаллергическим действием и предотвращающий повышение проницаемости и ломкости сосудов; рутозид (ангиопротектор), укрепляющий сосудистую стенку; римантадин – противовирусный компонент, активный в отношении вирусов гриппа А и В — таблетки шипучие «АнвиМакс» с разными вкусами содержат 6 компонентов: парацетамол, аскорбиновая кислота, кальция глюконат, лоратадин, римантадин и рутозид. Сравнительно недавно на фармацевтическом рынке появились комбинированные наборы, в которых составы ЛП, принимаемые днем и перед сном различаются («Викс День и Ночь», «Дуоколд», «КолдФри»). Следует отметить, что содержание ПЦ в многокомпонентных ЛП значительно варьируется (от 125 мг до 1000 мг), что необходимо учитывать при назначении для исключения передозировки. Анализ данных по производителям субстанций и ЛП показал, что для производства используются в основном субстанции китайского и индийского производства (9 заводов-изготовителей в Китае и 10 в Индии). Субстанции отечественного производства выпускают ОАО «Ирбитский химфармзавод» и ОАО «Фармстандарт-Лексредства». География производителей различных ЛП более обширна. Основную долю на рынке составляют отечественные фармкомпании (70%), второе место занимают производители Индии – 17%, третье – США (9%), остальные – страны Европейского союза.

В связи с распространением коронавирусной инфекции COVID-19 спрос на парацетамолсодержащие препараты вырос в 1,5 раза в марте-апреле 2020 года. Закупки ЛП, содержащих ПЦ, в 2020 году выросли на 33,9% по сравнению с 2019 г. По тоннажу завозимых лекарственных субстанций (1078,5 тонн) в 2019 году ПЦ занимал 3-е место.

Заключение. В связи с пандемией COVID-19 значительно увеличился объем производства и возросли продажи парацетамолсодержащих препаратов. На российском рынке лекарственных препаратов представлены моно и комбинированные препараты парацетамола, содержащие различные лекарственные вещества, облегчающие течение простудных заболеваний, гриппа и COVID-19. Различные лекарственные формы и дозировки позволяют сделать оптимальный выбор препаратов для пациентов различных возрастов.

Литература

1. Аналитический отчет: фармацевтический рынок России. Итоги 2020 г. [Эл. ресурс] // DSM-group. – 2020. – 127 с. – https://dsm.ru/docs/analytics/2020_Report_rus.pdf.
2. Аналитический отчет: фармацевтический рынок России. Итоги 2019 г. [Эл. ресурс] // DSM-group. – 2019. – 136 с. https://www.dsm.ru/docs/analytics/Annual_report_2019_DSM_web.pdf.
3. Аналитический отчет: фармацевтический рынок России. Январь 2021 [Эл. ресурс] г. // DSM-group. – 2021. – 28 с. https://dsm.ru/docs/analytics/Russian_pharmaceutical_market_jan_2021.pdf.

4. Государственный реестр лекарственных средств [Эл. ресурс]. Минздрав России. – Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/>.
5. Зайченко А.В., Мищенко О.Я. Использование ибупрофена и парацетамола в педиатрии: фармакоэкономический анализ. *Новости медицины и фармации*. 2016;4:8-11.
6. Муравьев Ю.В., Муравьева Л.А. Зависит ли заболевание коронавирусной инфекцией COVID-19 от применения НПВП? *Школа науки*. 2020;10(35):14-16.
7. Распоряжение Правительства РФ от 12.10.2019 N 2406-р (ред. от 23.11.2020) «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи» (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2021). – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_335635/.
8. Фармакология. / под ред. Р.Н. Аляутдина. – М.: GEOTAR-Медиа, 2019. 352 с.
9. Шифман Е.М., Ершов А.Л. Парацетамол: терапевтическое применение и проблема острых отравлений. *Общая реаниматология*. 2007;3(1):57-65.

Контроль качества лекарственных средств и специализированных продуктов питания

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В НА НОВЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СЕНСОРАХ

В. М. Богословский*

Национальный Исследовательский Томский Политехнический Университет, г. Томск, Россия

e-mail: ymb3@tpu.ru

Ключевые слова: Рибофлавин(V_2), Пиридоксин(V_6), вольтамперометрия, модифицированный графитовый электрод, одновременное определение.

Введение. Водорастворимые витамины группы В, такие как V_1 , V_2 , V_6 и другие оказывают влияние на работоспособность центральной нервной системы, эндокринной и иммунной систем, кровеносной системы, пищеварительного тракта и т.д. Усвоение организмом этих витаминов, а также в составе поливитаминов необычайно важна, так как это способствует более быстрой реабилитации организма и корректному протеканию в нём биологических процессов (Muthusankar G. et al., 2019). Именно поэтому необходимо контролировать содержание витаминов в продуктах питания, БАДах, лекарственных средствах и биологических объектах. В настоящее время все чаще стали использовать электрохимические методы для определения органических веществ и неорганических элементов в медицинской диагностике (Rejithamol R. et al., 2020). Эти методы, наряду со спектрофотометрическими и хроматографическими, включая метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, который включен в отечественную фармакопею, успешно входят в практику за счет своих преимуществ: чувствительности, экспрессности, дешевизны оборудования, что подходит к критерию требований к контролю объектов медицинской диагностики, в том числе биологических (Салам Т.Т., 2021). Использование электрохимических методов позволяет определять широкий спектр органических веществ и неорганических элементов в очень малых количествах – от нескольких мкг до нескольких мг.

Цель. Целью данной работы являлось оценка возможности одновременного определения водорастворимых витаминов группы В (рибофлавина и пиридоксина) на новых модифицированных электрохимических сенсорах для дальнейшей разработки инвазивной методики определения их в биологических материалах. Данный подход позволяет проводить экспресс-тесты с высокой точностью. Наблюдения за процессами, протекающими внутри организма, в особенности, концентрацию витаминов в кровеносной системе пациента, о времени их распада и вывода из организма. Использование немодифицированных графитовых и ртутных амальгамных электродов позволяют производить количественный анализ биологических жидкостей внутри организма, но требует длительной пробоподготовки. В данной работе описана концепция нового поколения графитового электрода с новым поверхностным модификатором, который позволит увеличивать чувствительность аналитического метода, за счёт изменения морфологии поверхности рабочего электрода.

Материалы и методы. Вольтамперограммы получены в дифференциальном режиме на вольтамперометрическом аналитическом комплексе СТА (ТУ 4215-001-20694097-98, ООО «ИТМ», Россия). Двухэлектродная электрохимическая ячейка состояла из модифицированного графитового электрохимического сенсора и, в качестве электрода сравнения, насыщенного хлорсеребряного электрода (нас. ХСЭ). Перемешивание раствора осуществили с помощью вибрации рабочего электрода. В качестве фонового электролита использовали 0,1М раствор сульфата аммония. Поверхностный активный

модификатор (мезопористый углерод) позволяет покрывать краевые дефекты поверхности и изменяет морфологию поверхности за счёт чего происходит увеличение активной рабочей поверхности с новыми адгезионными центрами на которые осаждается определяемое вещество. Мезопористый углерод представляет собой упорядоченную структуру с различным расположением пор, в зависимости от его модификации, диапазон пор составляет 2-50 нм и занимает 70-80% площади частицы. Может применяться в качестве катализатора, сорбента и химического сенсора. Возможна последующая поверхностная модификация с помощью других веществ и соединений. Углеродные нанотрубки «Таунит-М» (УНТ) представляют собой квазиодномерные, наномасштабные, нитевидные образования поликристаллического графита преимущественно цилиндрической формы с внутренним каналом (рисунок 1). При смешивании мезопористого углерода и углеродных нанотрубок, получают активные сферы с выступающими гранями из нанотрубок способных адсорбировать на себя различные элементы тем самым увеличивает полезную площадь рабочего электрода что приводит к увеличению чувствительности метода.

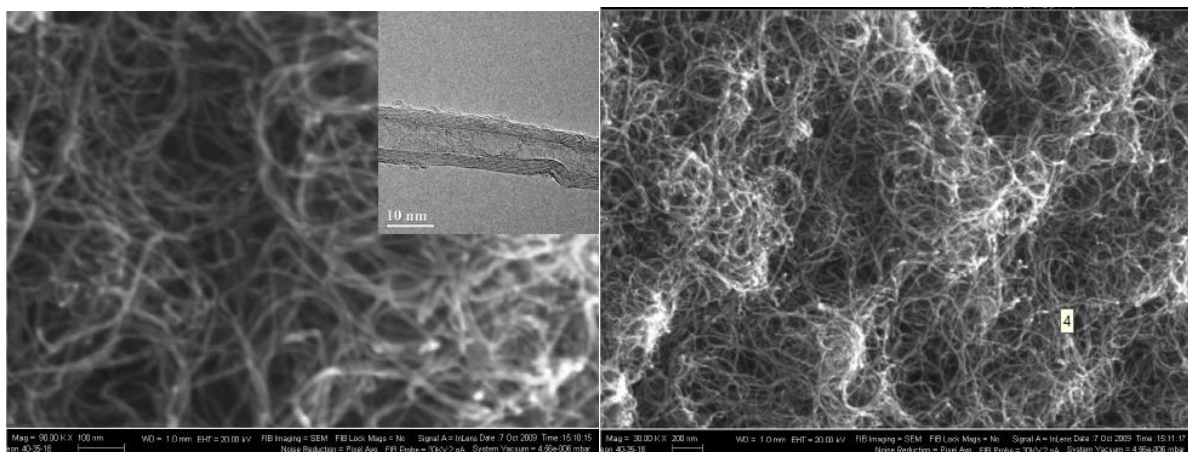


Рис. 1. СЭМ-изображение углеродных нанотрубок «Таунит-М»

Для модификации поверхности графитового сенсора использовали мезопористый углерод с добавлением углеродных нанотрубок «Таунит-М» (УНТ) в соотношении 80/20% по массе. Растворяли полистерол в 1,2-дихлорэтаноле, затем вносили в полученную суспензию мезопористый углерод вместе с УНТ и помещали в ультразвук на 30 минут. Электрод модифицировали поверхностным капельным нанесением полученной суспензии в количестве 20 мкл с последующей сушкой.

Результаты. На рисунке 2 представлены вольтамперограммы одновременного витаминов В₂ и В₆ в дифференциальном режиме полярографирования. Как видно из полученных вольтамперограмм, при использовании модифицированного УНТ графитового электрода возможно одновременное определение витаминов В₂ и В₆ с большей чувствительностью, в сравнении с немодифицированным электродом при выбранных условиях. Разработанный новый модифицированный сенсор позволяет одновременно получать хорошо разделяемые и воспроизводимые ($Sr \leq 0,028$) аналитические сигналы витаминов.

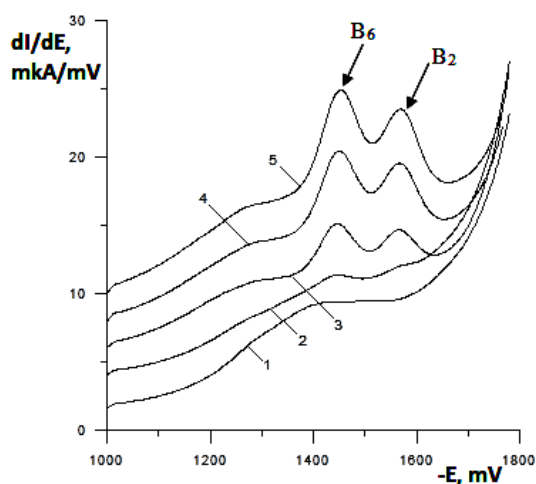


Рис. 2. Дифференциальные вольтамперограммы витамина В₂ и В₆, полученных на графитовом (2) и новом модифицированном электроде (3-5), концентрация витаминов (С) мг/л: 4,0 (3), 10,0 (4), 16,0 (5). Фон: 0,1 М (NH₄)₂SO₄ (1). Развёртка -0,5 до 1,8В, потенциал накопления -0,9В, скорость развёртки поляризующего напряжения - 35 мВ/с.

Заключение. Таким образом показано, что применение графитовых электродов, модифицированных углеродными нанотрубками целесообразно для одновременного вольтамперометрического определения витаминов группы В (рибофлавина и пиридоксина) при выбранных условиях. Дальнейшая работа связана с установлением пределов обнаружения и определения данных веществ и оценка мешающего влияния матрицы биологических жидкостей на получаемый аналитический сигнал.

Литература

1. Calam T.T. A novel, efficient and sensitive method for the simultaneous determination of riboflavin (vitamin B₂) and pyridoxine hydrochloride (vitamin B₆) in food and pharmacological samples using an electrochemical sensor based on 4,4'-diamino benzophenone. *Microchemical Journal*. 2021;106:557.
2. Ganesan Muthusankar, Chellakannu Rajkumar, Shen-Ming Chen, Rajendran Karkuzhali, Gopalakrishnan Gopu, Arumugam Sangili. Sonochemical driven simple preparation of nitrogen-doped carbon quantum dots/SnO₂ nanocomposite: A novel electrocatalyst for sensitive voltammetric determination of riboflavin. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019;281:602-612.
3. Rejithamol R., Beena S. Electrochemical quantification of pyridoxine (V B₆) in human blood from other water-soluble vitamins. *Chemical Papers*. 2020;74(6):2011-2020.

РАЗРАБОТКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА

Е.Ю. Жеребцова*, С.В. Терентьева, Т.Г. Шинко

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Новосибирск, Россия
e-mail: iphruy@mail.ru

Ключевые слова: вольтамперометрия, лекарственный препарат, этилметилгидроксипиридина сукцинат.

Введение. Этилметилгидроксипиридина сукцинат (2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат) (лекарственный препарат «Мексидол») является антиоксидантом–ингибитором свободнорадикальных процессов, обладающим антигипоксическим, стресспротективным, антиамнестическим, анксиолитическим действием (Воронина Т.А., 2005). На сегодняшний день существует несколько методов определения этилметилгидроксипиридина сукцината. Согласно ГФ 14 количественное определение проводят титрованием исследуемого вещества раствором кислоты хлорной 0,1 М. Растворителем является ледяная уксусная кислота. Точку эквивалентности фиксируют потенциометрически (ГФ XIV, Том 3, 2018). Метод ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием и МС-ВЭЖХ используют для определения этилметилгидроксипиридина сукцината в том числе и в плазме крови (Баранов П.А. 2009; Черных И.В. и др. 2015). Известен спектрофотометрический метод определения этилметилгидроксипиридина сукцината, основанный на способности солянокислых растворов мексидола поглощать электромагнитное излучение в УФ-области (297 нм) (МУ. МУК 4.1.1623-03 2003; Лосенкова С.О и др., 2009). Применяют также вольтамперометрический способ определения мексидола, разработанный Г.К. Зияждиновой (2005). Хорошо зарекомендовавшее себя средство имеет широкие перспективы для дальнейшего использования в составе новых лекарственных форм, комбинированных лекарственных препаратов и сочетанной терапии, что требует углубленного фармакокинетического анализа. Несмотря на неоспоримые достоинства приведённых методов, некоторые из них обладают рядом недостатков: отсутствием необходимой чувствительности и специфичности или сложностью пробоподготовки биологических образцов. Наиболее перспективным в плане упрощённой пробоподготовки и высокой чувствительности является вольтамперометрия, но предлагаемая авторами приборная база не позволяет автоматизировать процесс. Тогда как выпускаемое НПП «Томьяналит» оборудование с успехом справляется с этой задачей. При перенесении разработанной ранее методики на прибор ТА-4 сигналы этилметилгидроксипиридина сукцината получены не были. В связи с этим, возникла необходимость в разработке методики определения мексидола, лишенной перечисленных недостатков применительно к имеющейся серийно выпускаемой сертифицированной приборной базе, с целью её дальнейшего использования в фармакокинетическом анализе, пройдя при этом все этапы разработки и валидации методики, начиная с подбора условий анализа на стандартном образце.

Цель. Разработка вольтамперометрической методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината на стандартном образце.

Материалы и методы. Объектом исследования для подбора оптимальных условий электролиза являлась субстанция 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат, с содержанием действующего вещества 99,9 %, предоставленная фармацевтической компанией «Фармасофт». Индикаторным электродом служил графитовый с золотым напылением, электродом сравнения – хлорсеребряный. В качестве фонового электролита выбрали 0,05 М раствор натрия тетрабората. Раствор стандартного образца готовили путем растворения навески стандартного образца в определенном объеме воды очищенной, исходя из необходимой концентрации стандартного образца. Источником информации служили вольтамперные кривые. При количественном определении этилметилгидроксипиридина сукцината использовали метод добавок. Приведённые цифровые значения, которые статистически обрабатывали согласно ГФ 14 (ГФ XIV, Том 1., 2018), представляли собой среднее из пяти измерений.

Результаты. Для вольтамперометрического определения этилметилгидроксипиридина сукцината в качестве оптимального электрода выбрали графитовый с золотым напылением, так как на нем был выявлен сигнал этилметилгидроксипиридина сукцината (рис.).

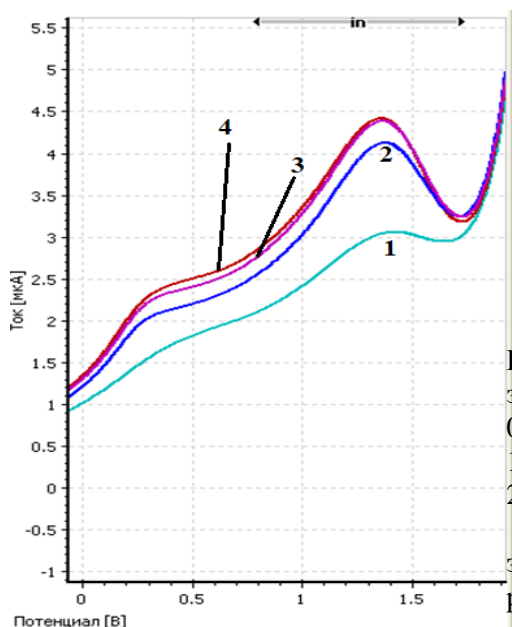


Рис. Вольтамперограмма раствора стандартного образца этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрации 0,1 мг/л при подобранных условиях:

1 – линия фона; линии, соответствующая пробам:
2 - 0,02 мл; 3 – 0,04 мл; 4 – 0,06 мл.

Индикаторный электрод – графитовый электрод с золотым напылением; фоновый электролит – 0,05 моль/л раствор натрия тетрабората

Раствор натрия тетрабората с концентрацией 0,05 М и pH = 8 выбрали в качестве фонового электролита, так как при данных условиях наблюдали широкую рабочую область потенциалов и хорошую электропроводность для обработки сигнала испытуемого образца. Экспериментальным путем установили, что сигнал этилметилгидроксипиридина сукцината был более выражен при использовании анодной вольтамперометрии. Значение потенциала накопления для более полного выделения этилметилгидроксипиридина сукцината на электроде составило (-2,0) В. При потенциале накопления более (-2,0) В сила регистрируемого тока уменьшалась, а при значении потенциала (-1,0) В сигнал уменьшался за счет раздвоения, что затрудняло его обработку. Оптимальное время накопления составило 60 с. При данном значении времени накопления величина тока растворения осадка с поверхности графитового электрода с золотым напылением была максимальной. Кроме того, при таком времени накопления наблюдали хорошую повторяемость результатов. При изменении времени повторяемость резко снижалась. Кроме вышеперечисленных параметров экспериментально установили приемлемую скорость развертки потенциала, значение которой составило 100 мВ/с. При скорости выше или ниже установленной границы вольтамперограммы становились нечеткими, что затрудняло их обработку. Оптимальная область развертки потенциала лежала в пределах (-2,0) – 2,0 В. Таким образом, исследование поведения этилметилгидроксипиридина сукцината на поверхности графитового электрода с золотым напылением позволило подобрать оптимальные условия его концентрирования, дающие четкий сигнал вещества на вольтамперограмме. Метрологические характеристики разработанной методики вольтамперометрического определения этилметилгидроксипиридина сукцината представлены в таблице (табл. 1).

Заключение. Изучено электрохимическое поведение этилметилгидроксипиридина сукцината на графитовом электроде с золотым напылением. Впервые получены вольтамперные кривые этилметилгидроксипиридина сукцината, пригодные для аналитических целей с использованием прибора ТА-4 НПП «Томьаналит». На практике установлены оптимальные условия накопления этилметилгидроксипиридина сукцината: природа фонового электролита его концентрация и pH; потенциал и время накопления; скорость развертки потенциала. Определены границы развертки потенциала.

Таблица 1. Статистическая оценка теста «Повторяемость» для раствора этилметилгидроксипиридина сукцината

Истинное значение, мг/л, μ	Среднее выборочное, X	Дисперсия, S^2	Стандартное отклонение, S	Полуширина доверительно го интервала, $\pm \Delta X$	Относительна я погрешность отдельной варианты, ϵ ,	Относительна я погрешность среднего результата, ϵ ,	Коэффициент Стьюдента, полученный расчетным путем, $t_{\text{выч}}$
10	9,99	$2,013 \cdot 10^{-3}$	$4,487 \cdot 10^{-2}$	$9,377 \cdot 10^{-2}$	0,94	0,21	1,11
1	0,995	$1,642 \cdot 10^{-4}$	$1,282 \cdot 10^{-2}$	$2,678 \cdot 10^{-2}$	3,74	0,60	1,87
0,1	0,09945	$3,133 \cdot 10^{-6}$	$1,770 \cdot 10^{-3}$	$3,699 \cdot 10^{-3}$	3,72	0,83	1,40
0,01	0,009893	$5,443 \cdot 10^{-8}$	$2,333 \cdot 10^{-4}$	$4,876 \cdot 10^{-4}$	4,93	1,10	2,05

Примечание. (f, число степеней свободы - 19; P, доверительная вероятность - 95 %; $t_{(P, f)}$, критерий Стьюдента (табл.), - 2,09).

Литература

1. Баранов П.А., Апполонова С. А., Дикунец М. А., Родченков Г. М., Сариев А. К., Жердев В. П. ВЭЖХ-МС метод определения 2-этилб-метил-3-оксипиридина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 72 (3): 22–28.
2. Воронина Т.А. Отечественный препарат нового поколения мексидол, основные эффекты, механизм действия, применение. Москва:Издательство НИИ Фармакологии РАМН. 2005.20 с.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том 1. ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Москва: 2008. 1814с.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том 3. ФС.2.1.0046.15 «Этилметилгидроксипиридина сукцинат». Москва: 2018. 5187с.
5. Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Вольтамперометрическое определение мексидола. *Химико-фармацевтический журнал*. 2005;39(8):51–52.
6. Методические указания. МУК 4.1.1623—03. Спектрофотометрическое измерение массовых концентраций 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридин сукцината (1:1) (мексидол, мексикор) в воздухе рабочей зоны. 2003. 8с.
7. Лосенкова С.О., Степанова Э.Ф., Новиков В.Е. Особенности методики биофармацевтического исследования трансдермального пластыря с мексидолом. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2009;1:113–116.
8. Черных И.В., Щулькин А.В., Гацанага М.В., Мыльников П.В. Разработка ВЭЖХ методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови крыс и кроликов. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2015;23(1):62–66.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО МОДИФИКАТОРА – АЦЕТОНИТРИЛА НА РАЗДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЗОННОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

М.М. Жилияков*

*Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
г. Санкт-Петербург, Россия
e-mail: fabricosd@mail.ru*

Ключевые слова: капиллярный зонный электрофорез, ароматические аминокислоты, ацетонитрил, органический модификатор.

Введение. Ароматические аминокислоты как объект аналитического контроля повсеместно распространены в качестве компонентов широкого ассортимента продукции фармацевтической, пищевой и биотехнологической промышленности. Определение их качественного и количественного состава, с учетом экономических и временных издержек предприятий является актуальной задачей. Для анализа ароматических аминокислот, в частности препаратов, содержащих их, применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различными способами детектирования и применением предколоночной дериватизации (ГФ XIV, Т.1, ОФС.1.2.1.0025.18), отличающийся дороговизной проведения единичного анализа и трудоемкостью пробоподготовки. Актуальными методами является группа методов капиллярного электрофореза, обладающих рядом преимуществ в сравнении с различными вариациями метода ВЭЖХ, а именно дешевизной, экспрессностью и относительно малыми трудо- и времязатратами на пробоподготовку. Наиболее простым методом среди вышеуказанных является капиллярный зонный электрофорез, основанный на разделении компонентов согласно их заряду и размеру частицы/иона. Для улучшения электрокинетических характеристик осуществляется добавка органических модификаторов в фоновый электролит, что позволяет добиться более эффективного разделения компонентов пробы (ГФ XIV, Т.1, ОФС.1.2.1.0022.15).

Цель. Целью данной работы является исследование изменения эффективности разделения ароматических аминокислот методом капиллярного зонного электрофореза при добавлении различных количеств ацетонитрила в фоновый электролит.

Материалы и методы. В ходе исследования применялись стандартные водные растворы аминокислот тирозина, фенилаланина, и триптофана концентрации 0,001 М, приготовленные по точной навеске (класс чистоты реагентов – ч.). Для маркировки электроосмотического потока (ЭОП) в качестве добавки в анализируемую пробу применялся ацетон х.ч.: в объеме 10 мкл для проб объемом 1мл, 20 мкл для проб объемом 1,2 мл. Загрузка проб и фонового электролита осуществлялась в пробирках типа Эппендорф номинальным объемом в 1,5 мл. Объем фонового электролита на пробирку составлял 1 мл, объемы проб стандартных растворов – 1 мл, объем их смеси - 1,2 мл. В качестве фонового электролита использовался стандартный боратный буферный раствор концентрации 0,05 М и рН = 9,18, разведенный дистиллированной водой и 100%-ым ацетонитрилом так, чтобы объемы исходного буфера и водно-ацетонитрильной смеси находились в соотношении 4:1. Таким образом, были приготовлены растворы с объемным содержанием ацетонитрила 0%, 5%, 10%, 15% и 20% соответственно. Для приготовления смеси

стандартных растворов смешивались объемы по 400 мкл. Для осуществления анализа использовалась система капиллярного электрофореза «Капель® - 105M» с полной и эффективной длиной кварцевого капилляра 60 и 50 см соответственно и внутренним диаметром 75 мкм. Детектор – фотометрический. Напряжение при анализе составляло 20 кВ. Гидродинамический ввод пробы осуществлялся 5 с. Для регистрации и обработки электрофореграмм использовалась программа «Эльфран®». Дегазация проб осуществлялась с помощью лабораторной микроцентрифуги в течении 10 мин. при числе оборотов 6000 об/мин. Для предварительного установления величины пиков для качественного определения каждой аминокислоты в смеси были сняты спектры поглощения индивидуальных растворов, представленных на рисунке 1 наложением трех спектров, разведенных до концентрации 0,0025 моль/л на спектрофотометре Shimadzu UV-1240 диапазоне от 200 до 320 нм.

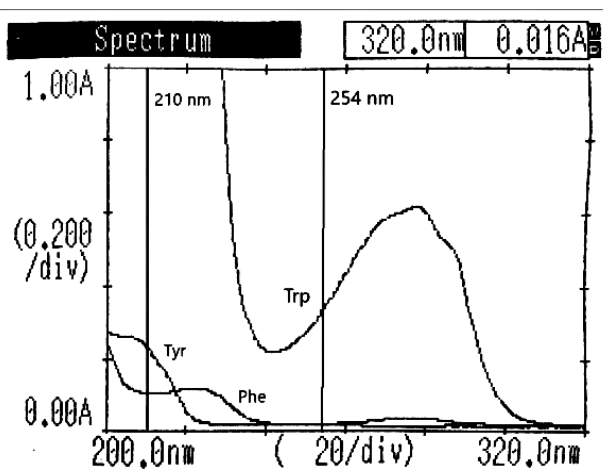


Рис. 1. Наложенные спектры растворов ароматических аминокислот

Стандартные растворы и их смеси анализировались при длине волны 254 нм; также ввиду малого поглощения тирозина и фенилаланина при данной длине волны для уточнения времени миграции компонентов и иных характеристик разделения производилось детектирование смесей стандартных растворов при 210 нм. Анализ стандартных растворов и их смеси проводился пятикратно для каждой из вариаций фонового электролита согласно минимально допустимому количеству измерений (ГФ XIV, Т.1, ОФС.1.1.0013.15).

Результаты. Расчет электрофоретических характеристик и статистическая обработка результатов исследования проводились с помощью программ «Эльфран®» и «Excel 2010». В ходе анализа выявлено значительное снижение скорости миграции фенилаланина, наблюдаемое на рисунке 2, что поспособствовало его разделению с пиком тирозина начиная с концентрации ацетонитрила в 15 %. При концентрации ацетонитрила в 20 % наблюдалось наибольшее разрешение между пиками аминокислот, составлявшее для триптофана и тирозина 2.38 ± 0.13 , тирозина и фенилаланина – 0.83 ± 0.13 . Однако эффективность анализа, выражаемая числом теоретических тарелок, в ходе анализа значительно уменьшилось с пятого до четвертого порядка, что можно наблюдать на рисунке 3.

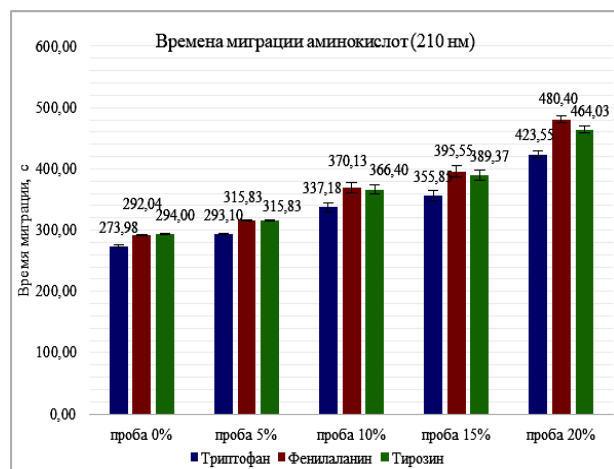


Рис. 2. Времена миграции компонентов

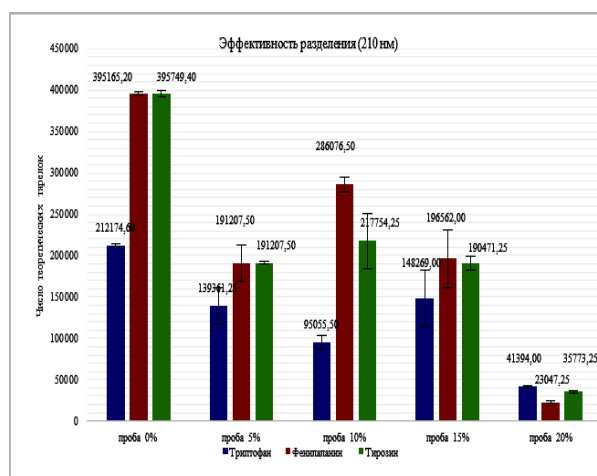


Рис. 3. Времена миграции компонентов

Заключение. В результате проведенной работы выявлено, что при увеличении концентрации ацетонитрила в фоновом электролите возрастает и разрешение между пиками анализируемых веществ, однако значительно уменьшается эффективность разделения, что вызвано постепенным размыванием детектируемой зоны вещества. Концентрация органического модификатора ацетонитрила, позволяющая проводить анализ при полном разделении пиков фенилаланина и тирозина при удовлетворительной эффективности порядка 100 тыс. теоретических тарелок лежит в диапазоне 15 – 20 %. Также выявлен наибольший тормозящий эффект ацетонитрила относительно фенилаланина среди трех проанализированных аминокислот.

Литература

1. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.0025.18 «Аминокислотный анализ». [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.0022.15 «Капиллярный электрофорез» [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
2. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ФИТОМАССЕ ЗВЕРБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО И КУРИЛЬСКОГО ЧАЯ, ВЫРАЩЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ГИДРОПОННОГО МЕТОДА

И.В. Кравченко*, М.А. Мулюкин З.А. Самойленко, Т.А. Макарова, Н.М. Гулакова

БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа-Югры

«Сургутский государственный университет», г. Сургут, Россия

e-mail:kravinessa@mail.ru

Ключевые слова: звербой продырявленный, курильский чай, гидропоника.

Введение. Проблема накопления тяжёлых металлов лекарственным растительным сырьём требует к себе повышенного внимания в связи с постоянной усиленной техногенной нагрузкой на объекты окружающей среды. Особенно это актуально для территорий Ханты-Мансийского автономного округа, центра нефтяной и газовой промышленности Западной Сибири. Уровень накопления тяжёлых металлов в фитомассе растений зависит не только от их наличия в почве, но и от степени загрязнения атмосферного воздуха отходами транспорта и промышленности. Одним из путей попадания поллютантов в организм человека является лекарственное растительное сырьё, которое используется для изготовления различных биологически активных добавок и фитопрепаратов. В связи с этим выращивание экологически чистого качественного лекарственного растительного сырья гидропонным методом, в условиях светокультуры является актуальным.

Цель. Изучение содержания тяжёлых металлов в лекарственном растительном сырье звербоя продырявленного и курильского чая, выращенных с помощью гидропонного метода. В задачи исследования входило вырастить образцы звербоя продырявленного и курильского чая в условиях вертикальных ферм; определить содержание тяжёлых металлов (Ni, Pb, Cr, Cd, Cu, Zn) в надземной фитомассе; провести сравнение полученных данных с СанПиН и литературными источниками.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования были выбраны следующие виды лекарственных растений: звербой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.), курильский чай (*Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz). Звербой продырявленный относится к растениям семейства Звербойные, курильский чай – к семейству Розовые (Буданцев А.Л., 2009). Выбор данных видов лекарственных растений для элементного анализа обусловлен тем, что звербой продырявленный содержит в своей зелёной массе каротиноиды, флавоноиды, катехины, антоцианы, эфирное масло, фенольные соединения (Буданцев А.Л., 2009), курильский чай – полифенольные и флавоноидные соединения, катехины, гликозиды, кумарины и др. (Буданцев А.Л., 2009). Исследуемые виды лекарственного растительного сырья нашли своё широкое применение в парфюмерной, пищевой, фармацевтической промышленности и при фитотерапии заболеваний различной этиологии, так как обладают кровоостанавливающим, противомикробным, противовоспалительным, гепатопротекторным, иммуностимулирующим, антиоксидантным, фунгицидным, антибактериальным, гипогликемическим, противоязвенным и другим действием (Буданцев А.Л., 2009). В ходе исследования лекарственные растения выращивались на вертикальных гидропонных установках в двух вариантах освещения и в несколько циклов. Первый вариант: освещение с красными, белыми и синими светодиодами при соотношении 32:16:32. Красный спектр имел длину волны 625 нм, синий 470 нм, световой поток составлял 6573 лм, PPF 143 мкмоль/с/м². Второй вариант был представлен белыми диодными лампами. Световой поток составил 8000 лм, цветовая температура 4000 К, PPF 165 мкмоль/с/м². При выращивании лекарственных растений постоянно поддерживался 16-часовой световой режим. Стеллажи с растительным сырьём отделялись друг от друга светонепроницаемой пленкой (Макаров П.Н. и др., 2019). Растения поливались трижды в сутки питательным раствором с использованием полностью растворимых в воде комплексных удобрений с микроэлементами Yara Fertilcare hydro и кальциевой

селитры. В питательном растворе присутствует медь и цинк в минимальной дозе (0,00012 г/л). Зверобой продырявленный выращенный в условиях гидропоники перед срезкой имел среднюю длину побегов $60,7 \pm 3,03$ см, курильский чай – в среднем $42,4 \pm 1,17$ см. Сбор растительного лекарственного материала проводился в соответствии с ГОСТ 24.027.0-80 (ГОСТ 24.027.0-80 1980). В ходе работы были отобраны надземные части растений – листья и стебли. Срезанное растительное сырьё высушивали в лаборатории до воздушно-сухого состояния и перемалывали в лабораторном гомогенизаторе. После этого отобранные образцы подвергались сухому озолению в электропечи ЭКПС-10. Определение химических элементов проводили в золе, полученной из надземной части растений путем растворения в 5М азотной кислоте (ГОСТ 30178-96 1996). Содержание тяжёлых металлов (Ni, Pb, Cr, Cd, Cu, Zn) определяли атомно-абсорбционным методом на спектрометре МГА 915-МД. Диапазон безопасных концентраций для этих химических элементов, относящихся к группе тяжёлых металлов, довольно небольшой и в настоящее время нормируется только для пищевых растений и биологически активных добавок к пище (СанПиН 2.3.2.1078-01 2002; Соколов О.А., 1999). Исследования по изучению микроэлементного состава зверобоя продырявленного и курильского чая проводились в 2021 г. на кафедре биологии и биотехнологии, на базе Центра коллективного пользования, Научно-образовательного центра Института естественных и технических наук Сургутского государственного университета при финансовой поддержке Департамента образования и молодежной политики ХМАО-Югры в рамках проекта «Технология выращивания и извлечения биологически активных соединений северных ягодных культур и лекарственных трав (ЮграБиоФарм)», № 2020-146-11.

Результаты. Результаты определения тяжёлых металлов представлены в таблице и свидетельствуют о количественных различиях их элементного состава (таблица 1). В фитомассе зверобоя продырявленного, выращенного как под белыми, так и под цветными лампами, более высоким оказалось содержание цинка и меди. Содержание таких элементов как никель и хром было примерно на одном уровне. Тогда как в образцах, выращенных под белыми лампами, в большей степени аккумулируется свинец и кадмий, по сравнению с образцами растений, выращенных под цветными светодиодными лампами. Надземная часть курильского чая, выращенного под белыми светодиодными лампами, больше аккумулирует свинец и цинк. Тогда как в растительной массе, выращенной под цветными лампами, больше накапливается цинка. В образцах, выращенных под цветными светодиодными лампами, больше аккумулируется кадмия, по сравнению с образцами, выращенными под белыми лампами. Содержание никеля, хрома и меди было примерно на одном уровне.

Таблица 1. Содержание тяжёлых металлов в фитомассе *Hypericum perforatum* и *Pentaphylloides fruticosus* (мг/кг сухого вещества)

Растения	Исследуемые химические элементы					
	Ni	Pb	Cr	Cd	Cu	Zn
Зверобой продырявленный (БЛ)	3,02±0,18	1,67±0,05	0,95±0,06	0,50±0,03	3,84±0,14	31,21±0,14
Зверобой продырявленный (ЦЛ)	3,14±0,19	1,00±0,04	1,00±0,02	0,09±0,005	5,55±0,03	33,17±0,36
Курильский чай (БЛ)	2,63±0,17	5,61±0,17	0,94±0,05	0,09±0,006	1,05±0,02	47,28±0,71
Курильский чай (ЦЛ)	2,32±0,09	2,81±0,10	1,41±0,004	0,44±0,03	1,13±0,01	33,47±0,15
ПДК СанПиН 2.3.2.1078-01 (1.10.7) (СанПиН 2.3.2.1078-01, 2002)	-	6,0	-	1,0	-	-
ПДК СанПиН 2.3.2.1078-01 (1.6.10) (СанПиН 2.3.2.1078-01, 2002)	-	10,0	-	1,0	-	-
Литературный источник (Соколов О.А., 1999)	0,1-3,0	0,21-6,0	-	-	5,0-55,0	7,5-490,0

Примечание. БЛ – белые лампы (освещение растительного материала белыми диодами), ЦЛ – цветные лампы (освещение растений белыми, красными, синими диодами), – нет данных в литературе.

Исходя из полученных результатов, построены ряды убывания аккумулируемых лекарственными растениями тяжёлых металлов:

- для зверобоя продырявленного (БЛ): Zn > Cu > Ni > Pb > Cr > Cd;
- для зверобоя продырявленного (ЦЛ): Zn > Cu > Ni > Pb и Cr > Cd;
- для курильского чая (БЛ): Zn > Pb > Ni > Cu > Cr > Cd;
- для курильского чая (ЦЛ): Zn > Pb > Ni > Cr > Cu > Cd.

Сравнение с данными санитарных норм (СанПиН 2.3.2.1078-01 2002) и с литературным источником (Соколов О.А., 1999) показало, что содержание тяжёлых металлов (свинца, цинка, меди, никеля, хрома, кадмия) в исследованных образцах *Hypericum perforatum* и *Pentaphylloides fruticosus* находится в пределах допустимых значений, принятых для биологически активных веществ в пищевых продуктах на растительной основе. **Заключение.** Таким образом, целесообразно расширять исследования по изучению биохимического состава зверобоя продырявленного и курительского чая, выращенных с помощью гидропонного метода, для дальнейшего использования лекарственного растительного сырья в целях заготовки и производства биологически активных добавок.

Литература

1. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т.2. Семейства Actinidiaceae - Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae. Санкт-Петербург, Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2009. 513 с.
2. ГОСТ 24.027.0-80. Сырьё лекарственное растительное. Правила приемки и методы отбора проб. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200022938>.
3. ГОСТ 30178-96. Сырьё и пищевые продукты. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200021152>. – Загл. с экрана.
4. Макаров П.Н., Макарова Т.А., Самойленко З.А., Выращивание зеленных культур в закрытых системах. *Безопасный Север – чистая Арктика*. 2019:166-180.
5. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Москва: Издательство стандартов, 2002. 180 с.
6. Соколов О.А., Черников В.А. Экологическая безопасность и устойчивое развитие. Книга 1. Атлас распределения тяжелых металлов в объектах окружающей среды. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1999. 163 с.

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ СЫРЬЯ *RHODIOLA QUADRIFIDA*

А.В. Лёзина*, И.И. Тернинко, М.А. Романова

*Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
г. Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: alena.lezina@pharminnotech.com

Ключевые слова: родиола четырехлепестная, колоночная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, индивидуальные соединения. **Введение.** Родиола четырехлепестная *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & С.А. Меу (красная щётка) - многолетнее травянистое растение, семейства Толстянковые (*Crassulaceae*). Произрастает преимущественно на территории юга Сибири, в горах восточного Саяна (Овдин М.Е 2017), в Тибете (Chiang Н.М. et al., 2015), местообитание - каменистые склоны, щебнистые высокогорья. Сырьё (корневища и корни) р. четырехлепестной активно применяется в форме биологически активных добавок (БАД) как самостоятельно, так и в комбинации с другими растениями в качестве дополнительного метода лечения различных патологий. Например, в традиционной Тибетской медицине (ТТМ) красная щётка применяется в лечении заболеваний мочевыводящих путей (Li T. et al., 2008). В качестве БАД р. четырехлепестная применяется в Украине (Khokhlova K. et al., 2020). В Российской Федерации р. четырехлепестная зарегистрирована в форме самостоятельного БАД, а также в комбинации с ортилией однобокой (*Orthila secunda* L.) (мамка боровая), которую применяют в народной медицине при лечении заболеваний женской репродуктивной системы таких как эндометриоз, дисменорея, аменорея и др. (Ботоева Е.А., 2003). Применение родиолы четырехлепестной в официальной медицине ограничено, поскольку в литературе отсутствуют данные о фитохимическом составе основных групп биологически активных веществ (БАВ), также не определены маркерные соединения и, как следствие, не установлены параметры стандартизации. Все это указывает на актуальность комплексного фитохимического исследования ЛРС р. четырехлепестной. ВЭТСХ анализ показал наличие в сырье р. четырехлепестной видоспецифичных фенольных спиртов (салидрозид и тирозол) и указал на отличие данного вида родиолы от официального р. розовой (Лёзина А.В., 2021). Поэтому представляет практический интерес выделение отдельных веществ р. четырехлепестной в индивидуальном состоянии для установления профиля маркерных соединений.

Цель. получение фракций сырья р. четырехлепестной и их последующее предварительное изучение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ТСХ.

Материалы и методы. Материалом исследования служили корневища и корни р. четырехлепестной *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & С.А. Меу, приобретенной в аптечной сети в качестве БАД г. СПб (по данным на упаковке заготовка осуществлялась в 2019 г. в Алтайском крае). Методика получения спиртового извлечения (разработана Университетом Турку): 50 грамм ЛРС экстрагировали 500 мл 80%

спирта этилового на ультразвуковой бане при 50°C в течение 15 минут в двух повторностях. После экстракции объединенное извлечение центрифугировали на скорости 3000 об/мин 10 минут. Надосадочную жидкость сливали и упаривали в роторно-пленочном испарителе до состояния тянущейся субстанции. После этого ее растворяли в 300 мл метанола «хч», отстаивали в холодильнике (не более +8°C) в течение 24 часов. Полученный раствор центрифугировали в тех же условиях, надосадочную жидкость упаривали и растворяли в 20 мл 50% водного метанола «хч». Полученный раствор наносили на колонку, заполненную силикагелем (марка «Silicagel L», размер частиц 40/100), который промывали и активировали путем последовательного пропуска 400 мл воды очищенной и 200 мл метанола «хч». Последовательно пропускали через колонку с нанесенным экстрактом воду очищенную (собирали 5 подфракций водной фракции по 100 мл) и метанол (аналогично собирали 5 подфракций по 100 мл метанольной фракции). Полученные фракции исследовали методом ВЭЖХ и ТСХ. Стандартные образцы (СО) (Sigma-Aldrich) растворяли в этиловом спирте 96% «хч» для получения растворов заданной концентрации. Идентификацию фенолкарбоновых кислот (ФКК) проводили на пластинках Sorbfil 10×20 см в системе этилацетат: толуол: кислота муравьиная безводная: вода (30:10:5:2). Раствор для детектирования - железа (III) хлорид спиртовой 1%. Объем наносимой пробы испытуемого раствора и раствора СО (галловой кислоты (1 мг/мл)) составлял 4 мкл, прохождение фронта 90%. Идентификация после обработки раствором для детектирования осуществлялась в дневном свете. Исследование на содержание антраценпроизводных проводили в системе этиловый спирт 96%: хлороформ: толуол: ледяная уксусная кислота (соотношение 15:15:10:10). Объем наносимой пробы испытуемого раствора - 2 мкл, растворов СО (алоин (0,1 мг/мл), ализарин (0,1 мг/мл)) - по 5 мкл. Прохождение фронта 85%. Идентификацию пятен осуществляли после нагревания пластинки при 100°C в течение 3 минут в фильтрованном УФ-свете при длине волны 366 нм. После чего пластинку обрабатывали 2% спиртовым раствором магния ацетата, выдерживали при 100-105°C и просматривали в УФ-свете при такой же длине волны. Определение фенольных спиртов (салидрозида (1 мг/мл) и тирозола (1 мг/мл)) осуществляли в системе этилацетат: метанол: вода: муравьиная кислота (77:13:10:2); прохождение фронта 85%. Объемы наносимых проб: испытуемый раствор - 2 мкл, СО - 15 мкл. Идентификацию пятен осуществляли при дневном и УФ-свете при двух длинах волн 254 и 366 нм. Высокоэффективная жидкостная хроматография была осуществлена на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) с диодноматричным детектором SPD-M20A. Колонка Phenomenex CN0-5171 (250×4.6 мм, 5 мкм). Температура термостата колонки 30°C, объем вводимой пробы 20 мкл. Скорость потока элюента равна 1,2 мл/мин. Подвижная фаза - метанол: вода в соотношении 10:90. Детектирование осуществлялось при длине волны 280 нм. Обработку результатов проводили с помощью программы LabSolution.

Результаты. Полученные подфракции водной фракции имели интенсивную красную окраску. Результаты ТСХ-анализа позволили идентифицировать в водной фракции только галловую кислоту. ТСХ-анализ на содержание антраценпроизводных и фенольных спиртов не дал положительного результата. Хроматограммы водной и метанольной фракций (1 подфракция каждой фракции) приведены на рисунках 1 и 2.

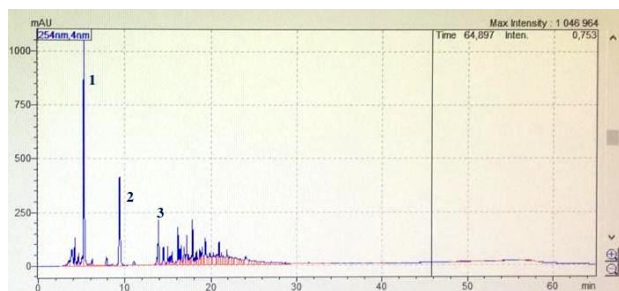


Рис. 1. Хроматограмма водной фракции (1 подфракция)

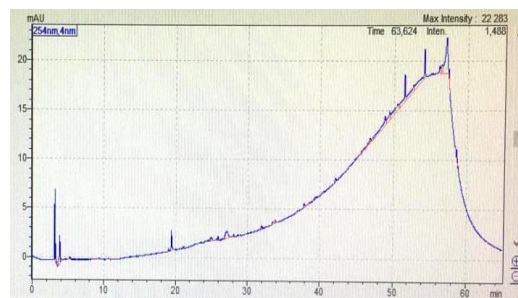


Рис. 2. Хроматограмма метанольной фракции (1 подфракция)

Данные ВЭЖХ-анализа метанольной фракции показали ее не информативность (пики веществ на уровне шумов), поэтому приняли решение отказаться о ее дальнейшего изучения. Хроматограмма 1 подфракции водной фракции показала наличие пиков ряда веществ со значительной интенсивностью, среди которых хорошие хроматографические характеристики и оптимальное разрешение с близлежащими пиками имеют 1, 2 и 3 пик. Данные вещества рассматриваются нами как целевые и в дальнейшем будет проведено их выделение методом препаративной хроматографии и установление структуры. Полученные данные по оставшимся (2-4) подфракциям водной фракции не являются информативными и имеют аналогичный набор соединений, однако с значительно меньшей интенсивностью, что говорит о том, что данные вещества являются водорастворимыми и максимально элюируются первой порцией воды очищенной.

Заключение. Проведено фракционирование спиртового извлечения из сырья р. четырехлепестной, в результате которого были получены водная и метанольная фракции. Метанольная фракция по результатам ВЭЖХ-анализа не содержала пиков веществ, поэтому была признана неинформативной. В водной фракции

методом ТСХ установлено наличие галловой кислоты и отсутствие родоспецифичных фенолоспиртов (салидрозида и тирозола) и антраценпроизводных, что дает возможность предположить, что интенсивная окраска фракции обусловлена присутствием комплексных полифенольных соединений (танинов). Методом ВЭЖХ в водной фракции идентифицированы пики веществ с удовлетворительными хроматографическими характеристиками, которые в дальнейшем будут нами выделены с целью установления их структуры.

Литература

1. Ботоева Е. А., Ломбоева С. С., Бураева А. Б., Чукаев С. А. Химическое и фармакологическое исследование ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.). *Сибирский медицинский журнал*. 2003;36(1):69–72.
2. Лёзина А.В., Романова М.А. Изучение отдельных классов фенилпропаноидов растений рода *Rhodiola* методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии. *Сборник материалов XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего»*. 2021;2(1):68-73.
3. Овдин М.Е., Ананин А.А. и др. Природа Байкальской Сибири: труды заповедников и национальных парков Байкальской Сибири. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2017. 208с.
4. Chiang H.M., Chen H.C., Wu C.S., Wu P.Y., Wen K.C. *Rhodiola* plants: Chemistry and biological activity. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015;23(3):359-369. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.04.007.
5. Khokhlova K., Zdoryk O. Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles. *Natural Product Research*. 2020;34(19):2842-2846. DOI: 10.1080/14786419.2019.1591398.
6. Li T., Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (Crassulaceae) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microscopy Research and Technique*. 2008;71(6):448-58. DOI: 10.1002/jemt.20570.

ТВЕРДОФАЗНОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ (ГРОССГЕМИНА И ЦИНАРОПИКРИНА) ИЗ ЭКСТРАКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ВАСИЛЬКА ШЕРОХОВАТОГО (*CENTAUREA SCABIOSA* L.)

В.Э. Мамедова*

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Центральная научно-исследовательская лаборатория, г. Томск, Россия
e-mail: mam3dovaval@yandex.ru

Ключевые слова: твердофазное концентрирование, динамическая емкость, гроссгемин, цинаропикрин.

Введение. Экстракция активных компонентов извлечений является важной стадией пробоподготовки в химическом анализе растительного сырья. На этапе экстракции возможна очистка от сопутствующих компонентов матрицы, а также концентрирование целевых веществ. Фитохимические исследования показали, что основными действующими веществами в химическом составе василька шероховатого являются сесквитерпеновые лактоны (гроссгемин и цинаропикрин) (Каминский И.П., 2001), обладающие противоописторхозной (Каминский И.П. и др., 2019) и гиполипидемической (Ратькин А.В. и др., 2014) активностью. Данные вещества являются перспективными для создания лекарственных препаратов, однако выделение и концентрирование лактонов для целей анализа лекарственного растительного сырья остается малоизученным. В настоящее время (Сычев К.С. и др., 2004; Халиков И.С., 2016; Хасанов В.В. и др., 2018) для извлечения целевых компонентов из сложной матрицы используются такие сорбционные материалы, как алкилированные силикагели, углеродные, сверхсшитые полимерные, полимеры с молекулярными отпечатками, углеродные наноматериалы – нанотрубки, фуллерены, графен и его оксиды, и другие адсорбенты.

Цель. Изучить процессы сорбционного извлечения гроссгемина и цинаропикрина из экстрактов растительного сырья и разработать методику ТФЭ для последующего хроматографического определения.

Материалы и методы. В качестве концентрирующих материалов использовали патроны (I = 6 см), заполненные сорбентами на основе силасорб 600 (Sil - 600), оксида алюминия нейтрального (PF-ALN), модифицированного силикагеля NH₂ (PF-NH₂) и C18 (PF-C18). При разработке схемы ТФЭ в качестве элюентов использовали гексан / хлороформ (1:3; 4:6; 5:5; 6:4; 3:7), хлороформ 99%, гексан 99%, изопропиловый спирт (70, 80, 99%) и ацетонитрил (30, 40, 50, 60, 70, 80, 99%). Адсорбцию гроссгемина и цинаропикрина в динамическом режиме измеряли путем пропускания стандартных растворов в воде, хлороформе и ацетонитриле, определяя содержание аналитов в каждой порции элюата (1 мл) методом спектрофотометрии при длине волны 240±2 нм. Элюаты сушили в токе азота при 20-25°C, используя генератор азота N2-04 (Parker Balston, США). Хроматографическое определение компонентов осуществляли на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 с детектором на диодной матрице PDA-3000 фирмы (Dionex, США), с использованием колонки Luna C18(2), 100 Å, 250x4.6 мм.

Результаты. Изучение сорбционных характеристик. Получены выходные динамические кривые сорбции сигмоидальной формы для гроссгемина и цинаропикрина (рисунок 1). На основании кривых сорбции определяли «объем до проскока» V_b , (V_b (гроссгемин) = 1,6 мл; V_b (цинаропикрин) = 1,7 мл) и динамическую емкость (ДЕ) сорбента (ДЕ (гроссгемин) = 2,04 моль/г; ДЕ (цинаропикрин) = 2,05 моль/г).

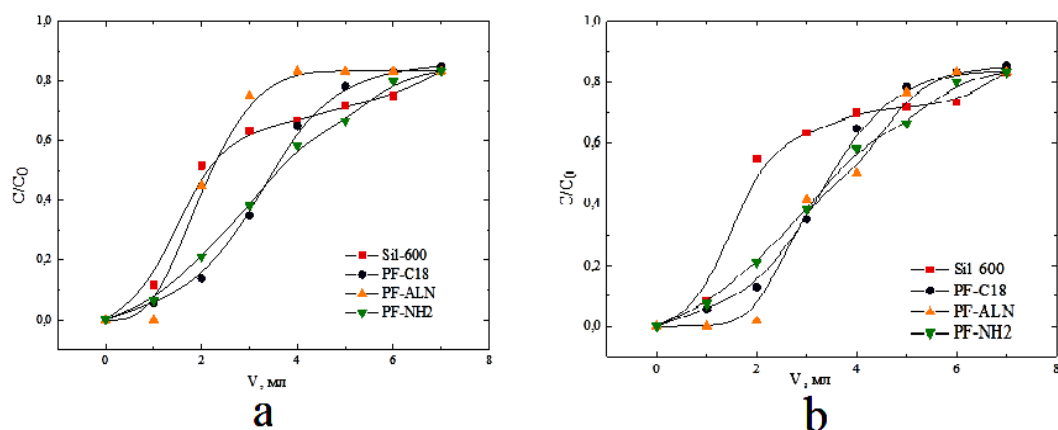


Рис. 1. Выходные динамические кривые гроссгемина (а) и цинаропикрина (б) при пропускании стандартных растворов $C=0,6$ мг/мл.

Проведение твердофазной экстракции. Аликвоту 1 мл экстракта загружали, далее патроны, заполненные сорбентами Sil-600 и PF-ALN, промывали 6 мл смеси 1:3 гексан / хлороформ, после чего элюировали последовательно 3 мл хлороформа и 6 мл изопропилового спирта. Элюирование с патронов, заполненных сорбентом PF - C18, проводили 6 и 3 мл раствора ацетонитрил / вода 3:7 и 7:3, соответственно. Патроны, заполненные сорбентом PF-NH₂, промывали 3 мл ацетонитрила и элюировали 3 мл 99 % ацетонитрила и 3 мл смеси 8:2 ацетонитрил / вода. При элюировании собирали фракции по 1 мл. Полученные фракции анализировали методом ОБ ВЭЖХ, в результате чего построен профиль элюирования (рис. 2).

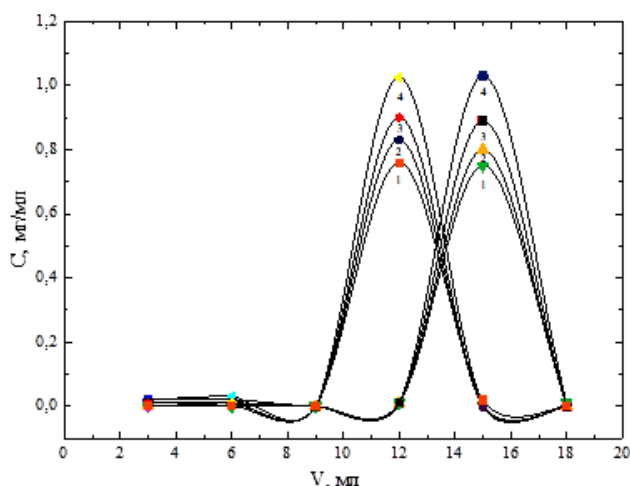


Рис. 2. Профиль элюирования для гроссгемина (а) и цинаропикрина (б) с патронов в разработанных условиях: 1-PF-C18, 2-PF-NH₂, 3-PF-ALN, 4-Sil-600

Из профиля элюирования видно, что гроссгемин и цинаропикрин с наибольшей концентрацией выходят с патронов при элюировании изопропиловым спиртом и хлороформом на Sil-600 в объеме 11–13 мл и 15 мл, соответственно. Полученные данные показывают, что разделение гроссгемина и цинаропикрина возможно при использовании выбранных сорбентов в разработанных условиях, но для эффективного концентрирования целевых компонентов требуется дальнейшее рассмотрение дополнительных факторов (рН, масса сорбента, время контакта с твердой фазой, объем загрузки пробы), влияющих на ТФЭ или использование других сорбентов.

Заключение. Изучены сорбционные процессы и разработана методика ТФЭ гроссгемина и цинаропикрина из экстрактов надземной части василька шероховатого для их последующего хроматографического определения.

Литература

1. Каминский И.П. Сесквитерпеновые лактоны *Centaurea scabiosa* L. Химическое исследование и разработка методов их анализа: Дисс... канд. фарм. наук. Улан-Удэ: Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, 2011. 133 с.

2. Каминский И.П., Кадырова Т.В., Иванов В.В., Белоусов М.В. Противоопиаторхозная активность некоторых видов рода василек (*Centaurea*) флоры Западной Сибири. *Традиционная медицина*. 2019;1(56):18–23.
3. Ратькин А. В., Кайдаш О. А., Иванов В. В., Венгеровский А.И., Адекенов С.М., Чучалин В.С. Эффекты гроссгемина и гроссмизина при модели острой гиперлипидемии, индуцированной этанолом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014;13(1):67–72.
4. Сычев К.С., Даванков В.А. Материалы и методы проподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2004; 4(1):5–28.
5. Халиков И.С. Твердофазная экстракция фенола в воде с помощью сверхсшитого полистирола. *Вестник научных конференций*. 2016;7-3(11):129-130.
6. Хасанов В.В., Макарычева А.И., Слизов Ю.Г. Особенности применения твердофазной экстракции водных образцов при определении микропримесей органических соединений. *Экстракция и мембранные методы в разделении веществ*. 2018:95-96.

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕТУЛИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ

Е. Нурпейис*, Г.Б. Слепченко

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия

e-mail: enlik.nurpeis.94@mail.ru

Ключевые слова: бетулин, вольтамперометрия, биологическая активная добавка.

Введение. Пентациклические тритерпеноиды представляют собой самый большой класс органических соединений, широко распространенных в растениях. Одним из главных представителей данного класса органических соединений это бетулин. Бетулин существует в больших количествах в свободной форме в наружной коре белой березы. Обильная доступность бетулина из природных ресурсов вызывает большой исследовательский интерес к его применению (Pavlova N.I. et al., 2003; Толстиков А.Г. и др., 2005). Молекулярная структура природного соединения представлена на рисунке 1.

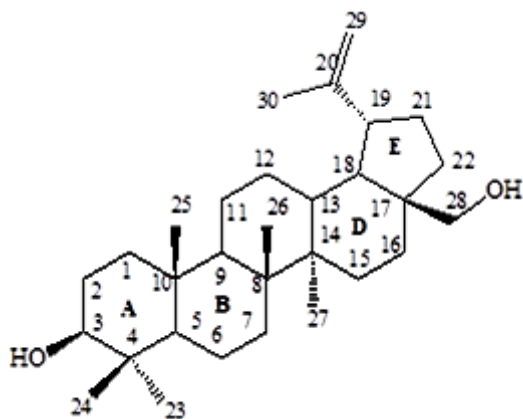


Рис. 1. Структурная формула бетулина

3β,28-дигидрокси-20(29)-лупен или луп-20(29)-ен-3β,28-диол

Природные соединения веками использовались как средство борьбы с различными заболеваниями. Одним из самых полезных средств естественного происхождения была береста белая, используемая в народной медицине. Напитки или компрессы из коры, богатые бетулином, используются для лечения неинфекционных кишечных заболеваний (Yogeeswari P., 2005). Проведенные многочисленные исследования доказывают широкий диапазон биологической активности как бетулина, бетулиновой кислоты и ее производных: противовирусное, противовоспалительное, антиаллергенное, антигипоксическое, защитное средство для печени и противотуберкулезное средство (Малыгина Д.С., 2019). Кроме того, бетулин представляет интерес для применения в пищевой промышленности в качестве функционального ингредиента (Салихова Г.Г., 2021). Для определения бетулина в биологически активных добавках и функциональных продуктах питания, требуется разработка чувствительных и селективных аналитических методов. Анализ литературных источников показал, что для определения чаще применяются хроматографические методы, такие как ВЭЖХ (Zhao G. et al., 2007) или ГХ–МС (Wei L. et al., 2005). Применение электрохимических методов анализа, а в частности, вольтамперометрии является перспективным для разработки методики определения бетулина в БАДах.

Цель. Разработка условий вольтамперометрического определения бетулина в БАД на графитовом электроде.

Материалы и методы. Электрохимическое определение бетулина проводили на вольтамперометрическом комплексе СТА (ТУ 4215-001-20694097-98), содержащий три электрохимические ячейки. В работе

использовалась трехэлектродная электрохимическая ячейка с кварцевыми стаканчиками. В качестве рабочего электрода применяли графитовый электрод. Электродом сравнения и вспомогательным электродом служили хлоридсеребряные электроды, заполненные 1М раствором КСl. В качестве фонового электролита использовался 0,1М щелочной раствор NaOH. В качестве объекта исследования использовали биологически активную добавку «Бетулин» (99,9% чистоты, рисунок 2), изготовленную компанией «Betulafarm».



Рис. 2. Биологическая активная добавка «Бетулин», изготовитель Betulafarm (Россия)

Для приготовления стандартного раствора бетулина природное соединение растворяли в этанол:хлороформ в соотношении 3:1.

Результаты. Способ количественного определения бетулина включает перевод из пробы в раствор и вольтамперометрическое определение с использованием графитового электрода. В результате проведенных исследований нами подобраны рабочие условия определения бетулина, получены вольтамперограммы и градуировочная зависимость бетулина (рисунок 3). Правильность полученных результатов проверяли методом «введено-найдено».

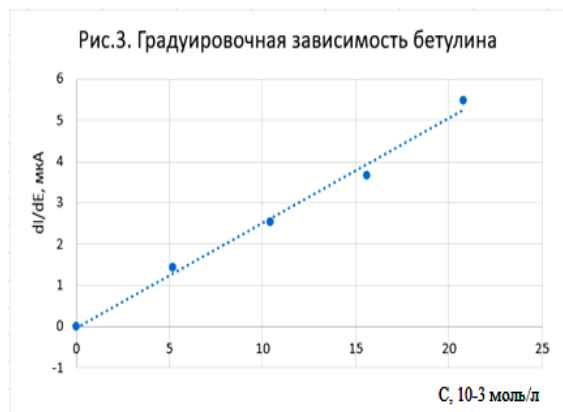


Рис. 3. Градуировочная зависимость бетулина, полученная на графитовом электроде. Фоновый электролит – 0,1М раствор натрия гидроксида.

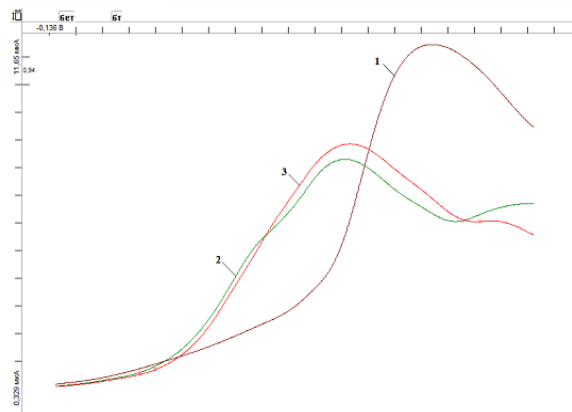


Рис. 4. Вольтамперограмма бетулина на графитовом электроде: 1 – фоновый электролит 0,1М NaOH, 2 –Аликвота БАД объемом 0.20 мл; 3 – добавка стандартного раствора бетулина, $C_{\text{бет}} 575 \text{ мг/дм}^3$. $W = 35 \text{ мВ/с}$, $t_{\text{нак}} = 25 \text{ с}$, $E_{\text{нак}} = -1,0 \text{ В}$, дифференциальный режим регистрации.

В качестве фонового электролита выбран 0,1М раствор натрия гидроксида, при котором получены наиболее выраженные аналитические сигналы бетулина. Экспериментально определены параметры электрохимического накопления бетулина на графитовом электроде -1,0В в течение 25 с. Установленные экспериментальные условия определения бетулина методом инверсионной вольтамперометрии позволяют разработать методику определения содержания бетулина в биологической активной добавке. Высоту пика аналитического сигнала бетулина на щелочном фоновом электролите фиксировали в диапазоне 1,2–1,3В (рисунок 4). Массовую концентрацию оценивали методом добавок аттестованных смесей.

Заключение. В результате проведенных исследований подобраны рабочие условия для количественного определения содержания бетулина в биологической активной добавке. Разработан высокочувствительный электрохимический метод определения содержания бетулина методом «введено-найдено» и методом добавок аттестованных смесей.

Литература

1. Малыгина Д.С. Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина. Дисс...канд. фарм. наук. Нижний Новгород: Приволжский исследовательский медицинский университет, 2019. 162 с.
2. Салихова Г.Г. Перспектив применения бетулина в пищевой промышленности. *Теория и практика современной аграрной науки*. 2021:815-817.

3. Толстиков А.Г., Флехтер О.Б., Балтина Л.А., Шульц Э.Э. Бетулин и его производные. *Химия и биологическая активность: Химия в интересах устойчивого развития*. 2005;3:1 – 30.
4. Guoling Zhao, Weidong Yan, Dan Cao. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;43(3):959-962.
5. Li Wei, Li Xian, Li Zhan-lin, et al. Chemical components of *Carpophorus Xanthoceras sorbifolia* Bunge. *Journal Shenyang Pharmaceutical University*. 2005;22(5):345 – 347.
6. Pavlova N.I., Savinova O.V., Nikolaeva S.N. Antiviral activity of botulin, betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. *Fitoterapia*. 2003;74:489
7. Yogeewari P, Sriram D. Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties. *Curr Med Chem*. 2005;12(6):657–666.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХИНОЛИЗИДИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ В СЕМЕНАХ ЛЮПИНА
ДИКОРАСТУЩЕГО И ТЕРМОПСИСА ЛАНЦЕТНОГО МЕТОДАМИ
КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ВЭЖХ

М.В. Сандрюхина*, Т.Г. Никитина

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: marina.sandriukhina.01@mail.ru

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, алкалоиды, люпин, инструментальные методы анализа.

Введение. Многие алкалоиды уже давно используются в медицине. Одним из таких является спартеин. Он снижает уровень глюкозы в организме и инициирует выработку инсулина, оказывает умеренное обезболивающее действие, и действует как противосудорожное и противоэпилептическое средство. Используется в составе противоритмических препаратов (Вишнякова М.А. и др., 2020). Данный алкалоид содержится в растениях рода *Lupinus* и *Thermopsis*. Наряду со спартеином в семенах люпина содержатся: люпинин, люпанин и гидроксилупанин, в листьях термопсиса: термопсин, гомотермопсин, метилцитизин, анагириин. Некоторые из этих веществ так же используются при изготовлении лекарственных препаратов, но в меньшей мере.

Цель. Целью настоящего исследования является анализ различных проб алкалоидов и выявление оптимального способа пробоподготовки для дальнейшего количественного анализа.

Материалы и методы. Было проанализировано три различные пробы алкалоидов, выделенных из семян люпина и две пробы алкалоидов, выделенных из листьев термопсиса. Методы выделения алкалоидов были разработаны для нахождения наиболее оптимального способа пробоподготовки.

Люпин. Одна из проб была приготовлена из не измельченных семян люпина (проба 1). Для проб 2 и 3 пробоподготовка семян люпина включала стадию их измельчения с добавлением 5% (по массе) карбоната натрия. Далее производилось экстрагирование БАВ. В пробе №3 в отличие от пробы №2 для перевода алкалоидов из солевой формы с имеющимися в растениях органическими кислотами использовался карбонат натрия. Стадию извлечения алкалоидов из фазы хлороформа предваряла его обработка 5% водным раствором щелочи. Реэкстракции алкалоидов производилась 5% раствором соляной кислоты.

Термопсис. Первая проба алкалоидов была получена замачиванием листьев сухого термопсиса в разбавленной уксусной кислоте, далее производилось выдерживание в течение некоторого количества времени на ультразвуковой бане. Вторая проба была приготовлена посредством экстрагирования в хлороформе и обработки водным раствором щелочи.

Тонкослойная хроматография. Для подбора оптимальной подвижной фазы были проведены исследования с помощью модельного вещества: хинина. В качестве элюентов использовались – этиловый спирт, бутиловый спирт, хлороформ, уксусная кислота, этилацетат в различных качественных и количественных соотношениях. Анализ проводился на пластинках с силикагелем ТСХ-флуоразмером 8 × 4 см. В некоторых экспериментах для обнаружения пятен использовали проявление в парах иода.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Анализ проб проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-10 со спектрофотометрическим детектированием ($\lambda = 220$ нм) и хроматографической колонкой (4.6 x 250 мм), заполненной обращено-фазовым сорбентом Phenomenex Luna C18 (5 мкм). Все эксперименты проводили при изократическом элюировании смесью CH_3CN (10%) – 0.1% H_3PO_4 (90%) и скорости потока 1.0 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл. Так же был использован хроматограф Милихром А-02: колонка: 2.0 x 75 мм, сорбент Luna-C18 (5 мкм), скорость элюирования 100 мкл/мин, объем пробы 2.0 мкл, Длина волны детектирования - 220 нм и 260 нм.

Капиллярный электрофорез. Капиллярно-электрофоретическое определение катионных форм алкалоидов проводили на приборе капиллярного электрофореза «Капель-104Т», производства НПФ АФ «Люмэкс», снабженную кварцевым капилляром с внешним полиамидным защитным покрытием (внутренний диаметр 75 мкм, внешний 365 мкм, общая длина капилляра – 60 см, длина капилляра до детектора – 50 см). Все эксперименты проводили в буферном растворе 5.0 мМ бензимидазол - 10.0 мМ винная кислота, при напряжении 20 кВ, длина волны спектрофотометрического детектирования – 254 нм, ввод пробы

осуществляли давлением 30 мбар в течение 5 с. Для регистрации электрофореграмм использовали компьютерную программу «Мультихром для Windows».

Результаты и обсуждения. *Тонкослойная хроматография.* Была разработана методика разделения алкалоидов. В экспериментах было изучено поведение модельного вещества, хинина, при различных составах подвижных фаз с целью выбора оптимальных условий разделения алкалоидов методом ТСХ. Для анализа алкалоидов был использован состав подвижной фазы: 4 мл C₂H₅OH, 4 мл CHCl₃, 2 мл CH₃COOH (100%) (2:2:1). Полученные коэффициенты удерживания приведены в таблице 1.

Таблица 1. Коэффициенты удерживания полученных пятен

Номер пятна	Проба №1 (люпин)	Проба №3 (люпин)	Проба № 2 (термопсис)
1	0,00	0,00	0,00
2	0,16	0,54	0,15
3	0,67	0,86	0,79

Наиболее четкое разделение алкалоидов люпина было достигнуто при анализе проб № 1 и № 3. При анализе пробы № 2 разделения не произошло, ввиду присутствия большого количества посторонних соединений, поэтому в дальнейших экспериментах пробу 2 не анализировали. При анализе термопсиса разделение произошло на пластинке с пробой № 2. На пластинке с пробой № 1 пятен не появилось, предположительно из-за малых концентраций выделенных веществ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

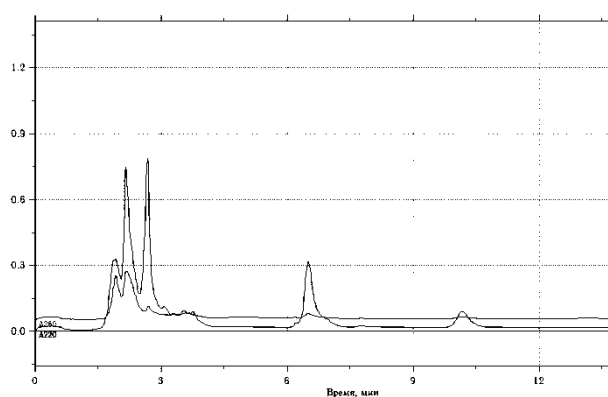


Рис. 1. Хроматограмма пробы № 2

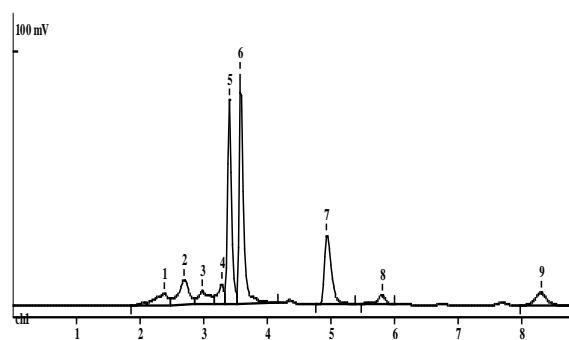


Рис. 2. Хроматограмма пробы № 3

Результаты анализа пробы № 2(термопсиса) и пробы № 3(люпина) представлены на рисунке 1 и рисунке 2. Идентификация веществ проводилась на основании корреляции времени удерживания и полярности веществ. Согласно литературным данным по полярности алкалоидов люпина (Nana J.R. et al., 2020) пики 1 и 5, 2 и 6 скорее всего соответствуют люпанину и люпинину (logKow = 1.7), пики 3 и 7 – ангиустифолину (logKow = 2.2), пик № 8 (время удерживания – 348.3 с) на рис.2 – спартеину (logKow = 2.7). На хроматограмме пробы № 2 Термопсиса ланцетного присутствует пик с временем удерживания – 350.4 с, соответственно его можно идентифицировать как спартеин, ввиду близости времени удерживания со спартеином, содержащимся в пробе № 3 люпина.

Капиллярный электрофорез

В данном методе анализа использовали стандартную методику для определения катионных, предложенную ООО "Льюмэкс" (Комарова Н.В. и др., 2008), поскольку в анализируемых пробах алкалоиды находятся в катионной форме. Электрофореграммы проб представлены на рисунке 3 и рисунке 4.

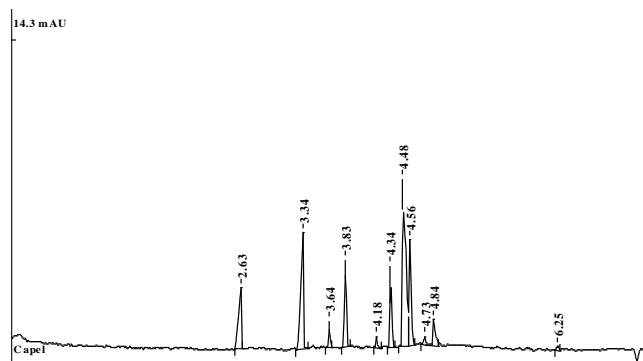


Рис. 3. Электрофореграмма пробы № 2 термопсиса

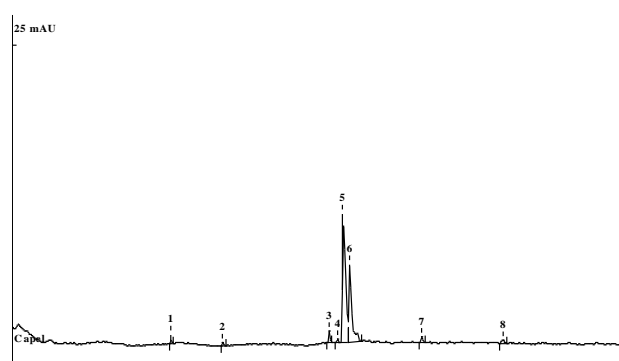


Рис. 4. Электрофореграмма пробы № 3 люпина

Как видно из полученных данных катионным формам алкалоидов люпина соответствуют пики с временами миграции 6-7 мин. На электрофореграмме пробы термописа в данном промежутке имеется один пик с временем удерживания – 6,25 мин.

Заключение. В ходе проведенных экспериментов было установлено, что наиболее эффективным методом пробоподготовки для выделения алкалоидов из семян люпина является способ № 3, а из листьев термописа способ № 2. Для количественного определения алкалоидов в семенах люпина предпочтительнее использовать метод ВЭЖХ, характеризующийся наибольшей селективностью и воспроизводимостью результатов анализа.

Литература

1. Вишнякова М.А., Кушнарeva А.В., Шеленга Т.В., Егорова Г.П. Алкалоиды люпина узколистного как фактор, определяющий альтернативные способы использования и разведения культуры. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):625–35. <http://dx.doi.org/10.18699/vj20.656>.
2. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» Санкт-Петербург: ООО «Веда», 2008. 212 с.
3. Nama J.R., Strobel B.V. Natural alkaloids from narrow-leaf and yellow lupin transfer to soil and soil solution in agricultural fields. *Environmental Sciences in Europe. Springer Science and Business Media LLC*. 2020;32(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s12302-020-00405-7>.

ВОЗМОЖНОСТИ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, БАД И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Г.Б. Слепченко^{1*}, О.Л. Мезенцева², В.П. Крюковский¹

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

г. Томск, Россия

e-mail:slepchenkogb@mail.ru

Ключевые слова: электроанализ, вольтамперометрия, лекарственные препараты, биологически активные добавки.

Введение. Для создания полноценного рынка российских фармацевтических препаратов, в том числе и внедрения инновационных препаратов, направленных на лечение социально значимых заболеваний, разрабатывается государственная программа развития фармацевтической промышленности «Фарма-2030». Главным направлением данной стратегии является организация полного цикла производства лекарственных препаратов. Поэтому вопрос аналитического контроля является актуальным на каждом этапе создания фармпрепаратов – от синтеза новых биологически активных веществ, изучения их свойств, до технологического контроля производства каждой партии готового лекарственного средства.

Использование инструментальных методов анализа позволяет значительно увеличить чувствительность и селективность определения при удовлетворительных метрологических характеристиках. Основным требованием, предъявляемых к инструментальным методам контроля, является широкий диапазон определяемых аналитов, то есть возможность использования данного метода для определения неорганических элементов и органических веществ, обладающих биологической активностью, в различных объектах: в субстанциях, лекарственных препаратах и биологических средах. В рамках фармацевтического и биохимического анализа наиболее распространены хроматографические методы анализа. Одним из перспективных физико-химических методов является вольтамперометрия, обладающая рядом преимуществ: возможность полной автоматизации, высокая чувствительность определения (до 10^{-12} г/дм³), небольшая стоимость оборудования и вспомогательных материалов. Анализ литературных источников, как отечественных, так и зарубежных показывает, что в последнее время большой интерес вызывает использование вольтамперометрии для целей фармации.

Цель. обобщение опыта применения методов вольтамперометрии в исследовательской школе химических и биомедицинских технологий Томского политехнического университета для контроля качества биологически активных веществ в различных объектах, и перспективы применения для фармацевтического и медицинского анализа.

Материалы и методы. Приводится краткий обзор статей, научных работ и разработанных методик вольтамперометрического определения неорганических элементов и минорных органических веществ в биологически активных добавках, биологических объектах и некоторых лекарственных формах.

Результаты. Применение вольтамперометрии для определения неорганических элементов и минорных органических веществ в составе БАД.

Слепченко Г.Б. и соавт. (2005) приводят данные о применении метода инверсионной вольтамперометрии для определения токсичных (мышьяка, кадмия, свинца) и жизненно-необходимых (селена, меди, цинка, железа) элементов в БАД растительного происхождения на различных типах индикаторных электродов – ртутно-плёночном и золото-графитовом. Предложены условия пробоподготовки образцов БАД. Метрологические характеристики рассчитаны на основании обработки большого массива данных.

Предложенные методики применены для оценки безопасности растительного сырья, применяемого для производства БАД и качества конечного продукта. Также с использованием инверсионной вольтамперометрии можно определять органические вещества, способные к окислению-восстановлению. Часто в состав биологически активных добавок включены водорастворимые и некоторые жирорастворимые витамины и флавоноиды. В статье (Слепченко Г.Б. и др., 2005) описаны вольтамперометрические условия определения витамина В₁ с использованием ртутно-пленочного электрода в качестве рабочего, для определения витаминов В₂, С, Е и кверцетина предложено использование стеклоуглеродного электрода. Разработанные методики количественного химического анализа БАД высокочувствительны, экспрессны, а также позволяют проводить определение веществ в мутных и окрашенных растворах без отделения пигментов.

Применение вольтамперометрии для определения неорганических элементов и лекарственных веществ в биологических объектах.

В Исследовательской школе химических и биомедицинских технологий Томского политехнического университета активно проводятся исследования по использованию различных видов вольтамперометрии для контроля биообъектов. Разработана и широко применяется многоэлементная методика анализа проб биологических объектов (волос, мочи и сыворотки крови, грудного молока и штаммов опухолевых клеток) на содержание ряда неорганических компонентов: кадмия, кобальта, меди, никеля, марганца, мышьяка, свинца, селена и цинка из одной навески (Слепченко Г.Б. и др., 2011). В качестве рабочих электродов применяются ртутно-пленочный (для определения Zn, Cd, Pb, Cu, Mn, Ni, Bi, Sb, I), графитовый (Se) и золото-графитовый (Hg, As, Fe) электроды. При этом используются различные варианты вольтамперометрии: катодная, анодная, адсорбционная катодная. Предложенные условия пробоподготовки значительно сокращают время анализа при удовлетворительных метрологических характеристиках определения в целом.

Применение углеродсодержащих и модифицированных электродов для вольтамперометрического определения органических веществ и неорганических элементов.

По мере расширения количества задач, которые можно решать с помощью вольтамперометрии, а также усложнения химической структуры определяемых веществ возникла потребность в разработке способов модифицирования поверхности электрода. При модифицировании на поверхность электродной подложки наносят один или несколько слоев химических соединений, полимерных пленок или формируют композиты-оксиды из металла, при этом появляется существенно другая способность к вольтамперометрическому отклику из-за наличия специфических свойств. Нами использованы модифицированные углеродсодержащие электроды, на поверхность которых произведена поверхностная модификация арендиазоний тозилатами (АДТ, $\text{ArN}_2^+\text{OTs}^-$) с различными заместителями, которые обладают уникальной стабильностью, безопасностью в обращении, хорошо растворимы в воде и многих органических растворителях в отличие тетрафторборатов, которые также широко используются для модификации (Слепченко, Г.Б. и др., 2009) Модификацию поверхности электрода проводили путем контакта с модификатором и электрохимически, в соответствии со схемой модификации. С использованием методов микроскопии подтверждено наличие органических функциональных групп на поверхности углеродсодержащих электродов, а также модифицированного серебряного электрода. Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод, что модификация поверхностей углеродсодержащих электродов происходит островками (колониями) в энергетически выгодных активных центрах. Проведены исследования по применению модификаторов арендиазоний тозилатов с различными заместителями для модификации поверхности стеклоуглеродного электрода для определения ряда органических веществ в биологически активных добавках и лекарственных препаратах: кварцетина, витамина В₁, галонала (производное барбитуровой кислоты). Показано, что использование с карбоксильным заместителем позволяет улучшить чувствительность определения их и увеличить диапазон определяемых концентраций на 2-3 порядка. Применение модифицированных арендиазониевыми солями и золотом углеродсодержащих электродов позволило улучшить метрологические показатели исследуемых компонентов. Например, при оценке содержания ионов селена получены воспроизводимые результаты в широком диапазоне концентраций на модельных растворах, снижен предел обнаружения и предел определения и показана возможность совместного определения мышьяка и селена (Slepchenko G.B. et al., 2021). Для ряда органических веществ впервые показана возможность оценки аналитических сигналов для концентраций на уровне 10^{-8} – 10^{-10} моль/дм³. Для модифицирования поверхности золото-графитового электрода для вольтамперометрического определения мельдония изучалось зависимость аналитического сигнала от концентрации модификатора. Установлено, что при концентрации более 30 мг/дм³ значение аналитического сигнала мельдония уменьшается, что можно объяснить блокировкой рабочей поверхности и увеличения двойного электрического слоя, время выдержки электрода в растворе модификатора установлено в диапазоне 5-7 секунд. Градуировочная зависимость тока пика от концентрации мельдония по чувствительности выше на модифицированном электроде с арендиазоний тозилатом без заместителя в сравнении с графитовым электродом (Мезенцева О.Л., 2019).

Заключение. Томскими учеными накоплен богатый опыт в разработке методик вольтамперометрического определения ряда неорганических элементов и органических веществ в различных биологических объектах, биологически активных веществах и лекарственных препаратов. Одним из перспективных направлений

является разработка и апробация модифицированных сенсоров, позволяющих проводить более селективное и чувствительное определение. Внесение вольтамперометрии в Фармакопею позволит расширить применение данного метода для контроля качества лекарственных препаратов.

Литература

1. Мезенцева О.Л. Дисс...канд. хим. наук. Томск: Томский политехнический университет, 2019. 126 с.
2. Слепченко Г.Б., Анисимова Л.С., Слипченко В.Ф., Михеева Е.В., Пикула Н.П. Контроль качества биологически активных добавок методами вольтамперометрии. Определение витаминов В1, В2, С, Е и кверцетина. *Химико-фармацевтический журнал*. 2005;39(3):54–56.
3. Слепченко Г.Б., Захарова Э.А., Черемпей Е.Г., Филичкина О.Г., Земан Л.П., Пикула Н.П., Щукина Т.И. Контроль качества и безопасности биологически активных добавок методом вольтамперометрии. Определение Zn, Cd, Pb, Cu, Fe, As, Se. *Химико-фармацевтический журнал*. 2005;39(11):50–53.
4. Слепченко Г.Б., Мартынюк О.А., Постников П.С., Трусова М.Е., Бондарев А.А., Смирнов И.В., Быстрицкий Е.Л. Новые возможности вольтамперометрического определения фармацевтических препаратов на органо-модифицированных электродах. *Сибирский медицинский журнал*. 2009;24(2-2):21-24
5. Слепченко Г.Б., Пикула Н.П., Захарова Э.А., Пичугина В.М., Филичкина О.Г., Черемпей Е.Г., Щукина Т.И., Дубова Н.М. Применение вольтамперометрических методов для контроля биологических объектов на содержание микроэлементов. *Известия Томского политехнического университета*. 2011;319(3):69–74.
6. Slepchenko G.B., Moiseeva E.S., Dorozhko E.V., Auelbekova A., Ostapenko M.S., Mezentseva O.L., N'Jung F.K. An electrochemical sensor for detecting selenium in biological fluids on an arenediazonium tosylate-modified metal electrode. *Analytical Methods*. 2021;13(13):1584–1590.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СУММЫ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В РАЗНЫХ ВИДАХ И СОРТАХ СЫРЬЯ *APIUM GRAVEOLENS* L.

Е.С. Сурбеева*, И.И. Тернинко

*Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
г. Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: bazanova.elizaveta@pharminnotech.com

Ключевые слова: *Apium graveolens* L., количественный анализ, гидроксикоричные кислоты, УФ-спектрофотометрия.

Введение. Ожирение и избыточный вес являются глобальной проблемой современного общества, которая оказывает негативное влияние на социальную и экономическую сферы жизни. Рост числа пациентов, страдающих ожирением, увеличивается из года в год, а количество людей, имеющих избыточную массу тела, составило более 1,9 миллиарда человек на 2016 год (ВОЗ 2016). Перечень заболеваний, ассоциированных с ожирением, включает в себя такие социально значимые патологии, как сахарный диабет 2 типа, сердечно-сосудистые заболевания и психо-эмоциональные нарушения. Согласно литературным данным (Sun N.N. et al., 2016), некоторые группы БАВ растительного происхождения (фенольные соединения, алкалоиды, фитостеролы и др.) оказывают положительное влияние на лечение и профилактику ожирения. Исследования показали, что хлорогеновая и кофейная кислоты участвуют в регуляции дифференцировки и метаболизма адипоцитов (Vasileva L.V. et al., 2020). Помимо этого, для хлорогеновой кислоты отмечаются эффекты, приводящие к потере веса, подавлению липогенеза и уменьшению стеатоза печени (Wang Z. et al., 2019). Сельдерей пахучий (*Apium graveolens* L.) является двулетним травянистым растением, которое широко культивируется в Российской Федерации и используется в функциональном и диетическом питании. Согласно Государственному реестру селекционных достижений, допущенных к использованию (ФГБУ РОССОРТКОМИССИЯ 2020) зарегистрировано 65 сортов сельдерея, 31 из которых относится к корневому, а 34 к черешковому и листовому. Важно отметить, что данные сорта отличаются различной урожайностью и устойчивостью к факторам окружающей среды. Согласно данным литературы, химический состав сельдерея пахучего включает в себя различные фенольные соединения, однако данные об их качественном и количественном составе достаточно противоречивы (Lin L.Z. et al., 2007; Al-Asmari A.K. et al., 2017; Пшукова И.В. и др., 2013). Исследования показали, что экстракт сельдерея способствовал снижению массы тела и печени, а также снижал уровни липидов и глюкозы в плазме крови у мышей с индуцированным ожирением (Cho V.O. et al., 2020).

Цель. Цель работы - сравнительная оценка содержания гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в разных ботанических формах и сортах сырья сельдерея пахучего для определения наиболее перспективных сортов для медицинского применения.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали корнеплоды (ботанический сорт «Олимп»), черешки (ботанический сорт «Малахит») и листья (ботанические сорта «Нежный», «Захар», «Юта», «Паскаль», «Бодрый») сельдерея пахучего. Листья заготавливали на базе питомника лекарственных

растений (ЛР) ФГБОУ ВО СПХФУ (пос. Лемболово, Ленинградская область) в августе-сентябре 2020 года, корнеплоды и стебли приобретали в продуктовых супермаркетах г. Санкт-Петербурга (по информации на упаковке страна происхождения – Россия, период заготовки – сентябрь 2020). Свежее сырье высушивали методом естественной воздушно-теневого сушки с соблюдением правил для сушки эфиромасличного сырья до остаточной влажности не более 15%. Количественное содержание гидроксикоричных кислот в различных видах и сортах сельдерея пахучего проводили методом УФ-спектрофотометрии. Предварительно регистрировали УФ-спектры анализируемых извлечений в соответствии с ОФС 1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях» на приборе СФ-2000 (Россия) для определения аналитической длины волны и доказательства валидационного параметра «Специфичность». Определение содержания гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую проводили по методике, указанной в ФС.2.5.0019.15 «Крапивы двудомной листья». Статистическую обработку результатов химического эксперимента проводили в соответствии с рекомендациями ГФ РФ ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» с использованием ПО и программы Microsoft Excel 16,0. Работа выполнена на базе ЦКП «Аналитический центр».

Результаты. Результаты исследования показали, что максимальное накопление гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту наблюдается в сельдерее листовом (в 2-3 раза больше, чем в черешках и в 5-7 раз больше, чем в корнеплодах сельдерея). Причем, наибольшей концентрацией данной группы БАВ (таблица 1) характеризуются сорта «Паскаль» и «Нежный» (7,24 % и 6,05% соответственно). Для подтверждения возможности использования аналитической длины волны (330 нм – максимум поглощения хлорогеновой кислоты), мы предварительно регистрировали УФ-спектры полученных извлечений и УФ-спектр 0,035 мг/мл СО хлорогеновой кислоты, растворитель – спирт этиловый 96% (Sigma Aldrich) (рис. 1). Как видно из данных рисунка, для всех извлечений характерен экстремум при $\lambda=330$ нм. Таким образом, выбор хлорогеновой кислоты в качестве маркера для пересчета суммы гидроксикоричных кислот оправдан.

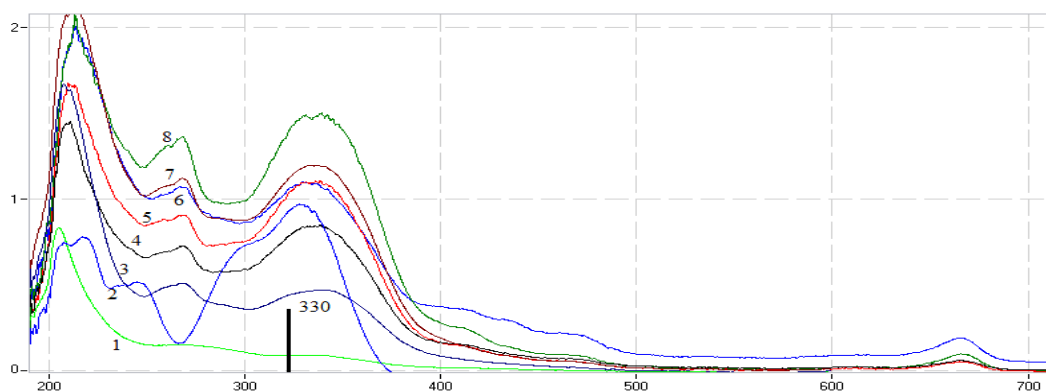


Рис. 1. УФ-спектры извлечений из сырья сельдерея пахучего: а - 1 (зеленый) – сельдерей корневой (сорт «Олимп»); 2 (голубой) – стандартный образец хлорогеновой кислоты; 3 (синий) – сельдерей черешковый (сорт «Малахит»); 4 (коричневый) – сельдерей листовый (сорт «Юта»); 5 (красный) – сельдерей листовый (сорт «Бодрый»); 6 (голубой) – сельдерей листовый (сорт «Захар»); 7 (бордовый) – сельдерей листовый (сорт «Нежный»); 8 (зеленый) – сельдерей листовый (сорт «Паскаль»)

Таблица 1. Результаты количественного определения гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту.

Ботаническая форма, сорт	Содержание в сырье, % (n=5)
Сельдерей корневой (сорт «Олимп»)	0,44 ± 0,05
Сельдерей черешковый (сорт «Малахит»)	2,07 ± 0,12
Сельдерей листовый (сорт «Нежный»)	6,05 ± 0,23
Сельдерей листовый (сорт «Захар»)	5,52 ± 0,35
Сельдерей листовый (сорт «Юта»)	5,12 ± 0,38
Сельдерей листовый (сорт «Паскаль»)	7,24 ± 0,14
Сельдерей листовый (сорт «Бодрый»)	4,41 ± 0,05

Заключение. Методом УФ-спектрофотометрии был проведен сравнительный количественный анализ суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в разных ботанических формах и сортах сырья сельдерея пахучего. Было обнаружено, что накопление данной группы БАВ значительно превалирует в сортах «Паскаль» и «Нежный» сельдерея листового, что делает их объектом выбора для дальнейшего изучения.

Литература

1. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений. URL:https://gossortrf.ru/wp-content/uploads/2020/03/FIN_reestr_dop_12_03_2020.pdf - Дата обращения 05.04.2021 Пшукова И.В., Кулешова С.А. Фитохимическое изучение и оценка фармакологической активности водных извлечений травы сельдерея пахучего. *Химия растительного сырья*. 2013;3:207–212. DOI: <https://doi.org/10.14258/jcprm.1303207>
2. Ожирение и избыточный вес. Всемирная организация здравоохранения. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> - Дата обращения 02.04.2021
3. Al-Asmari A.K., Athar M.T., Kadasah S.G. An Updated Phytopharmacological Review on Medicinal Plant of Arab Region: *Apium graveolens* Linn. *Pharmacogn. Review* 2017;11(21):13-18. doi: 10.4103/phrev.phrev_35_16.
4. Cho B.O., Choi J., Kang H.J., Che D.N., Shin J.Y., Kim J.S., Kim S.J., Jang S.I. Anti-obesity effects of a mixed extract containing *Platycodon grandiflorum*, *Apium graveolens* and green tea in high-fat-diet-induced obese mice. *Experimental Theoretical Medicine*. 2020;19(4):2783-2791. DOI: 10.3892/etm.2020.8493.
5. Lin L.Z., Lu S., Harnly J.M. Detection and quantification of glycosylated flavonoid malonates in celery, Chinese celery, and celery seed by LC-DAD-ESI/MS. *Journal Agric Food Chemistry*. 2007; 55 (4): 1321-6. doi: 10.1021/jf0624796.
6. Sun N.N., Wu T.Y., Chau C.F. Natural Dietary and Herbal Products in Anti-Obesity Treatment. *Molecules*. 2016;21(10):1351. doi: 10.3390/molecules21101351.
7. Vasileva L.V., Savova M.S., Amirova K.M., Balcheva-Sivenova Z., Ferrante C., Orlando G., Wabitsch M., Georgiev M.I. Caffeic and Chlorogenic Acids Synergistically Activate Browning Program in Human Adipocytes: Implications of AMPK- and PPAR-Mediated Pathways. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9740. DOI: 10.3390/ijms21249740.
8. Wang Z., Lam K.L., Hu J., Ge S., Zhou A., Zheng B., Zeng S., Lin S. Chlorogenic acid alleviates obesity and modulates gut microbiota in high-fat-fed mice. *Food Sci Nutr*. 2019;7(2):579-588. DOI: 10.1002/fsn3.868.

МЕТОДИКА ПРОСТОГО И ЭКСПРЕССНОГО ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В СОСТАВЕ СЛОЖНОЙ ЛИПОФИЛЬНОЙ МАТРИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРЕНОСНО-ЗАРЯДОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Е.В. Упыренко*, Д.А. Кургачев

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

e-mail:eugeniy.upyrenko@gmail.com

Ключевые слова: HILIC, переносно-зарядовые взаимодействия, этилацетат, липофильная матрица, ароматические вещества.

Введение. Хроматографический анализ действующих ароматических компонентов лекарственных форм с липофильной основой (мазей, суппозиторийев, олеогелей и др.) – достаточно сложная задача вследствие несовершенства существующих хроматографических режимов (NicDaéid N. et al. 2019) Метод обращено-фазовой хроматографии зачастую не позволяет элюировать липофильные компоненты матрицы и при этом добиться приемлемого удерживания анализируемых веществ без использования достаточно длительных градиентных режимов элюирования (Снайдер Ллойд Р. и др., 2020). Метод HILIC в его существующем исполнении не сочетается с переносно-зарядовым режимом (Сычев К.С., 2013) и поэтому зачастую не обеспечивает требуемое удерживание малополярных ароматических веществ, а также не всегда обладает селективностью в отношении определяемых ароматических веществ. Мы исследуем возможность использования нового варианта хроматографического режима, основанного на гидрофильной хроматографии с переносом заряда (Charge Transfer HILIC mode).

Цель. Целью работы являлась разработка методики ВЭЖХ-анализа, позволяющего экспрессно и без проведения дополнительной пробоподготовки определять ароматические вещества в составе сложной липофильной матрицы.

Для достижения поставленной цели необходимо выполнить следующие задачи: разработать методику определения полярных ароматических веществ в гидрофильном режиме ВЭЖХ с использованием переносно-зарядовых взаимодействий; проверить специфичность методики в отношении определяемых полярных ароматических веществ при одновременном присутствии в пробе масла-какао, имитирующего липофильную матрицу; доказать реализацию сильных переносно-зарядовых взаимодействий, обеспечивающих селективность в отношении определяемых полярных ароматических веществ; сравнить порядок элюирования ароматических веществ, содержащих электрононасыщенные и электронодефицитные системы на синтезированной стационарной фазе, содержащей электрононасыщенные фенильные ароматические селекторы по сравнению с коммерчески доступной пентафторфенильной стационарной фазой, содержащей электронодефицитные ароматические селекторы.

Материалы и методы. Работа проводилась в изократическом режиме на жидкостном хроматографе Agilent 1200 Infinity series с DAD детектированием и автоматическим вводом пробы. В качестве стационарной фазы использовались: (1) фенильная неэндкапированная стационарная фаза – хроматографическая колонка 5 μm , 250 \times 4,6 мм, заполненная специальным сорбентом, полученным путем ацилирования поверхности аминопропилсилилизированного силикагеля бензоилхлоридом и (2) пентафторфенильная стационарная фаза – коммерчески доступная хроматографическая колонка Luna PFP(2) 3 μm , 150 mm \times 4,6. В качестве подвижной фазы и растворителя использовался состав этилацетат – буфер триэтиламмония ацетата 20 мМ (99,9:0,1), подкисленный уксусной кислотой (40 мМ).

Результаты. В разработанном режиме используется апротонный полярный растворитель, неспособный к переносу заряда, что позволяет реализовать гидрофильный режим с сильными переносно-зарядовыми взаимодействиями. В результате обеспечивается сильное удерживание определяемых полярных ароматических веществ, при этом липофильные компоненты матрицы элюируются в мертвое время подобно нормально-фазовому режиму. Однако, в отличие от классических нормально-фазовых разделений, в разработанном варианте в качестве ПФ используется состав с высоким содержанием апротонного полярного органического растворителя, не способного к переносу заряда (этилацетата) и небольшой добавкой буферного раствора. В ходе данной работы:

1. Успешно разработаны условия определения полярных ароматических веществ (кеторолак (рис. 1), а также парацетамол, кетопрофен и ибупрофен) в гидрофильном режиме ВЭЖХ с использованием переносно-зарядовых взаимодействий;

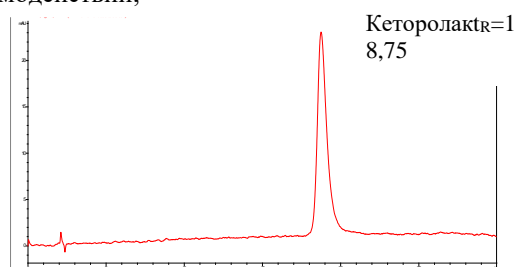


Рис. 1. Хроматограмма кеторолака ($k'_{\text{кеторолак}} = 6,50$) при работе на фенильной стационарной фазе с подвижной фазой этилацетат – буфер триэтиламмония ацетата 20 мМ (99,9:0,1), подкисленный уксусной кислотой (40 мМ). Длина волны детектирования: $\lambda = 275$ нм; Температура термостата колонки: 30 °С; Объем вводимой пробы: 50 мкл. Объемная скорость потока: 1,0 мл/мин.

2. Разработанный вариант гидрофильной хроматографии позволяет определять ароматические вещества при одновременном присутствии в пробе липофильных компонентов матрицы (масла-какао (рис. 2));

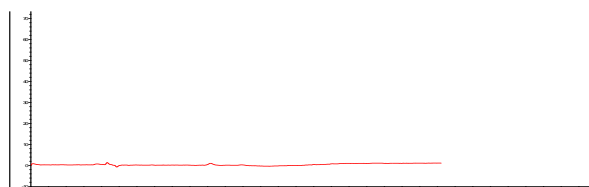


Рис. 2. Хроматограмма масла-какао при работе на фенильной стационарной фазе с подвижной фазой этилацетат – буфер триэтиламмония ацетата 20 мМ (99,9:0,1), подкисленный уксусной кислотой (40 мМ). Длина волны детектирования: $\lambda = 275$ нм; Температура термостата колонки: 30 °С; Объем вводимой пробы: 50 мкл. Объемная скорость потока: 1,0 мл/мин.

3. Разработанный вариант гидрофильной хроматографии позволяет реализовать сильные переносно-зарядовые взаимодействия, что обеспечивает выраженную селективность по отношению к определяемым ароматическим веществам (кофеин, теofilлин (рис. 3));

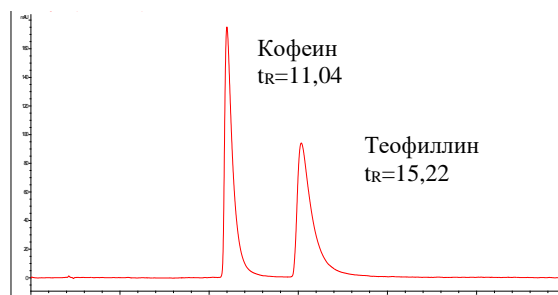


Рис. 3. Хроматограмма смеси кофеина ($k'_{\text{кофеин}} = 3,42$) и теofilлина ($k'_{\text{теofilлин}} = 5,09$) при работе на фенильной стационарной фазе с подвижной фазой этилацетат – буфер триэтиламмония ацетата 20 мМ (99,9:0,1), подкисленный уксусной кислотой (40 мМ). Длина волны детектирования: $\lambda = 275$ нм; Температура термостата колонки: 30 °С; Объем вводимой пробы: 50 мкл. Объемная скорость потока: 1,0 мл/мин.

4. При работе на (1) синтезированной фенильной стационарной фазе наблюдается ортогональная селективность для полярных ароматических веществ по сравнению с (2) коммерчески доступной пентафторфенильной стационарной фазой (дифенгидрамин, 8-хлоротеофиллин).

Заключение. Таким образом показано, что при выбранных нами условиях возможно селективное ВЭЖХ-разделение полярных ароматических веществ в присутствии липофильных компонентов матрицы.

Литература

1. Снайдер Л.Р., Киркленд Дж.Дж., Долан Д.У. Введение в современную жидкостную хроматографию. Москва: Техносфера. 2020. 960 с.
2. Сычев К.С. Практический курс жидкостной хроматографии. Кокоро. 2013. 272 с.
3. NicDaéid N. Systematic drug identification. Encyclopedia of analytical science. 3rd edition. Oxford: Elsevier. 2019. 480 pp.

ОСОБЕННОСТИ АНАЛИТИЧЕСКОГО И ПРЕПАРАТИВНОГО РАЦЕМИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСЕЙ β_2 -АДРЕНОМИМЕТИКОВ МЕТОДОМ СФХ

В.Н. Царев*, Н.Г. Базарнова, И.В. Микушина

Алтайский государственный университет, институт химии и химико-фармацевтических технологий, г. Барнаул, Россия
e-mail: tsarewn@yandex.ru

Ключевые слова: Сверхкритическая флюидная хроматография, хиральные ЛС, аналитическое и препаративное разделение рацемических смесей, стереоизомеры β_2 -адреномиметиков. **Введение.** Для интенсификации реабилитационных процессов и лекарственной терапии в лечении дыхательной системы, особенно в период повышенной вирусной нагрузки, необходимо применение лекарственных средств синтетического происхождения с минимальным набором побочных эффектов и высокой фармакологической активностью. Оптически чистые фармакологические субстанции группы β_2 -адреномиметиков, полученные методом сверхкритической флюидной хроматографии, наиболее эффективны в решении этих проблем (De Klerck K. et al., 2012; Väilitalo P.A. et al., 2017; Calcaterra A., D'Acquarica I., 2018). В современной фармацевтической промышленности обозначилась глобальная тенденция к разработке и внедрению хиральных ЛС либо *de novo*, либо из рацематов, давно существующих на рынке. Направление получило название *chiral switch*, - «переключение на хиральные молекулы». Стереоселективность рецепторов к S(-)- и R(+)-изомерам объясняется различиями в клиренсе, биодоступности и клинической активности хиральных ЛС (Sun P. et al., 2009; Kalíková K. et al., 2014; Väilitalo P.A. et al., 2017). Согласно данным многочисленных доклинических исследований ЛС из группы β_2 -адреномиметиков в частности левосальбутамол и препараты на его основе неоднократно подтвердили наличие специфической фармакологической (бронхолитической, противовоспалительной и противоаллергической) активности в рамках экспериментов *in vitro* и *in vivo*, в целом характеризуются благоприятным профилем безопасности на фоне их однократного и (суб)хронического введения, лишены мутагенного, канцерогенного потенциала, репродуктивной и иных видов токсичности у различных видов лабораторных животных (Davankov V.A., 1988; Hoffmann C.V. et al., 2007; Nelander H. et al., 2011).

Цель. Основной целью представленной работы является поиск и разработка аналитических и препаративных способов хирального разделения рацемических смесей фармацевтических субстанций из группы β_2 -адреномиметиков. методом сверхкритической флюидной хроматографии.

Материалы и методы. В качестве рабочего алгоритма постановки методики хирального разделения использовали следующий подход:

Выбор сорбента (методом прямого подбора) - Выбор соразтворителя (по совокупности факторов) - Состав подвижной фазы - Подбор динамического модификатора - Определение доли динамического модификатора в подвижной фазе (Phinney K.W. et al., 1998; Svensson S. et al., 2000; Nelander H. et al., 2011; Костенко М.О. и др., 2017). В работе использовали 3 колонки с различными хиральными селекторами. Два сорбента на базе химически привитой к силикагелю (иммобилизованной) амилозы, с трис-3-хлор-5-метилфенилкарбаматными (Chiralpak IG) и трис-3,5-диметилфенилкарбаматными (Chiralpak IA) заместителями, а третий сорбент – на базе химически привитой к силикагелю (иммобилизованной) целлюлозы, с трис-3,5-диметилфенилкарбаматными (Chiralpak IB) заместителями. Имобилизованные полисахаридные сорбенты позволяют работать с более широким спектром соразтворителей в составе подвижной фазы (ПФ), так как отсутствует риск их десорбции с силикагеля. Их главным недостатком принято считать сниженную селективность по сравнению с аналогичными неимобилизованными фазами. В качестве компонентов подвижной фазы применяли диоксид углерода, метанол, 2-пропанол (для ВЭЖХ), этанол (для ВЭЖХ.), ацетонитрил (0 сорт), ацетон (для ВЭЖХ.). В качестве динамических модификаторов использовали: трифторуксусную кислоту (HPLC grade, Sigma-Aldrich), изопропиламин ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich), диэтиламин ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich), триэтиламин ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich) ацетат аммония ($\geq 98,0\%$, Millipore), ГФИП (осч). Исследования проводили с растворами ксинафоата салметерола и основания салметерола концентрацией 1,0 г/л. В последующих экспериментах в качестве соразтворителя

использовали метанол. Исследование доли метанола в ПФ проводили с использованием ДМ в составе соразворителя, в противном случае салметерол не элюировался. В качестве ДМ использовали триэтиламин (ТЭА) и гексафторизопропанол (ГФИП) в концентрации 0,5% от объема соразворителя. **Результаты.** Хроматограммы салметерола основания на сорбентах Chiralpak IA, и Chiralpak IG регистрируемые при различных содержаниях метанола в ПФ. С увеличением содержания метанола в ПФ монотонно уменьшаются времена удерживания, но при этом также уменьшается и селективность разделения. Исходя из значений коэффициента селективности видно, что содержание метанола в ПФ 15 и 18% приводит к неполному разделению энантиомеров салметерола. При этом, в случае содержания в ПФ 15% метанола селективность чуть меньше, чем при содержании в ПФ 18% метанола. При увеличении содержания метанола до 25% наблюдается уменьшение селективности. При увеличении концентрации метанола до 30% разделение вовсе отсутствует. Зависимости коэффициентов удерживания от доли метанола линейны, что свойственно для СФХ. С ростом содержания метанола времена удерживания уменьшаются. Зависимость логарифма коэффициента селективности от доли метанола имеет нелинейный характер, при аппроксимации линейной функцией коэффициент корреляции равен 0,8281. Нами подобраны условия хирального разделения рацемической смеси салметерола основания со следующими характеристиками: сорбент Chiralpak IG 250 мм×4,6 мм×5 мкм; изократический режим; ПФ: CO₂/MeOH/ГФИП 82/18/0.5; скорость потока 3 мл/мин; давление 120 бар; температура (27-30) °С; образец – раствор в метаноле концентрацией 1г/л; объем вводимой пробы 10 мкл; детектирование на длине волны 219, 227, 280 нм. Установлено, что для препаративной методики хирального разделения рацемических смесей β₂-адреномиметиков методом СФХ критическим параметром является время безаварийной работы системы, количество наработанного целевого продукта (чистый энантиомер), концентрация целевого продукта в получаемом растворе, стабильность целевого продукта в растворе. Доказано, что хиральное разделение применяемых в фармации субстанций β₂-адреномиметиков должно проводиться в форме основания, субстанции в виде соли возможно поделить только в рамках аналитической методики. Исследования по хиральному разделению β₂-адреномиметиков методом СФХ, проведенные на различных субстанциях (сальбутамол, салметерол), показали перспективность использования разделяемой субстанции в виде основания. Рацемическая смесь в виде основания обладает большей растворимостью в одном и том же растворителе по сравнению с «солью». Использование основания не приводит к образованию осадка в хроматографическом тракте СФХ и удлиняет время безостановочной работы всей системы. Применение основания позволяет, в некоторых случаях (сальбутамол), достичь достаточного для препаративного разделения уровня селективности без использования ДМ. В свою очередь, кислотные модификаторы оказывают благоприятный эффект на разделение рацемической смеси и позволяют снизить влияние на селективность разделяемой рацемической смеси повышенных температур в термостате. Экспериментальное применение гексафторизопропанола (ГФИП) в качестве кислотного ДМ в хиральном разделении субстанции салметерола основания позволило увеличить селективность разделения при введении в соразворитель его в ПФ не более 0,5 объемных % от количества соразворителя. Кроме того, применение ГФИП позволило снизить температуру с 42 градусов до нормальной, этот факт открывает принципиальную возможность провести процесс масштабирования, так как в препаративном СКФ хроматографе нет возможности терморегуляции колонки.

Заключение. Полученные данные требуют проведения глубокой модернизации аналитических методик хирального разделения рацемических смесей β₂-адреномиметиков методом СФХ при их переносе с аналитического комплекса на препаративный. Прямое масштабирование приводит прежде всего к быстрому износу оборудования и получению целевого продукта в количествах на позволяющих запустить полноценный промышленный цикл производства лекарственного средства.

Литература

1. Костенко М.О., Устинович К.Б., Покровский О.И., Паренаго О.О., Базарнова Н.Г., Лунин В.В. Влияние состава подвижной фазы на селективность в сверхкритической флюидной хроматографии при разделении энантиомеров сальбутамола. *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* 2017;12(4):24-39.
2. Calcaterra A., D'Acquarica I. The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2018;147: 323-340.
3. Davankov V.A. Ligand Exchange Chromatography. New York: CRC Press, 1988. 218 p.
4. De Klerck K., Mangelings D., Heyden Y.V. Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2012;69: 77-92.
5. Hoffmann C.V., Laemmerhofer M., Lindner W. Novel strong cation-exchange type chiral stationary phase for the enantiomer separation of chiral amines by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A.* 2007;1161:242-251.
6. Kalíková K., Šlechtová T., Vozka J., Tesařová E. Supercritical fluid chromatography as a tool for enantioselective separation; A review. *Analytica chimica acta.* 2014;821:1-33.
7. Nelander H., Andersson S., Öhlén K. Evaluation of the chiral recognition properties as well as the column performance of four chiral stationary phases based on cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) by parallel HPLC and SFC. *Journal of chromatography A.* 2011;1218 (52):9397-9405.

8. Phinney K.W., Sander L.C., Wise S.A. Coupled achiral/chiral column techniques in subcritical fluid chromatography for the separation of chiral and nonchiral compounds. *Analytical chemistry*. 1998;70(11):2331-2335.
9. Sun P., Wang C., Breitbach Z.S., Zhang Y., Armstrong D.W. Development of new HPLC chiral stationary phases based on native and derivatized cyclofructans. *Analytical chemistry*. 2009;81(24):10215-10226.
10. Svensson S., Karlsson A., Gyllenhaal O., Vessman J. Chiral separations of metoprolol and some analogs with carbon dioxide on Chiralcel OD and Chiralpak AD stationary phases. Use of chemometrics. *Chromatographia*. 2000;51(5):283-293.
11. Väitalo P.A., Kemppainen H., Kulo A., Smits A., van Calsteren K., Olkkola K.T., de Hoon J., Knibbe C.A.J., Allegaert K. Body weight, gender and pregnancy affect enantiomer-specific ketorolac pharmacokinetics. *British journal of clinical pharmacology*. 2017;88:1966-1975.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИС-[3-(3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-4-ГИДРОКСИФЕНИЛ)ПРОПИЛ]СУЛЬФИДА И ДОДЕЦИЛ(3,5-ДИМЕТИЛ-4-ГИДРОКСИБЕНЗИЛ)СУЛЬФИДА

Т.Г. Шинко*, С.В. Терентьева

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

г. Новосибирск, Россия

e-mail: shinko.tatiana@yandex.ru

Ключевые слова: количественное определение, бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид, додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфид, меркуриметрия.

Введение. Бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид и додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфид (рис.) являются новыми перспективными антиоксидантами, разработанными на базе кафедры химии Новосибирского государственного педагогического университета (Просенко А.Е. и др., 2003; Плотников М.Б. и др., 2010).

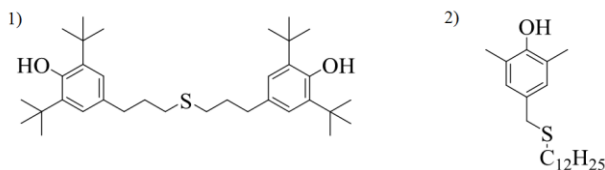


Рис. Структурные формулы: 1) бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид, 2) додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфид

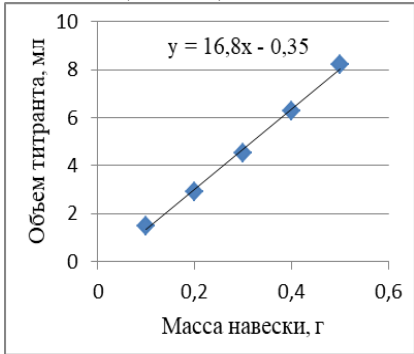
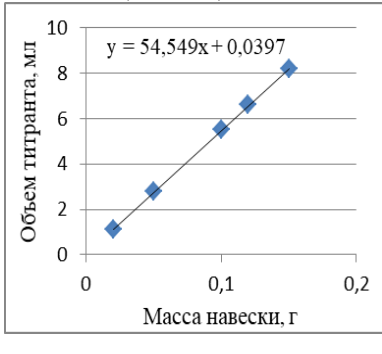
Лекарственные препараты - антиоксиданты являются признанным средством профилактики и комплексной терапии атеросклероза, ишемической болезни сердца, опухолевых новообразований и некоторых других заболеваний (Neha et al., 2019; Трегубова и др., 2012). В предыдущих исследованиях была определена биологическая антиоксидантная активность бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида и додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфида, а также выявлены цитопротекторный, гепатопротекторный, противовоспалительный, гемореологический эффекты (Просенко А.Е. и др., 2003; Терах Е.И. и др., 2003; Жданкина А.А. и др., 2013; Бахтина И.А. и др., 2000; Плотников М.Б. и др., 2010), превосходящие в некоторых случаях эффекты известных лекарственных антиоксидантов со схожей химической структурой (пробукол, ионол) (Терах Е.И. и др., 2003; Кемелева Е.А. и др., 2008). Для проведения дальнейших доклинических и клинических испытаний и возможной регистрации объектов исследования в качестве лекарственных средств необходима разработка Проектов Нормативных документов с методиками, позволяющими проводить выпускающий контроль качества. Исходя из вышеизложенного, целью данной работы была разработка и валидация методики количественного определения бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида и додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфида для включения в Проект Нормативной документации.

Материалы и методы. Поскольку объекты исследования являются новыми соединениями с оригинальной структурой и для них отсутствуют стандартные образцы, для разработки методик количественного определения выбрали метод титриметрии. Известно, что органические сульфиды способны образовывать комплексные соединения с солями ртути(II) (Черножуков Н.И., 2015), поэтому определение проводили методом меркуриметрии. В качестве титранта использовали стандартизованный раствор 0,1 моль/л ртути(II)нитрата, индикатор - дифенилкарбазон. Методика: около 0,1 г додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфида / 0,3 г бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида (точная навеска) растворяют в смеси 5 мл ацетона и 5 мл этанола, добавляют 5 капель кислоты азотной разведенной и 2-3 капли индикатора дифенилкарбазона. Титруют 0,1 моль/л раствором ртути(II)нитрата до появления устойчивого фиолетового окрашивания. Разработанная методика валидирована по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность», «правильность», «аналитическая область» согласно требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной Фармакопеи

Российской Федерации XIV изд. (ГФ XIV). Полученные результаты статистически обработали в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIV с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel.

Результаты. Результаты валидации разработанных методик представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты валидации методики количественного определения бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида и додецил(3,5-диметил-4-гидроксibenзил)сульфида методом меркуриметрии.

Параметры валидации		Бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид	Додецил(3,5-диметил-4-гидроксibenзил)сульфид
Специфичность		В контрольном опыте индикатор изменяет окраску от прибавления 1 капли титранта	В контрольном опыте индикатор изменяет окраску от прибавления 1 капли титранта
Линейность		$r=0,9984$ * ($r \geq 0,990$) 	$r=0,9999$ * ($r \geq 0,990$) 
Прецизионность	Повторяемость	RSD=2,53% * ($RSD \leq 5\%$ для 6-ти измерений)	RSD=1,39% * ($RSD \leq 5\%$ для 6-ти измерений)
	Промежуточная прецизионность	$F_{\text{факт}}=2,05$ * $F_{\text{факт}} < F_{\text{табл}}$, $F_{\text{табл}}(95\%, 5, 5)=5,05$ $t_{\text{факт}}=0,51$ * $t_{\text{факт}} < t_{St}(95\%; 10)$, $t_{St}(95\%; 10)=2,23$	$F_{\text{факт}}=1,65$ * $F_{\text{факт}} < F_{\text{табл}}$, $F_{\text{табл}}(95\%, 5, 5)=5,05$ $t_{\text{факт}}=0,083$ * $t_{\text{факт}} < t_{St}(95\%; 10)$, $t_{St}(95\%; 10)=2,23$
Правильность		значение свободного члена уравнения линейной зависимости статистически достоверно не отличается от нуля; $t_a=1,95 < t_{St}(99\%; 3)$ * $t_{St}(99\%; 3)=5,84$	значение свободного члена уравнения линейной зависимости статистически достоверно не отличается от нуля; $t_a=1,38 < t_{St}(99\%; 3)$ * $t_{St}(99\%; 3)=5,84$ *
Аналитическая область		0,1-0,5г (по результатам определения линейности)	0,02-0,15г (по результатам определения линейности)

r – коэффициент корреляции, RSD – относительное стандартное отклонение, $F_{(\text{факт}/\text{табл})}$ – критерий Фишера, $t_{(\text{факт}/S_{u/a})}$ – критерий Стьюдента *курсивом выделены критерии приемлемости при валидации методики по указанным параметрам

Заключение. В ходе экспериментального исследования нами разработаны и валидированы методики меркуриметрического количественного определения новых перспективных антиоксидантов бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида и додецил(3,5-диметил-4-гидроксibenзил)сульфида. Результаты валидации удовлетворяют критериям приемлемости, данная методика может быть включена в Проект Нормативной документации на исследуемые соединения.

Литература

1. Бахтина И.А., Антипьева Е.В., Просенко А.Е. Влияние антиоксиданта „тиофан“ на параметры антиокислительного стресса при ишемической болезни сердца. *Бюллетень СО РАМН*. 2000;(3–4):24–29.
2. Жданкина А.А., Кон Г.А., Плотников М.Б., Варакута Е.Ю., Логвинов С.В., Просенко А.Е., Колосова Н.Г. Исследование нейроретинопротекторной активности тиофана при инволюционной хориоретинальной дегенерации крыс линии ОХУС. *Бюллетень сибирской медицины*. 2013;2(3):24–31.
3. Кемелева Е.А., Васюнина Е.А., Сеницина О.И., Просенко А.Е., Хомченко А.С., Гросс М.А., Кандалицева Н.В., Невинский Г.А. Новые перспективные антиоксиданты на основе 2,6-

- диметилфенола. *Биоорганическая химия*. 2008;34(4):558–69.
4. Просенко А.Е., Терах Е.И., Горох Е.А. Синтез и исследование антиокислительных свойств бис-[ω -(3,5-диалкил-4-гидроксифенил)алкил]сульфидов. *Журнал прикладной химии*. 2003;76(2):256–60.
 5. Терах Е.И., Просенко А.Е., Никулина В.В., Зайцева О.В. Исследование синергетических эффектов у антиоксиданта СО-3 и его структурных аналогов в сравнении с композициями триалкилфенолов и диалкилсульфида. *Журнал прикладной химии*. 2003;76(2):261–65.
 6. Трегубова, И.А., В.А. Косолапов, Спасов А.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы. *Успехи физиологических наук*. 2010;43(1):75–94.
 7. Черножуков Н.И. Теория очистки нефтепродуктов. Москва: Книга по требованию, 2015. 116с.
 8. Плотников М.Б., Просенко А.Е., Смольякова В.И., Иванов И.С., Чернышева Г.А., Кандалинцева Н.В. Синтез и антиокислительная активность 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиододекана. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010;44(3):65–67.
 9. Neha K., Haider M.R., Pathak A., Yar M.S. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;178:687–704.

Системы доставки лекарственных средств для диагностики и терапии

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ HER2/NEU В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАРКАСНЫХ БЕЛКОВ МЕЧЕННЫХ ТЕХНЕЦИЕМ-99М

О.Д. Брагина^{1,2*}, В.И. Чернов^{1,2}, С.М. Деев^{2,3}, В.М.Толмачев^{2,4}

¹Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) РАН,
г. Томск, Россия

²Научно-исследовательский центр (НИЦ) «Онкотерапевтика»,
Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ),
г. Томск, Россия

³ ГНЦ ФГНУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
РАН, г. Москва, Россия

⁴Уппсальский университет, г. Уппсала, Швеция
e-mail: bragina_od@mail.ru

Ключевые слова: альтернативные каркасные белки, радионуклидная диагностика, HER2/neu, рак молочной железы, таргетная терапия.

Введение. Гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu встречается у 15-20% больных раком молочной железы и ассоциируется с неблагоприятным прогнозом и агрессивным течением заболевания. Кроме этого, высокая экспрессия данного маркера на поверхности опухолевой клетки является показанием для назначения направленного таргетного лечения у данной категории пациенток. Для определения статуса HER2/neu применяются иммуногистохимическое исследование (ИГХ) и флуоресцентная гибридизация in situ (FISH-анализ), главным недостатком которых является невозможность одномоментной оценки распространенности опухолевого процесса и молекулярных характеристик выявленных очагов (Tolmachev V., 2008; Брагина О.Д. и др., 2019). В настоящее время для диагностики злокачественных образований все большее распространение получают таргетные радионуклидные методы, где в качестве «нацеливающего» модуля используется новый класс белковых молекул – альтернативные каркасные белки (АКБ), одними из представителей, которых являются синтетические протеины ADAPT6 и DARPInG3 (Garousi J., et al. 2015; Vorobyeva A. et al., 2019).

Цель. Изучение возможности клинического использования радиофармацевтических препаратов «^{99m}Tc-ADAPT6» и «^{99m}Tc-DARPInG3» для диагностики рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu у человека.

Материалы и методы. Клинические исследования были зарегистрированы (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03991260 для препарата «^{99m}Tc-ADAPT6» и NCT04277338 – для «^{99m}Tc-DARPInG3») и одобрены биоэтическим комитетом НИИ Онкологии Томского НИМЦ. В исследование были включены больные раком молочной железы до проведения системного лечения. В исследование с «^{99m}Tc-ADAPT6» – 22 пациентов (T₁₋₄N₀₋₂M₀₋₁) (11 с гиперэкспрессией HER2/neu; 11 – с отрицательной); в исследование с «^{99m}Tc-DARPInG3» - 28 пациенток (T₁₋₄N₀₋₂M₀₋₁) (15 с гиперэкспрессией HER2/neu; 13 – с отрицательной). Критериями включения в исследование являлись следующие параметры: впервые диагностированный и морфологически верифицированный рак молочной железы (T₁₋₄N₀₋₃M₀₋₁); общее состояние больных с оценкой по системе ECOG-ВОЗ 0-2 балла; подписанное информированное согласие пациента на участие в научном исследовании. Критерии исключения были представлены наличием выраженной анемии,

лейкопении, тромбоцитопении, сепсиса, кахексии, тяжелой сопутствующей патологии; клаустрофобии; отказ от лечения.

Морфологические методы исследования. Во всех случаях выполнялось морфологическое и иммуногистохимическое исследование биопсийного материала первичной опухоли по стандартным методикам. При категории 2+ HER2/neu по данным ИГХ всем пациенткам выполнялся FISH-анализ, положительными считались результаты теста при соотношении среднего количества копий гена *HER2/neu* и среднего числа центромер хромосомы 17 в клетке более 2,2 (Wolff A.C., 2013).

Радионуклидные методы исследования. В исследовании использовались 2 дозировки вещества для «^{99m}Tc-ADAPT6»: 500 и 1000 мкг и три дозировки для «^{99m}Tc-DARPinG3»: 1000, 2000 и 3000 мкг. Препарат готовился непосредственно перед введением в отделении радионуклидной диагностики НИИ Онкологии Томского НИМЦ по трикарбонильной методике. Радиохимические выход и чистота (РХВ и РХЧ) определялись с помощью тонкослойной радиохроматографии (ТСРХ). Анализ хроматограмм проводился с использованием хроматографа Hitachi Chromaster HPLC systems с радиоактивным детектором. Полученный после очищения препарат разбавлялся в 10 мл стерильного 0,9% раствора NaCl, забирался через стерилизующий фильтр и после измерения активности медленно вводился пациенту внутривенно.

Сцинтиграфия в режиме «WholeBody» и однофотонная эмиссионная компьютерная томография» выполнялись на гамма-камере E.CAM 180 фирмы «Siemens» (Германия) в положении «лежа на спине» через 2, 4, 6 и 24 часа после введения. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ STATISTICA 10.0 for Windows с использованием непараметрического метода Манн-Уитни. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным в том случае, если вероятность их тождества была меньше 5% ($p < 0,05$). Для подсчета дозы абсорбции РФП использовалась программа OLINDA/EXM. 1.1 с применением фантома «взрослой женщины».

Результаты. В обоих случаях все инъекции были перенесены пациентами удовлетворительно, без развития побочных реакций. Результаты анализов крови и мочи не продемонстрировали каких-либо изменений до и после проведения исследований. Наибольший захват при использовании препарата «^{99m}Tc-DARPinG3» отмечалась в почках и печени; при использовании препарата «^{99m}Tc-ADAPT6» в почках. Эффективная доза для препарата «^{99m}Tc-ADAPT6» с применением 500 мкг составила $0,009 \pm 0,002$ мЗв/МБк; 1000 мкг - $0,010 \pm 0,003$ мЗв/МБк; препарата «^{99m}Tc-DARPinG3» - $0,011 \pm 0,001$, $0,012 \pm 0,006$ и $0,012 \pm 0,003$ мЗв/МБк для 1000, 2000 и 3000 мкг соответственно. Лучшее распределение между опухолями с положительным и отрицательным статусами HER2/neu при использовании препарата «^{99m}Tc-ADAPT6» отмечалось через 2 часа после применения в дозировке 500 мкг со средним значением опухоль/фон 37 ± 19 для HER2-позитивных опухолей по сравнению с 5 ± 2 для HER2-негативных опухолей ($p < 0,05$, Mann-Whitney test). Различие между группами на других временных отрезках было не достоверно (рис. 1, 2) (Брагина О.Д. и др., 2021; Bragina O., et al. 2021).

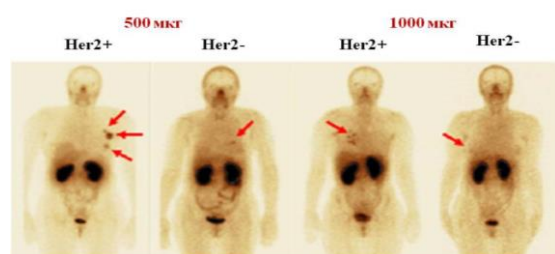


Рис. 1. Распределение препарата «^{99m}Tc-ADAPT6» в органах и тканях у больных с использованием дозировок 500 и 1000 мкг (в обеих группах красными стрелками указаны основной опухолевый узел и рядом расположенные метастатические лимфатические узлы)

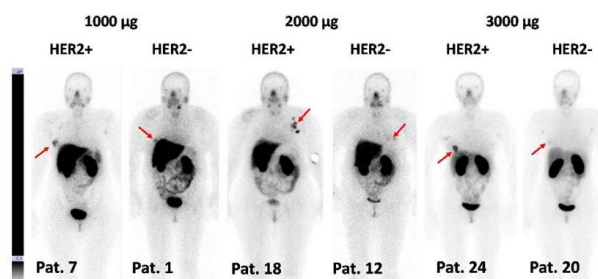


Рис. 2. Распределение препарата «^{99m}Tc-DARPinG3» в органах и тканях у больных с использованием дозировок 1000, 2000 и 3000 мкг (в обеих группах красными стрелками указаны основной опухолевый узел и рядом расположенные метастатические лимфатические узлы)

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые радиофармацевтические препараты «^{99m}Tc-ADAPT6» и «^{99m}Tc-DARPinG3» безопасны для клинического использования и их можно рассматривать в качестве нового дополнительного метода диагностики HER2-позитивных опухолей молочной железы.

Исследование финансировалось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (075-15-2019-1925).

Литература

1. Брагина О.Д., Чернов В.И., Гарбуков Е.Ю., Дорошенко А.В., Воробьева А.Г., Орлова А.М., Толмачев В. М. Возможности радионуклидной диагностики HER2-позитивного рака молочной железы с использованием меченных технецием-99m таргетных молекул: первый опыт клинического применения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2021;20(1):23 – 30.

2. Брагина О.Д., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Ларькина М.С. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (3): 125 – 133.
3. Tolmachev V. Imaging of HER-2 overexpression in tumors for guiding therapy. *Curr Pharm Des*. 2008;4:2999 - 3019.
4. Bragina O., von Witting E., Garousi J., Zelchan R., Sandström M., Orlova A., Medvedeva A., Doroshenko A., Vorobyeva A., Lindbo S., Borin J., Tarabanovskaya N., Sörensen J., Hober S., Chernov V., Tolmachev, V. Phase I study of ^{99m}Tc-ADAPT6, a scaffold protein-based probe for visualization of HER2 expression in breast cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2021;62.
5. Garousi J., Lindbo S., Nilvebrant J., Åstrand M., Buijs J., Sandström M., Hober S. ADAPT, a novel scaffold Protein-based probe for radionuclide imaging of molecular targets that are expressed in disseminated cancers. *Cancer Res*. 2015;75:4364–4371.
6. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M., Garousi J., Chernov V., Bragina O., Orlova A., Tolmachev V., Deyev S. Optimal composition and position of histidine – containing tags improves biodistribution of ^{99m}Tc – labelled DARPInG3. *Scientific Reports*. 2019;9(1);9405.
7. Wolff A.C. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31:3997 - 4013.

NANOCARRIERS FOR TARGETED THERAPY

S.M. Deyev*

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: biomem@mail.ru*

Keywords: tumour targeting, toxin, radionuclide, multifunctional agents, cancer.

Introduction. Theranostic approach is currently among the fastest growing trends in cancer treatment. It implies the creation of multifunctional agents for simultaneous precise diagnosis and targeted impact on tumor cells. The opportunity to combine diagnostics and therapy appeared with the development of nanobiotechnologies and was realized in the concept of agents capable of diagnosing, targeted therapeutic effects, and monitoring the response of tumor cells. A new type of theranostic complexes was created based on NaYF₄:Yb,Tm upconversion nanoparticles (UCNP) coated with polyethylene glycol and functionalized with the HER2-specific recombinant targeted toxin DARPIn-LoPE, a fragment of the exotoxin A derived from *Pseudomonas aeruginosa* genetically fused with a targeting designed ankyrin repeat protein (DARPIn). We reported combined therapy using the resultant hybrid complex UCNP-R-T which demonstrated selective cytotoxicity against HER2-overexpressing human breast adenocarcinoma cells and the significant synergetic effect, ~2200-fold, resulting in IC₅₀ = 0.0024 µg/mL (Guryev E.L. et al. 2020; Guryev E.L. et al. 2018). When combined with immunotherapy, image-guided targeted delivery of chemotherapeutic agents is a promising direction for combination cancer theranostics, but this approach has so far produced only limited success due to a lack of molecular targets on the cell surface and low therapeutic index of conventional chemotherapy drugs.

Aim. In present study we demonstrate a synergistic strategy of combination immuno/chemotherapy in conditions of dual regioselective targeting, implying vectoring of two distinct binding sites of a single oncomarker (here, HER2) with theranostic compounds having a different mechanism of action.

Materials and methods. We use: (i) PLGA nanoformulation, loaded with an imaging diagnostic fluorescent dye (Nile Red) and a chemotherapeutic drug (doxorubicin), and functionalized with affibody ZHER2:342 (8 kDa); (ii) bifunctional genetically engineered DARP-LoPE (42kDa) immunotoxin comprising of a low-immunogenic modification of therapeutic *Pseudomonas* exotoxin A (LoPE) and a scaffold targeting protein, DARPIn9.29 (14 kDa). According to the proposed strategy, the first chemotherapeutic nanoagent is targeted by the affibody to subdomain III and IV of HER2 with 60-fold specificity compared with nontargeted particles, while the second immunotoxin is effectively targeted by DARPIn molecule to subdomain I of HER2.

Results. We demonstrate that this dual targeting strategy can enhance anticancer therapy of HER2-positive cells with a very strong synergy, which made possible 1000-fold decrease of effective drug concentration in vitro and a significant enhancement of HER2 cancer therapy compared to monotherapy in vivo. Moreover, this therapeutic combination prevented the appearance of secondary tumor nodes. Thus, the suggested synergistic strategy utilizing dual targeting of the same oncomarker could give rise to efficient methods for aggressive tumors treatment (Shipunova V.O. et al., 2020). We also realized a dual targeting therapy based on protein preparations capable of recognizing different of tumor-associated antigens on a tumor cell producing a directed cytotoxic effect. We carried out a combined anti-cancer therapy directed toward HER2 and EpCAM, common tumor-associated antigens of breast cancer cells. The combined therapeutic effect is achieved owing to two highly toxic

proteins – already mentioned LoPE and ribonuclease Barnase from *Bacillus amyloliquefaciens*. The delivery of toxins to cancer cells was done by a targeting designed ankyrin repeat proteins (DARPin). We have shown that simultaneous treatment of breast carcinoma-bearing mice with anti-EpCAM fusion toxin based on LoPE and HER2-specific liposomes loaded with Barnase leads to concurrent elimination of primary tumor and metastases. Monotherapy with anti-HER2- or anti-EpCam-toxins did not produce a comparable effect on metastases. The proposed approach can be considered as a promising strategy for significant improvement of cancer therapy (Shramova E. et al., 2020).

Conclusion. So nanocarriers seem promising for targeted therapy. However, the physicochemical properties of most nanoparticles, primarily their size, are also the reason for their disadvantages. First of all, they are primarily associated with the rapid elimination of such agents from the bloodstream by the cells of the mononuclear phagocyte system (MPS) and the complement system, which leads to their high uptake by the liver and spleen and negatively affects the efficiency of delivery to the tumor. One of the promising methods to prolong blood circulation of the nanoparticles without their modification is MPS blockade. The method temporarily decreases macrophage endocytosis in response to uptake of a low-toxic non-functional material. The regulation of the MPS blockade demonstrates the potential for improving delivery of diagnostic and therapeutic nanomaterials (Nikitin M.P. et al., 2020; Mirkasymov A.B. et al., 2020; Zelepukin I.V. et al., 2021).

References

1. Guryev E.L., Smyshlyaeva A.S., Shilyagina N.Y., Sokolova E.A., Shanwar S., Kostyuk A.B., Lyubeshkin A.V., Schulga A.A., Konovalova E.V., Lin Q., Roy I., Balalaeva I.V., Deyev S.M., Zvyagin A.V. UCNP-based Photoluminescent Nanomedicines for Targeted Imaging and Theranostics of Cancer. *Molecules*. 2020;25(18):4302.
2. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodeneev V.A., Petrov R.V., Zvyagin A.V., Alferov Z.I., Deyev S.M. Radioactive (^{90}Y) upconversion nanoparticles conjugated with recombinant targeted toxin for synergistic nanotheranostics of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115(39):9690-9695.
3. Mirkasymov A.B., Zelepukin I.V., Nikitin P.I., Nikitin M.P., Deyev S.M. In vivo blockade of mononuclear phagocyte system with solid nanoparticles: Efficiency and affecting factors. *J. Control. Release*. 2021;330:111-118.
4. Nikitin M.P., Zelepukin I.V., Shipunova V.O., Sokolov I.L., Deyev S.M., Nikitin P.I. Enhancement of the blood-circulation time and performance of nanomedicines via the forced clearance of erythrocytes. *Nat. Biomed. Eng.* 2020;4(7):717-731.
5. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Zelepukin I.V., Schulga A.A., Proshkina G.M., Shramova E.I., Kutscher H.L., Telegin G.B., Kabashin A.V., Prasad P.N., Deyev S.M. Dual Regioselective Targeting the Same Receptor in Nanoparticle-Mediated Combination Immuno/Chemotherapy for Enhanced Image-Guided Cancer Treatment. *ACS Nano*. 2020;14(10):12781-12795.
6. Shramova E., Proshkina G., Shipunova V., Ryabova A., Kamyshinsky R., Konevega A., Schulga A., Konovalova E., Telegin G., Deyev S. Dual Targeting of Cancer Cells with DARPin-Based Toxins for Overcoming Tumor Escape. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):3014.
7. Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Ivanov I.N., Yuryev M.V., Cherkasov V.R., Deyev S.M., Nikitin P.I., Nikitin M.P. Long-Term Fate of Magnetic Particles in Mice: A Comprehensive Study. *ACS Nano*. 2021. doi: 10.1021/acsnano.1c00687.

ДИАГНОСТИКА ЛИМФОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-ТИО-Д-ГЛЮКОЗА

Е.А.Дудникова¹, В.И.Чернов^{1,2*}, А.В.Муравлева¹, А.А.Медведева¹, Р.В.Зельчан^{1,2}, О.Д.Брагина^{1,2},
А.Н.Рыбина¹, В.С.Скуридин², Е.С.Стасюк², В.Е.Гольдберг¹

¹НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

²Научно-исследовательский центр (НИЦ) «Онкотераностика»,

Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ),

г. Томск, Россия

e-mail: chernov@tnimc.ru

Ключевые слова: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-тио-д-глюкоза, лимфопролиферативные заболевания.

Введение. На сегодня ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ входит в алгоритм обследования пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями согласно Российским и международным клиническим рекомендациям (Аль-Ради Л.С. и др., 2014). В тоже время, несмотря на высокую эффективность применения ПЭТ с ^{18}F -ФДГ в диагностике, стадировании, оценке эффективности и прогнозе лечения лимфом, широкое применение этого метода в нашей стране лимитировано высокой стоимостью исследования и недостаточным количеством ПЭТ-центров, располагающихся преимущественно в

центральной России. Вместе с тем, в Российской Федерации достаточное количество радиодиагностических отделений, в которых активно используется ОФЭКТ. Наиболее часто используемым радионуклидом для ОФЭКТ является технеций-99m, поэтому представляется актуальным разработка инновационных радиофармацевтических препаратов для молекулярной визуализации на основе меченых технецием-99m производных глюкозы. Благодаря коллаборации Томского политехнического университета и НИИ онкологии Томского НИМЦ был реализован совместный проект «Доклинические исследования радиофармацевтического препарата на основе меченой ^{99m}Tc производной глюкозы для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний», а также разработан способ получения и контроля качества радиофармпрепарата «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» (^{99m}Tc-ТГ). Кроме того, были осуществлены доклинические исследования РФП на экспериментальных животных. Было доказано, что после внутривенной инъекции РФП ^{99m}Tc-ТГ активно накапливается в опухолевой ткани. Было доказано, что исследуемый препарат не обладает токсичностью, кумулятивностью, аллергизирующими свойствами. Сегодня этот РФП, представляет собой один из первых препаратов на основе глюкозы, при применении которого на стандартных гамма-камерах помимо возможности визуализации злокачественного процесса можно оценить метаболическую активность опухолевой ткани (Зельчан Р.В. и др., 2018). Основываясь на вышеизложенном, актуальным является оценка возможностей ОФЭКТ с применением нового РФП на основе меченой технецием-99m производной глюкозы у больных лимфопролиферативными заболеваниями.

Цель. Изучить возможности применения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с новым отечественным РФП ^{99m}Tc-ТГ для оценки распространенности и эффективности результатов лечения злокачественных лимфом.

Материалы и методы. В исследование приняли участие 53 пациента с диагнозом лимфома и аденопатия (38 и 15 человек соответственно), которым выполнялась ОФЭКТ с ^{99m}Tc-ТГ. Группу сравнения составили 30 пациентов, которые проходили обследование в ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Красноярск). Всем им выполнялась ПЭТ с ¹⁸F-ФДГ. В ходе клинических исследований препарата ^{99m}Tc-ТГ были изучены его фармакокинетические характеристики и динамика аккумуляции в опухолевой ткани у пациентов со злокачественными лимфомами. На основании выполненных исследований осуществлялось определение оптимальных временных интервалов для визуализации лимфопролиферативных заболеваний с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с ^{99m}Tc-ТГ. В работе в сравнительном аспекте изучалась эффективность применения ПЭТ с ¹⁸F-ФДГ и ОФЭКТ с ^{99m}Tc-ТГ для диагностики, стадирования, оценки результатов терапии и прогноза медикаментозного лечения лимфом.

Результаты. Первоочередной задачей нашей работы являлось определения оптимальных сроков выполнения ОФЭКТ с ^{99m}Tc-ТГ у больных с лимфомами. Для этого был осуществлен расчет полуколичественных показателей опухоль/фон и опухоль/кровь на разных сроках (спустя 1, 2 и 4 часа) после введения РФП. Полученные результаты продемонстрировали отсутствие достоверных различий приведенных показателей на выбранных временных точках, а опухолевые очаги четко визуализировались на всех контрольных интервалах и дифференцировались от окружающих неизменных тканей. Проведя анализ показателей опухоль/фон и опухоль/кровь на определенных ранее контрольных точках, нами был сделан вывод, что ОФЭКТ с ^{99m}Tc-ТГ для визуализации лимфом можно выполнять во временном интервале между 1 и 4 часами после инъекции, поскольку показатели в этом промежутке времени значимо не изменяются. Максимальную четкость скинтиграмм нам удалось получить на часовом интервале, что связано с большей статистической плотностью изображения, которая объясняется фармакокинетическими характеристиками ^{99m}Tc-ТГ. Еще одной особенностью фармакокинетики ^{99m}Tc-ТГ являлась высокая фоновая активность крови, которая оставалась неизменной, в течение 4 часов после введения РФП, в связи с чем было сложно оценить зоны поражения, граничащие с областью сердца, крупными сосудами и активно васкуляризованными тканями, так как такая интенсивность циркуляции РФП в пуле крови способна экранировать исследуемую зону. Таким образом, нами был сделан вывод, о целесообразности совмещения (программного или аппаратного) скинтиграфических и КТ изображений для разграничения патологических опухолевых очагов и пула крови. На основании полученных результатов было продемонстрировано значительное превосходство ПЭТ/КТ с ¹⁸F-ФДГ по сравнению с традиционными методами при диагностике нодальных и экстранодальных поражений, а также при стадировании лимфопролиферативных заболеваний. Чувствительность ПЭТ/КТ с ¹⁸F-ФДГ оказалась значительно выше традиционных методов лучевой диагностики при оценке вовлечение в опухолевый процесс лимфатических узлов (88% и 63%, соответственно), а также экстранодальных поражений (90% и 52%, соответственно) у больных лимфомами. Впервые в мировой ядерной медицине была выполнена оценка диагностической эффективности ОФЭКТ с новым отечественным РФП ^{99m}Tc-ТГ в диагностике и стадировании лимфом в сравнении со стандартными методами обследования. При этом было показано, что, обладая высокой специфичностью (93%), по показателю чувствительность, ОФЭКТ с ^{99m}Tc-ТГ уступает ПЭТ/КТ с ¹⁸F-ФДГ в выявлении нодальных и экстранодальных поражений (69% и 72%, соответственно) (рис. 1). Тем не менее, использование ОФЭКТ с ^{99m}Tc-ТГ в качестве дополнительного метода диагностики при выполнении стандартных (анатомических) исследований позволяет повысить чувствительность выявления нодальных и экстранодальных поражений до 91% и 96%, соответственно, и скорректировать клиническую стадию лимфопролиферативного заболевания у 21% обследуемых.

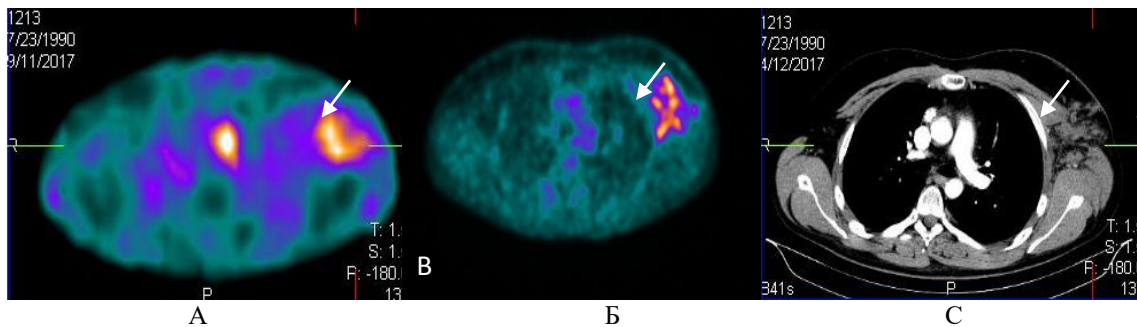


Рис. 1. Визуализация пораженного аксиллярного лимфатического узла слева (стрелки) по данным ОФЭКТ с ^{99m}Tc -ТГ (А), ПЭТ с ^{18}F -ФДГ (В) и КТ (С)

Исследование возможностей ПЭТ с ^{18}F -ФДГ и ОФЭКТ с ^{99m}Tc -ТГ в оценке эффективности и прогнозе результатов лечения лимфом, показало, что радионуклидные методы визуализации с использованием указанных РФП позволяют оценить влияние лекарственного лечения на метаболизм опухоли у больных лимфомами. При этом, наличие полного метаболического ответа опухоли после 2 курсов терапии, как по данным ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ, так и по результатам ОФЭКТ с ^{99m}Tc -ТГ свидетельствует о высоком уровне безрецидивной выживаемости.

Заключение. Включение в диагностический алгоритм ОФЭКТ с ^{99m}Tc -ТГ, позволяет оптимизировать применение радионуклидных методов исследования на этапах первичной диагностики, мониторинге и прогнозе эффективности терапии злокачественных лимфом.

Литература

1. Аль-Ради Л.С., Барях Е.А., Белоусова И.Э., Бессмельцев С.С. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний. *Современная онкология*. 2014;S:6-126.
2. Зельчан Р.В., Медведева А.А., Синилкин И.Г., Брагина О.Д. Изучение функциональной пригодности туморотропного радиофармпрепарата ^{99m}Tc -1-тио-D-глюкоза в эксперименте. *Молекулярная медицина*. 2018;16(2). DOI: 10.29296/24999490-2018-02-

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА « ^{99m}Tc -1-ТИО-D-ГЛЮКОЗА»

Р.В. Зельчан^{1,2*}, В.И. Чернов^{1,2}, А.А. Медведева¹, О.Д. Брагина^{1,2}, А.Н. Рыбина¹

¹НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

²Научно-исследовательский центр (НИЦ) «Онкотерагностика»,

Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ), г. Томск, Россия

e-mail: r.zelchan@yandex.ru

Ключевые слова: радиофармпрепарат, глюкоза, опухоли головного мозга.

Введение. Более тридцати процентов (30,2%) всех опухолей ЦНС являются злокачественными. При этом в 14,6% случаев опухоль представлена глиобластомой головного мозга, которая составляет практически половину (48,3%) от всех первичных злокачественных опухолей ЦНС. В развитых странах пятилетняя выживаемость пациентов с опухолями головного мозга не превышает 35,8%. Самые низкие показатели пятилетней выживаемости пациентов со злокачественными новообразованиями ЦНС наблюдаются в возрастной группе ≥ 40 лет, всего 21,3%, а это самый активный в социальном отношении возраст. Методы ядерной медицины достаточно широко применяются в диагностике опухолей головного мозга. Передовым методом считается позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с различными препаратами. Следует отметить, что доступность ПЭТ ограничена ввиду малого количества ПЭТ-центров и высокой стоимости процедуры (Chernov V.I. et al., 2015; Chernov V. et al., 2016). Наряду с этим однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) является более распространенным и доступным методом ядерной медицины, а применение при ОФЭКТ радиофармпрепаратов на основе меченных технецием-99m производных глюкозы, позволит получать диагностическую информацию по уникальности и достоверности не уступающую ПЭТ исследованиям (Seidensticker M., 2014; Van Dijken B., 2017; Chernov V.I. et al., 2018; Stasyuk E. et al., 2020).

Цель. Изучить возможность применения радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) на основе меченного технецием-99m производного глюкозы « ^{99m}Tc -1-тио-D-глюкоза» для визуализации злокачественных опухолей головного мозга методом ОФЭКТ.

Материалы и методы. В исследование включены 70 пациентов с диагнозом злокачественная опухоль головного мозга Grade II–IV, а также 10 пациентов с доброкачественными объемными образованиями

головного мозга. Из них у 5 пациентов по данным МРТ диагностирована киста головного мозга и у 5 пациентов менингиома. Изучение фармакокинетики и особенностей биораспределения РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» выполнялось на двухдетекторной гамма-камере E.CAM180 (Siemens, Германия). Исследование проводилось в планарном режиме с использованием протокола Whole body в положении пациента лежа на спине через 2, 4, 6 и 24 ч после внутривенного введения препарата. Расчет уровня накопления препарата в основных органах и тканях производился в каждой временной точке (2, 4, 6 и 24 ч после введения) в двух проекциях и представлялся как среднее геометрическое для каждой выбранной зоны интереса. Поглощенные и эффективные дозы рассчитывались с использованием компьютерного кода OLINDA/EXM 1.1 для фантомов взрослых мужчины и женщины. Для изучения диагностической эффективности метода в отношении злокачественных опухолей головного мозга скинтиграфическое исследование с «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» выполнялось в режиме однофотонной эмиссионной компьютерной томографии через 2 ч после внутривенного введения. При исследовании использовались коллиматоры высокого пространственного разрешения для энергии 140 кэВ, производилась запись 32 проекций по 30 с на одну проекцию в матрицу 256x256 пикселей, аппаратное увеличение не использовалось. В ходе постпроцессинговой обработки с использованием специализированного программного пакета E.Soft получали трехмерное изображение исследуемой области с последующей автоматической реконструкцией классических сагиттальных, поперечных и коронарных срезов. При анализе результатов ОФЭКТ с «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» головного мозга полученные томосцинтиграммы оценивались визуально, а также рассчитывался полуколичественный показатель опухоль/фон, отражающий уровень аккумуляции РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» в опухолевой ткани.

Результаты. Установлено, что после однократного внутривенного введения «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» наиболее интенсивно накапливается в почках, легких, печени и тонком кишечнике. Помимо перечисленных органов, отмечалось умеренное накопление препарата в яичках у мужчин. Важной особенностью, обнаруженной при исследовании фармакокинетики «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза», является минимальное накопление в интактном головном мозге пациентов. Период полувыведения РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» из плазмы крови пациентов составил $T_{1/2} = 5,9 \pm 2,4$ мин. Период полувыведения препарата из организма в целом составил $T_{1/2} = 2,78 \pm 0,12$ ч. При проведении дозиметрических исследований наименьшие поглощенные дозы облучения после однократного внутривенного введения «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» были зафиксированы в головном мозге и мышечной ткани. К критическим органам при применении РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» следует отнести почки, мочевой пузырь и яички у мужчин. На основании полученных данных было установлено, что эффективная доза облучения при однократном внутривенном введении «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» для женщин составляет $0,0056 \pm 0,0005$ мЗв/МБк, а для мужчин – $0,006 \pm 0,002$ мЗв/МБк. В основной группе пациентов с диагнозом злокачественная опухоль головного мозга при ОФЭКТ с «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» опухолевая ткань визуализировалась во всех случаях (рис. 1).

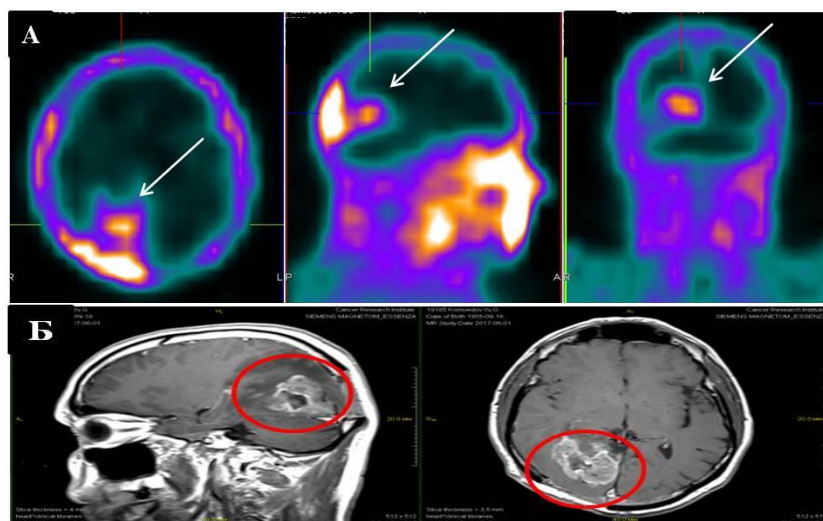


Рис. 1. ОФЭКТ с РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» головного мозга через 2 ч после внутривенного введения препарата (А) и МРТ (Б). Пациент Б., Ds.: Анапластическая астроцитома правой затылочной доли, Grade III. Визуализируется очаг патологической гиперфиксации РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» в проекции опухоли затылочной доли справа (стрелка). Данные ОФЭКТ (А) подтверждаются данными МРТ (Б), при которой визуализируется опухоль правой затылочной доли (зона интереса выделена кругом)

Чувствительность ОФЭКТ с РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» в визуализации опухолей головного мозга составила 93–100%; ДИ 95%. При этом в группе пациентов с доброкачественными объемными образованиями головного мозга накопление РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» в проекции мозга выявлено не

было. Полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности (65–100%; ДИ 95%) ОФЭКТ с РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» в визуализации злокачественных опухолей головного мозга. Показатели точности метода в диагностике злокачественных опухолей головного мозга Grade II–IV составили 95–100%; ДИ 95%. При количественном анализе результатов ОФЭКТ с РФЛП «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» у пациентов со злокачественными опухолями головного мозга была продемонстрирована зависимость уровней показателя опухоль/фон от степени злокачественности опухолей Grade II–IV. Установлено, что пороговое значение показателя опухоль/фон < 4,425 характерно для опухолей головного мозга Grade II, а значения показателя опухоль/фон > 4,425 свидетельствует о наличии у пациента опухоли Grade III. Выполненный ROC-анализ с целью определения предиктивной значимости показателя опухоль/фон в отнесении опухоли головного мозга к Grade III–IV по данным ОФЭКТ с «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» продемонстрировал, что для опухолей головного мозга Grade III характерно значение менее 8,205, а для опухолей Grade IV – более 8,205. Таким образом, пороговые значения показателя опухоль/фон по данным ОФЭКТ с «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» составляют для Grade II менее 4,425; Grade III 4,425–8,205; Grade IV более 8,205. Также следует отметить, что при анализе результатов исследования выявлена положительная статистически достоверная корреляционная связь показателя опухоль/фон с пролиферативным маркером Ki-67 (p=0,0001).

Заключение. Препарат «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» безопасен для человека при однократном внутривенном введении и может быть использован для визуализации злокачественных опухолей головного мозга Grade II–IV методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. Значения показателя опухоль/фон при ОФЭКТ головного мозга с «^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза» коррелируют с пролиферативным маркером Ki-67 и степенью злокачественности опухоли головного мозга.

Литература

1. Chernov V.I., Dudnikova E.A., Zelchan R.V., Kravchuk T.L., Danilova A.V., Medvedeva A.A., Sinilkin I.G., Bragina O.D., Goldberg V.E., Goldberg A.V., Frolova I.G. The first experience of using ^{99m}Tc-1-thio-d-glucose for single-photon emission computed tomography imaging of lymphomas. *Siberian Journal of Oncology*. 2018;17(4):81-87.
2. Chernov V., Sinilkin I., Choynzonov E., Chijevskaya S., Titskaya A., Zelchan R., Bragina O., Lyapunov A., Skuridin V. Comparative evaluation of ^{99m}Tc-Al₂O₃ and ^{99m}Tc-fitat nanocolloids for sentinel lymph nodes visualization in patients with cancer of larynx and hypopharynx *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015;42(S1):704.
3. Chernov V.I., Sinilkin I.G., Zelchan R.V., Medvedeva A.A., Lyapunov A.Yu., Bragina O.D., Varlamova N.V., Skuridin V.S. Experimental study of ^{99m}Tc-aluminum oxide use for sentinel lymph nodes detection. *AIP conference proceedings*. 2016:020012-020012-5.
4. Seidensticker M, Ulrich G, Muehlberg FL, Pethe A, Grosser OS, Steffen IG, Stiebler M, Goldschmidt J, Smalla KH, Seidensticker R, Ricke J, Amthauer H, Mohnike K. Tumor cell uptake of ^{99m}Tc-labeled 1-thio-β-D-glucose and 5-thio-D-glucose in comparison with 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose in vitro: kinetics, dependencies, blockage and cell compartment of accumulation. *Mol Imaging Biol*. 2014;16(2):189–198. DOI: 10.1007/s11307-013-0690-3.
5. Stasyuk E, Skuridin V, Rogov A, Zelchan R, Sadkin V, Varlamova N, Nesterov E. ^{99m}Tc-labeled monosaccharide kits: Development methods and quality control [Electronic Resource] *Scientific Reports*. 2020;10(1). DOI:10.1038/s41598-020-61707-7.
6. Van Dijken B., van Laar P.J., Holtman G.A., van der Hoorn A. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging techniques for treatment response evaluation in patients with high-grade glioma, a systematic review and meta-analysis. *European Radiology*. 2017;(27):4129-4144.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОЙ ТАРГЕТНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ЭКЗОТОКСИНА A PSEUDOMONAS И HER2-СПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА

Е.А. Безверхняя^{1,5}, М.С. Ларькина^{1,5*}, М.С. Третьякова¹, Е.В. Плотноков¹, Е.В. Подрезова¹,
Ю.В. Шабанова^{1,5}, А.А. Шульга^{1,4}, Р.В. Зельчан^{1,2}, В.И. Чернов^{1,2}, М.С. Юсубов¹,
М.В. Белоусов^{1,5}, В.М. Толмачев^{1,3}, С.М. Деев^{1,4}

¹Научно-исследовательский центр (НИЦ) «Онкотерапевтика», Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ), г. Томск, Россия

²НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

³Университет Уппсалы, г. Уппсала, Швеция

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия

⁵Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

e-mail: maraiialarkina@mail.ru

Ключевые слова: таргетная терапия, рецептор HER2, экзотоксин A Pseudomonas, DARPIn. **Введение.** Таргетные терапевтические средства оказывают избирательное цитостатическое или цитотоксическое

действие на опухолевые клетки, уменьшая токсичность для нормальных клеток. Одной из перспективных молекулярных мишеней, изучаемых при злокачественных опухолях, является рецептор эпидермального фактора роста HER2, гиперэкспрессия которого отмечается во многих человеческих карциномах (рак молочной железы, яичников, легких, желудка, простаты и др.) (Hodeib M. et al., 2015). В настоящее время в лечении онкологических больных с HER2-положительным статусом в активно используются таргетные моноклональные антитела (трастузумаб, пертузумаб, конъюгат трастузумаб-эмтазин), а также низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназной активности ERBB2 (лапатиниб и нератиниб) (Goutsouliak K. et al., 2020). Однако, токсичность и недостаточная эффективность существующей терапии актуализируют создание новых таргетных конструкций. Таким образом, представляет интерес для изучения новая таргетная конструкция DARPIn G3-linker-LoPE (далее сокращено по тексту G3-LoPE), в которой был использован экзотоксин A Pseudomonas со сниженной иммуногенностью и низкой общей токсичностью (LoPE). LoPE характеризуется высокой цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам, однако самостоятельно не способен избирательно связываться с опухолевыми клетками (Sokolova E.A. et al., 2019). В качестве эффективного модуля для доставки токсина LoPE к опухолевой клетки в данной конструкции предлагаются рекомбинантные адресные молекулы белковой природы с анкириновыми повторами DARPIn G3 с пикомолярной аффинностью к HER2-рецептору. Доклинические и первые клинические результаты применения вариантов DARPIn для радионуклидной диагностики показали многообещающие результаты (Tolmachev V. et al., 2021). Следует отметить, что использование DARPIn G3, специфичного к эпитопу HER2, отличающегося от эпитопов, с которыми связываются моноклональные антитела, позволит увеличить эффективность терапии для персонализированной медицины HER2-положительных опухолей.

Цель. Исследование новой таргетной конструкции G3-LoPE как перспективного агента для таргетной терапии злокачественных опухолей с гиперэкспрессией HER2 рецептора.

Материалы и методы. Нарботка G3-LoPE проводилась по способу, описанному в источнике (Shramova E. et al., 2020). Для исследований *in vitro* G3-LoPE получали его комплекс с ^{99m}Tc , используя набор для приготовления трикарбонильного технеция «CRS Isolink» (Paul Scherrer Institute, Швеция) и натрия пертехнетата, ^{99m}Tc с активностью 2,0 – 4 ГБк. Также получали комплекс ^{99m}Tc -G3 для последующей радионуклидной визуализации ксенографтов злокачественных опухоли человека у мышей (Deyev S. et al., 2019). Для очистки комплексов ^{99m}Tc -G3-LoPE и ^{99m}Tc -G3 применяли картридж для гель-фильтрации NAP-5 (GE Healthcare, Швейцария). Радиохимическую чистоту и выход комплексов проводили на ТСХ-сканера (ELYSIA Raytest, Германия). Для изучения специфичности ^{99m}Tc -G3-LoPE использовались клеточные линии с различным уровнем экспрессии HER2: SKOV-3 (клетки рака яичника человека), SK-BR-3 (клетки рака молочной железы), PC-3 (клетки рака предстательной железы). Эксперимент проводили с блокированием рецепторов немеченым DARPIn G3 (100 кратный мольный избыток, 200 нМ). Интернализацию G3-LoPE изучали во время непрерывной инкубации клеток SKOV-3 и SK-BR-3 с 1 нМ раствором ^{99m}Tc -G3-LoPE в течение 24 ч методом последовательной обработки 0,2 М глициновым буфером, содержащим 4 М мочевины (pH=2), и 1 М раствором натрия гидроксида (Deyev S. et al., 2019). Радиоактивность каждой фракции в экспериментах измеряли с помощью автоматического гамма-спектрометра Wizard 1428 (Pelkin Elmer, США) и считали связанную клетками радиоактивность в % на 10^6 клеток. Аффинность связывания ^{99m}Tc -G3-LoPE с клетками SKOV-3 была измерена на приборе LigandTracer Yellow Instrument (Ridgeview Instruments, Vänge, Швеция) как описано в источнике (Deyev S. et al., 2019). Оценку специфической цитотоксичности G3-LoPE проводили по методу МТТ-теста (Sokolova E.A. et al., 2019), используя опухолевые клетки SKOV-3, SK-BR-3 и PC-3. Статическую сцинтиграфию всего тела животных после внутривенного введения 100 мкл (8 МБк) раствора, содержащего 10 мкг G3, меченого ^{99m}Tc , проводили на гамма-камере E.CAM (Siemens, Австрия). Терапевтическая эффективность G3-LoPE отдельно и в комбинации с трастузумабом изучалась на иммунодефицитных мышах NU/J с ксенографтами SKOV-3, экспрессирующими HER2, и PC-3 с низкой экспрессией HER2 (80 мышей, 8 групп, n=10). Через неделю после имплантации опухолевых клеток контрольной группе А вводили 0,5 % BSA в PBS, в/б; группам В и D трастузумаб в дозе 8 мг/кг в течение первых двух недель, а затем 4 мг/кг в течение четырех недель, подкожно; группам С и D – токсин G3-LoPE в дозе 1-4 мг/кг (в/б, 10 доз). Оценивали рост опухоли и выживаемость мышей трижды в неделю.

Результаты. G3-LoPE продемонстрировал дозозависимый цитотоксический эффект для клеток SKOV-3 со значением IC_{50} 200 пМ, что характеризует его высокоцитотоксичным. Для последующего изучения G3-LoPE *in vitro* был получен радиокомплекс ^{99m}Tc -G3-LoPE с радиохимическим выходом 65 ± 3 % (изолированный выход 50 ± 2 %) при радиохимической чистоте свыше 98 % после очистки. Изучение специфичности *in vitro* ^{99m}Tc -G3-LoPE продемонстрировало, что связывание с SKOV-3 ($10,4 \pm 0,4$ %), SK-BR-3 ($14,6 \pm 0,7$ %) и PC-3 ($0,56 \pm 0,03$ %) является насыщаемым (специфичным) и пропорционально уровню экспрессии HER2 клеток, при этом при блокировании рецепторов избытком немеченого белка отмечается значительное снижение связывания радиокомплекса во всех группах клеток. Аффинность связывания ^{99m}Tc -G3-LoPE с SKOV-3 несколько ухудшается по сравнению с неслитым G3, но остается в пикомолярном диапазоне ($K_D = 270$ пМ). Интернализация ^{99m}Tc -G3-LoPE в SKOV-3 и SK-BR-3 происходит достаточно быстро (40-50 % за 24 часа), что создает предпосылки для эффективной внутриклеточной доставки токсина. Радионуклидная молекулярная визуализация с радиокомплексом ^{99m}Tc -G3 позволяет различать опухоли с высокой и низкой экспрессией HER2, что подтверждает высокую HER2-специфичность DARPIn G3

(рисунок 1). Оценка терапевтического эффекта изучаемой таргетной конструкции у мышей с ксенографтами SKOV-3, экспрессирующими HER2, показала продление медианной выживаемости мышей по сравнению с контролем при монотерапии G3-LoPE в 1,5 раза, при монотерапии трастузумабом в 1,35 раза, а при их комбинации в 1,26 раза. Следовательно, сравнение терапевтической эффективности комбинированного лечения G3-LoPE и трастузумаба и монотерапии G3-LoPE на рост опухоли и выживаемость мышей, показало выше эффективность монотерапии. Возможным объяснением этого результата является тот факт, что трастузумаб убирает с поверхности опухолевых клеток рецепторы HER2. Кроме того отмечается значительный эффект монотерапии G3-LoPE даже в опухолях PC-3 с низкой экспрессией HER2 (медианная выживаемость в 1,2 раза выше по сравнению с контрольной группой), при этом в группе животных, получавших трастузумаб – эффективность низкая (медианная выживаемость только в 1,1 раза выше, чем в контроле). Также отмечено, что никакой тенденции к потере веса не наблюдалось ни в одной из групп мышей по сравнению с контрольными группами, что свидетельствует о хорошей переносимости лечения.

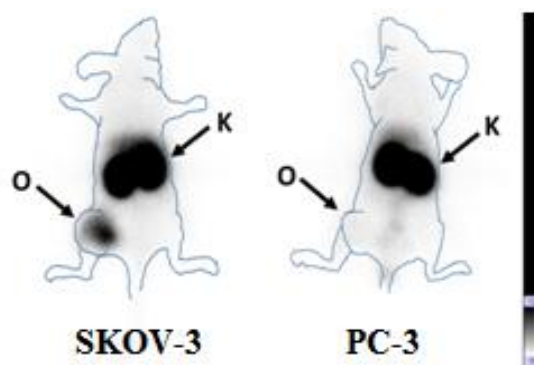


Рис 1. Сцинтиграфические изображения HER2(+) опухоли (SKOV-3) в сравнении с HER2(-) опухолью (PC-3) (4 ч после вн/в введения ^{99m}Tc -G3 мышам (К – почки, О – опухоль)

Заключение. G3-LoPE специфически связывается с опухолями и обеспечивает противоопухолевый эффект в ксенографтах SKOV-3, экспрессирующих HER2. Следовательно, G3-LoPE может быть потенциальной таргетной терапевтической стратегией для HER2-положительного рака. Также следует отметить, что использование ^{99m}Tc -DARPin G3 является подходящим средством для визуализации экспрессии HER2 и стратификации пациентов для терапии, направленной на HER2.

Исследование финансировалось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (075-15-2019-1925).

Литература

1. Deyev S., Vorobyeva A., Schulga A., Proshkina G., Güler R., Löfblom J., Mitran B., Garousi J., Altai M., Buijs J. et al. Comparative evaluation of two DARPin variants: effect of affinity, size, and label on tumor targeting properties. *Mol. Pharm.* 2019;16:995-1008. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00922.
2. Goutsouliak K., Veeraraghavan J., Sethunath V., De Angelis C., Osborne C. K., Rimawi M. F., Schiff R. Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2020;17:233-250. DOI:10.1038/s41571-019-0299-9.
3. Hodeib M., Serna-Gallegos T., Tewari K. S. A review of HER2-targeted therapy in breast and ovarian cancer: lessons from antiquity - CLEOPATRA and PENELOPE. *Future Oncol.* 2015;11:3113-3131. DOI:10.2217/fon.15.266.
4. Shramova E., Proshkina G., Shipunova V., Ryabova A., Kamyshinsky R., Konevega A., Schulga A., Konovalova E., Telegin G., Deyev S. Dual targeting of cancer cells with DARPin-based toxins for overcoming tumor escape. *Cancers (Basel)*. 2020;12:3014. DOI:10.3390/cancers12103014.
5. Sokolova E.A., Shilova O.N., Kiseleva D.V., Schulga A.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. HER2-specific targeted toxin DARPin-LoPE: immunogenicity and antitumor effect on intraperitoneal ovarian cancer xenograft model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(10):E2399. DOI: 10.3390/ijms20102399.
6. Tolmachev V., Bragina O., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A., Orlova A., Deyev S., Chernov V. First-in-human evaluation of [^{99m}Tc](HE) $_3$ -G $_3$, a novel DARPin-based agent for imaging of HER2 expression in breast cancer. *Nucl. Med. Biol.* 2021;96-97: S17-S18. DOI:10.1016/S0969-8051(21)00295-X.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЦЕНТРЕ
ЯДЕРНОЙ МЕДИЦИНЫ ФГБУ ФСНКЦ ФМБА РОССИИ

А.В. Озерская^{1,2*}, К.В. Белугин²

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
г. Томск, Россия

²Центр ядерной медицины, ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального
медико-биологического агентства», г. Красноярск, Россия

Email: Ozerskaya_av@skc-fmba.ru

Ключевые слова: Позитронная эмиссионная томография, аптамер, синтез, асцитная карцинома Эрлиха, радиофармацевтический лекарственный препарат.

Введение. В последнее время стала актуальна разработка способов специфической противоопухолевой терапии и диагностики на основе аптамеров (Корсунский В.Н. и др., 2007). На сегодняшний день не существует универсальной технологии синтеза радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП) на основе аптамеров (Shi H. et al., 2011; Jacobson O. et al., 2015), поэтому в ходе работы необходимо было подобрать качественный и количественный состав реагентов для получения стабильного целевого продукта с высокой радиохимической чистотой. Для создания фармацевтической субстанции для синтеза РФЛП на первом этапе были выбраны ДНК-аптамеры, высокоаффинные к асцитным клеткам карциномы Эрлиха (Радько С.П. и др., 2007). Также параллельно совместно с Национальным исследовательским Томским политехническим университетом и Сибирским государственным медицинским университетом идет работа по разработке методов синтеза РФЛП с помощью пептидов, используя простетическую группу [¹⁸F]-фторбензойную или [¹⁸F]-фторалифатическую кислоты в виде N-сукцинимидных эфиров.

Цель. Разработка новых радиофармпрепаратов на основе аптамеров, специфически связывающихся только с опухолевыми клетками, что позволит выявить не только первичную опухоль, но и метастазы.

Материалы и методы. Аптамеры – одноцепочечные ДНК-или РНК- олигонуклеотиды (ООО «АптаМир», г. Красноярск), которые благодаря своей уникальной пространственной конформации имеют высокую специфичность и сродство к заданным мишеням. В качестве радиоактивной метки был выбран ультракороткоживущий радионуклид с позитронным типом распада - ¹¹C (T_{1/2} = 20,38 минут). Синтез фармацевтической субстанции проводился в радиохимической лаборатории Циклотронно-радиохимического комплекса, наработку ультракороткоживущих позитрон-излучающих радионуклидов (УКЖР) проводили на циклотроне «Cyclone 18/9 ST» («IBA», Бельгия), синтез осуществляли на модуле Synthra MeI-Plus-CO₂ («Synthra», Германия), который позволяет получать метилйодид ¹¹C-CH₃I из диоксида углерода ¹¹C-CO₂. Синтез включает в себя стадию введения метки ¹¹C в молекулу – ДНК-олигонуклеотида. В исследованиях использовались разные модели опухолей: асцитная, солидная и метастатическая. Асцитные опухоли образовывались при внутрибрюшинной инъекции 2 миллионов культивируемых асцитных клеток Эрлиха. Модели опухолей были сформированы путем инокуляции 1 миллиона клеток Эрлиха в бедренную мышцу мышей. А метастазы образовывались при внутривенном введении 0,3 миллиона клеток Эрлиха в хвостовую вену мышей. Визуализацию опухолевых очагов у мышей проводили на ПЭТ/КТ-томографе Discovery 600 (General Electric, США).

Результаты. На основании выполняемых исследований был получен комплекс 3'-¹¹C-праймер-аптамер AS-14, объем комплекса - 1,5 мл, активность составила 0,7 ГБк. Данного количества достаточно для выполнения последующих исследований. Схема синтеза и конфигурация ДНК-олигонуклеотида представлена на рисунке 1.

Способность комплекса 3'-¹¹C-праймер-аптамер AS-14 находить и обнаруживать опухолевые очаги и метастазы в организме оценивали на мышцах ICR с опухолями Эрлиха. Визуализацию опухолевых очагов проводили методом ПЭТ/КТ с использованием комплекса 3'-¹¹C-праймер-аптамер AS-14, полученные изображения представлены на рисунке 2.

Также наличие опухолевых очагов у мышей доказывалось с помощью вскрытия животных и гистологических исследований. Результаты показали наличие метастазов в печени, легких, тимусе, кишечнике и наличие опухолевых очагов в легких, щитовидной железе, почках и семенниках.

Заключение. В ходе выполнения научно-исследовательской работы был получен комплекс 3'-¹¹C-праймер-аптамер AS-14, обладающий высокой аффинностью и специфичностью к асцитным клеткам карциномы Эрлиха. Комплекс 3'-¹¹C-праймер-аптамер AS-14 показал свою высокую эффективность связываться с асцитными клетками карциномы Эрлиха в метастазах мыши, что необходимо для точной диагностики опухолевых очагов методом ПЭТ/КТ. Комплекс 3'-¹¹C-праймер-аптамер AS-14 в совокупности с используемым методом ПЭТ/КТ оказался способным выявлять даже очень маленькие метастазы в организме мыши. При этом препарат обладает минимальной токсичностью.

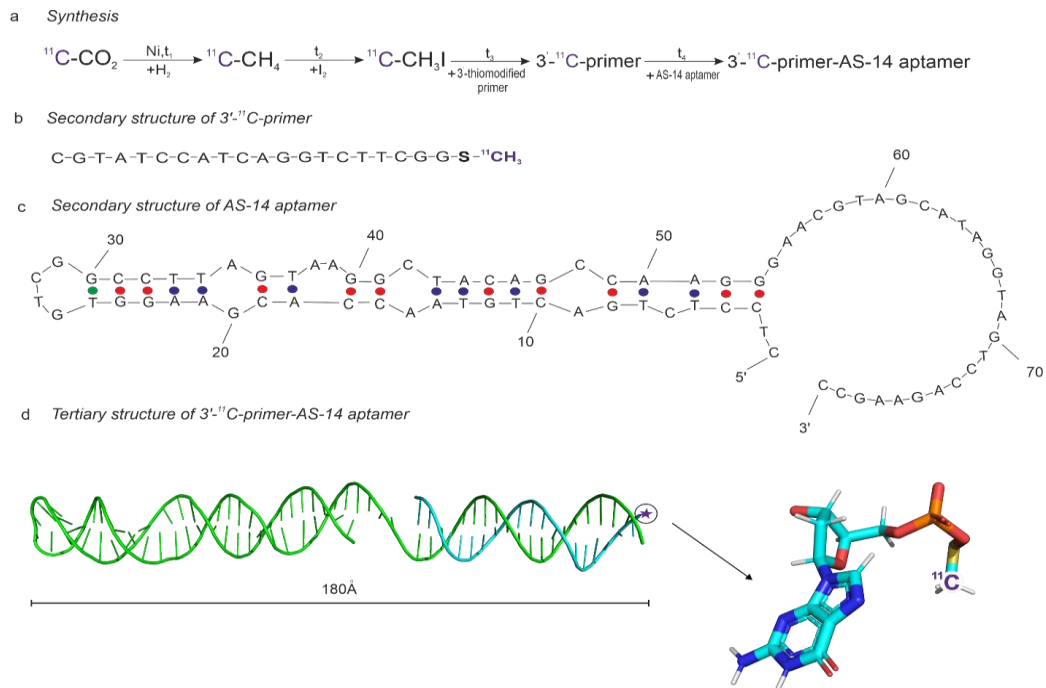


Рис. 1. Синтез комплекса 3'-¹¹C-праймер-аптамер AS-14

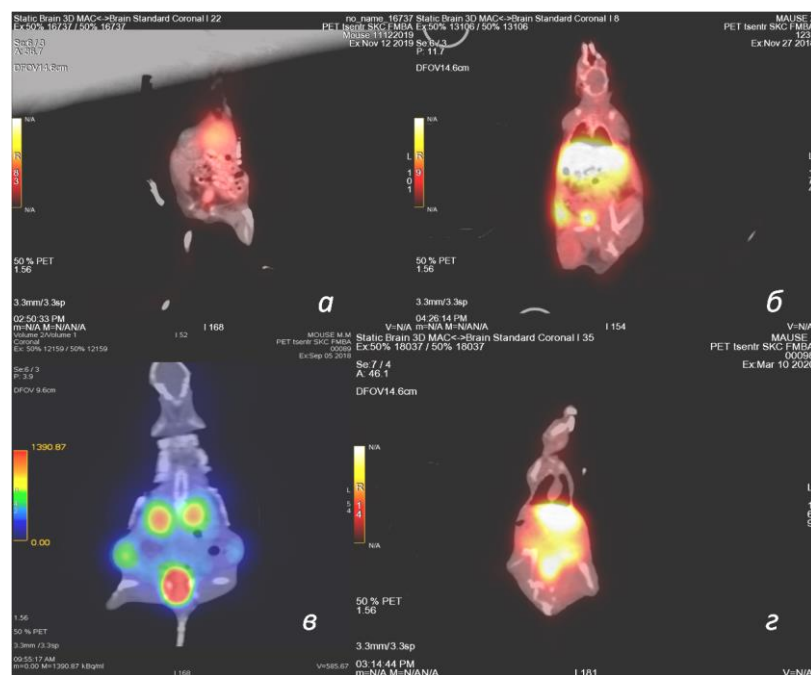


Рис. 2. Визуализация опухолевых очагов методом ПЭТ/КТ с использованием комплекса 3'-¹¹C-праймер-аптамер AS-14: а – метастазы в кишечнике, легких и семеннике; б – метастазы печени и бедра; в – опухоль бедра; г – асцитная опухоль

Литература.

1. Корсунский В.Н., Кодина Г.Е., Брускин А.Б. Ядерная медицина. Современное состояние и перспективы развития (Аналитический обзор и предложения). *Атомная стратегия*. 2007;5(31): 4–6.
2. Радько С.П., Бадоев С.Ю., Рахметова Н.В., Арчаков А.И. Аптамеры как перспективные аффинные реагенты для клинической протеомики *Биомедицинская химия*. 2007;53:5–24.
3. Hoshika S., Minakawa N., Matsuda A. Synthesis and physical and physiological properties of 4'-thioRNA: application to postmodification of RNA aptamer toward NF-kappaB. *Nucleic Acids Research*. 2004;32:3815–25.

4. Jacobson O., Yan X., Niu G., Weiss I.D., Ma Y., Szajek L.P., Shen B., Kieseewetter D.O., Chen X. PET imaging of tenascin-C with a radiolabeled single-stranded DNA Aptamer. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2015;56:616–621.
5. Shi H., He X., Wang K., Wu X., Ye X., Guo Q., Tan W., Qing Z., Yang X., Zhou B. Activatable aptamer probe for contrast-enhanced *in vivo* cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108:3900–3905.

THERANOSTICS FOR PROSTATE CANCER:
COMBINED TARGETED RADIONUCLIDE IMAGING AND THERAPY

A.M. Orlova^{1,2*}, A. Abouzaed², F. Lundmark², S.S. Rinne²,

A.N. Rybina^{1,4}, A.G. Vorobyeva^{1,3}, V.M. Tolmachev^{1,3}, V.I. Chernov^{1,4}

¹Research Centrum for Oncotheranostics, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

²Department of Medicinal Chemistry, Uppsala University, Uppsala, Sweden;

³Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Uppsala, Sweden

⁴Department of Nuclear Medicine, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia;

e-mail: anna.orlova@ilk.uu.se

Keywords: tumor targeting, radionuclide, prostate cancer

Introduction. The main challenge in prostate cancer (PCa) is the treatment of patients with disseminated disease. Systemic therapy of advanced PCa has gained several recent additions to the therapeutic armamentarium, drugs for immune-, chemo-, and radionuclide therapy, that extend survival of patients with castration-resistant PCa for a few months, and further treatment improvement is required (Mooney D. et al., 2014). Recent advances in imaging (particularly PSMA-PET and MR) allowed to identify men with an oligometastasis (below 3-5 local metastases), and mounting evidences suggest that durable control over further progression and even curative effect is attainable for patients at this stage of PCa (Bernard B. et al., 2016). The most promising therapies for disseminated cancer are based on molecular recognition of cancer-associated phenotype abnormalities (targeted therapy approaches). High affinity molecules to the targets on the surface of tumour cells are preconditions for such therapy, that allows the selective delivery of systemically administered cytotoxic/cytostatic moiety (drug molecules, toxins, beta- or alpha-emitting radioisotopes) to cancer cells with limited toxicity to healthy tissues. Overexpression of GRPR and PSMA can be used for targeted therapy of PCa. GRPRs are overexpressed in primary prostate cancer (up to 100%) and lymph node metastases (>85%), whereas normal prostate tissue are GRPR-negative (Beer M. et al., 2012). Development of GRPR antagonists (that do not trigger physiological response) allowed clinical implementation of GRPR-targeted imaging for diagnostic of PCa (Mitran B. et al., 2020). Expression of PSMA increases with PCa progression and is significantly up-regulated in higher grade, in androgen-insensitive, and spread metastatic lesions (Manyak M.J., 2008). Development of small PSMA-targeting glutamate-urea-lysine analogues (DUPA) was a big breakthrough in diagnostic of PCa (Schwarzenboeck S.M. et al., 2017) and DUPA derivatives demonstrated high sensitivity and excellent specificity in PCa detection. However, absence or insufficient PSMA expression and downregulation of PSMA expression was also reported (Sheikhbahaei S. et al., 2017). A direct clinical comparison of GRPR and PSMA imaging suggested that target expression has a not overlapping pattern (Minamimoto R. et al., 2016). Thus, no one single targeting vector molecule would provide a universal solution for imaging diagnostic and targeted therapy of PCa. In addition to a target expression, design of the conjugates for the targeted imaging and therapy should take in account other issues, e.g.: i) targeting vector molecule should have minimal off-target uptake in healthy tissue and excretory organs; ii) should rapidly extravasate and diffuse in extracellular space; iii) should bind to the target with high selectivity and affinity; and iv) should not have physiological activity. One of the approaches to solve the problem with non-homogeneous expression of PSMA and GRPR in PCa is to combine two targeting vector molecules in one PSMA/GRPR heterodimer.

Aim. Our group is focused on development of theranostic agents for PCa based on GRPR antagonist RM26, both GRPR-targeting monomer and PSMA/GRPR-targeting heterodimer. Our studies are dedicated to find optimal combination of factors, mentioned above, providing the highest possible imaging sensitivity and therapy efficacy.

Materials and methods. Materials and methods are described in detail in the literature sources of these abstracts (Mitran B. et al., 2020; Mitran B. et al., 2019; Baun C. et al., 2020; Rinne S.S. et al., 2021; Abouzaed A. et al., 2021; Abouzayed A. et al., 2020; Abouzayed A. et al., 2019; Mitran B. et al., 2019; Lundmark F. et al., 2020).

Results. Our group designed several derivatives of RM26 both for imaging and therapy of GRPR-expressing PCa and a serie of PSMA/GRPR-targeting heterodimers based on DUPA and derivatives of GRPR antagonist RM26 (Mitran B. et al., 2020).

We can summarize our experience in development of theranostics probes for PCa in the following way:

- Modifications of synthetically produced GRPR antagonist RM26 remain high affinity to molecular target and demonstrated favourable properties for imaging: rapid blood clearance, low retention in excretory organs, high tumor-to-non tumor ratios shortly after administration (Mitran B. et al., 2020);

- GRPR antagonist RM26 assembled with hydrophilic PEG linker could be coupled to different chelators suitable for labelling with radiometals, both for PET ($^{66/68}\text{Ga}$, $^{61/64}\text{Cu}$, ^{55}Co , $^{18}\text{F}[\text{AlF}]$), SPECT (^{111}In), and radiotherapy (^{177}Lu) (Mitran B. et al., 2020; Mitran B. et al., 2019; Baun C. et al., 2020; Rinne S.S. et al., 2021); in murine model all conjugates demonstrated high contrast imaging and herapeutic efficacy;
- The conjugate PEG-RM26 could be assembled with amino acid-based chelator, maSSS, suitable for labelling with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ for SPECT (Abouzaed A. et al., 2021);
- RM26 conjugated with albumin binding domain (ABD), 5 kDa scaffold protein with high affinity to albumin, demonstrated several fold longer half-life in blood circulation than parent RM26, which should be advantageous for therapeutic applications, e.g. delivery of cytotoxic/cytostatic drugs (Abouzaed A. et al., 2020);
- Series of DUPA-RM26 heterodimers developed in our group has demonstrated capacity specifically target PSMA and GRPR in vivo (Abouzayed A. et al., 2019; Mitran B. et al., 2019; Lundmark F. et al., 2020). Heterodimers labeled with ^{68}Ga and ^{111}In for imaging demonstrated rapid clearance from blood and high contrast images shortly after administration, while heterodimer labeled with radioiodine for therapy demonstrated long tumor retention. Such heterodimers should increase diagnostic imaging accuracy and may serve for therapy of PCa.
- Recent Phase I clinical study has demonstrated tolerability and safety of radionuclide imaging of GRPR expression with the use $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -maSSS-PEG2-RM26 in PCa and breast cancer patients. Phase I clinical studies for ^{68}Ga -NOTA-PEG2-RM26 and ^{68}Ga -DUPA-RM26 are in preparation.

Conclusion. Concluding, GRPR antagonist RM26 is a promising probe for tumour targeting both for imaging and therapy. Heterodimer targeting both GRPR and PSMA might solve the problem with non-homogeneous expression of PSMA and GRPR in PCa. This research was funded by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (075-15-2019-1925).

References

1. Abouzaed A., Rinne S.S., Sabahnoo H., Sørensen J., Chernov V., Tolmachev V., Orlova A. Preclinical evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled GRPR antagonists maSSS/SES-PEG2-RM26 for imaging of prostate cancer. *Pharmaceutics*. 2021;13:182.
2. Abouzayed A., Tano H., Nagy A., Rinne A.A., Wadea F., Kumar F., Westerlund K., Tolmachev V., Eriksson Karlström A., Orlova A. Preclinical Evaluation of the GRPR-Targeting Antagonist RM26 Conjugated to the Albumin-Binding Domain for GRPR-Targeting Therapy of Cancer. *Pharmaceutics*. 2020;12:977.
3. Abouzayed A., Yim C.B., Mitran B., Rinne S.S., Tolmachev V., Larhed M., Rosenström U., Orlova A. Synthesis and Preclinical Evaluation of Radioiodinated GRPR/PSMA Bispecific Heterodimers for the Theranostics Application in Prostate Cancer. *Pharmaceutics*. 2019;11:358.
4. Baun C., Mitran B., Rinne S.S., Hygum Dam J., Brinkmann Olsen B., Rosenström U., Tolnachev V., Orlova A., Thisgaard H. Preclinical evaluation of the copper-64 labeled GRPR-antagonist RM26 in comparison with the cobalt-55 labeled counterpart for PET-imaging of prostate cancer. *Molecules*. 2020;25:5993.
5. Beer M., Montani M., Gerhardt J., Wild P.J., Hany T.F., Hermanns T., Müntener M., Kristiansen G. Profiling gastrin-releasing peptide receptor in prostate tissues: clinical implications and molecular correlates. *Prostate*. 2012;72(3):318-25.
6. Bernard B., Gershman B., Karnes R.J., Sweeney C.J., Vapiwala N. Approach to Oligometastatic Prostate Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35:119-29.
7. Lundmark F., Abouzayed A., Mitran B., Rinne S.S., Varasteh Z., Larhed M., Tolmachev V., Rosenström U., Orlova A. Heterodimeric Radiotracer Targeting PSMA and GRPR for Imaging of Prostate Cancer- Optimization of the Affinity towards PSMA by Linker Modification in Murine Model. *Pharmaceutics*. 2020;12:614.
8. Mitran B., Tolmachev V., Orlova A. Radiolabeled Antagonistic Bombesin Analogues. Influence of Labelling Chemistry on Targeting Properties. *Curr Med Chem*, 2020;27(41):7090-7111.
9. Manyak M.J. Indium-111 capromab pendetide in the management of recurrent prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2008;8(2):175-81.
10. Mitran B., Varasteh Z., Abouzayed A., Rinne S.S., Puuvuori E., De Rosa M., Larhed M., Tolmachev V., Orlova A., Rosenström U. Bispecific GRPR-antagonistic anti-PSMA/GRPR heterodimer for PET and SPECT diagnostic imaging of prostate cancer. *Cancers*. 2019;11:1371.
11. Minamimoto R., Hancock S., Schneider B., Chin F.T., Jamali M., Loening A., Vasanawala S., Gambhir S.S., Jagaru A. J Pilot Comparison of ^{68}Ga -RM2 PET and ^{68}Ga -PSMA-11 PET in Patients with Biochemically Recurrent Prostate Cancer. *J Nucl Med*. 2016;57(4):557-62.
12. Mitran B., Rinne S.S., Konijnenberg M., Maina T., Nock B.A., Altai M., Vorobyeva A., Larhed M., Tolmachev V., de Jong M., Rosenström U., Orlova A. Trastuzumab co-treatment improves survival of mice with PC-3 prostate cancer xenografts treated with GRPR antagonist [^{177}Lu]Lu-DOTAGA-PEG2-RM26. *Int J Cancer*. 2019;145(12):3347-3358.

13. Mooney D., Paluri R., Mehta A., Goyal J., Sonpavde G. Update in systemic therapy of urologic malignancies. *Postgrad Med.* 2014;126(1):44-54.
14. Rinne S.S., Abouzayed A., Gagnon K., Tolnachev V., Orlova A. ⁶⁶Ga-PET-Imaging of GRPR-expression in prostate cancer: Production and characterization of [⁶⁶Ga]Ga-NOTA-PEG2-RM26. *Sci Rep.* 2021;11(1):3631.
15. Schwarzenboeck S.M., Rauscher I., Bluemel C., Fendler W.P., Rowe S.P., Pomper M.G., Afshar-Oromieh A., Herrmann K., Eiber M. PSMA Ligands for PET Imaging of Prostate Cancer. *J Nucl Med.* 2017;58(10):1545-1552.
16. Sheikhabaei S., Afshar-Oromieh A., Eiber M., Solnes L.B., Javadi M.S., Ross A.E., Pienta K.J., Allaf M.E., Haberkorn U., Pomper M.G., Gorin M.A., Rowe S.P. Pearls and pitfalls in clinical interpretation of prostate-specific membrane antigen (PSMA)-targeted PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2017;44(12):2117-2136.

PHASE I EVALUATION OF ^{99m}Tc-RM2 FOR IMAGING OF GRPR EXPRESSION: I INTERMEDIATE RESULTS

A.N. Rybina¹, V.I. Chernov^{1,2}, N.A. Lushnikova¹, A.V. Doroshenko¹, E.A. Usynin¹,
R.V. Zelchan¹, A. Abouzayed³, V.M. Tolmachev^{2,4}, A.M. Orlova^{2,3}

¹*Department of Nuclear Medicine, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*

²*Research Centrum for Oncotheranostics, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia*

³*Department of Medicinal Chemistry, Uppsala University, Uppsala, Sweden*

⁴*Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Uppsala, Sweden*
e-mail: Vladimir.tolmachev@igp.uu.se

Keywords: gastrin-releasing peptide receptor, [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26, prostate cancer, breast cancer, SPECT, dosimetry.

Introduction. Gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) is overexpressed in prostate, breast, and colon cancers (Moreno P. et al., 2016), several radiolabelled GRPR-targeting agents based on a natural peptide ligand, bombesin, have been evaluated for imaging and therapy in the past. However, the use of agonistic ligand resulted in a potent undesirable physiological action (Schally A.V. et al., 2001). Therefore, we focussed our development on imaging probes on GRPR antagonist RM26 discovered by Llinares and co-workers (Llinares M. et al., 1999). Particularly, we have developed a PET tracer [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-PEG₃-RM26 (Varasteh Z. et al., 2014), which demonstrated excellent safety, tolerability and efficacy in early-phase clinical studies concerning PET imaging of prostate and breast cancer (Zang J. et al., 2018; Zhang J. et al., 2018). To enable broader application of RM26, we have developed a tracer [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26, which is potentially suitable for SPECT imaging (7). To minimize interfering activity in urinary bladder during imaging of prostate cancer, we designed a tracer with a high degree of hepatobiliary excretion. In murine model of prostate cancer, [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26 demonstrated tumour-to blood ratio of 97 ± 56 and tumour-to-muscle ratio of 188 ± 32 and tumour-to-bone ratio of 177 ± 79 at 3 h after injection (Abouzayed A. et al., 2021).

Aim. The aim of this Phase I clinical study was to evaluate safety, tolerability, biodistribution and dosimetry of [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26.

Materials and Methods. The study has been approved by the Board of Medical Ethics and Scientific Council of Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences and all subjects signed a written informed consent. Four male patients with primary prostate and seven female patients with primary breast cancer were enrolled in the study at the time of preparation of this publication. [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26 was prepared using a single vial kit according to protocol described by Abouzayed and co-workers (7). [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 was injected with a peptide mass of 40 µg. The injected activity was 710±110 MBq. Patients were observed up to 7 days after injection to detect possible side effects. At 2, 4, 6, and 24 h after injection, a whole body planar scintigraphy and SPECT imaging were performed. Dosimetry was calculated as described by Bragina and co-workers (Bragina O. et al., 2021).

Results. All injections of [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26 were well tolerated. No adverse events were registered during the study. Up to 40% of injected activity was excreted via bile. Accordingly, the highest activity was initially found in gall bladder and small intestines. Starting from 4 h after injection, high radioactivity levels were observed in upper large intestine. There was a noticeable interpatient variation in the extent of hepatobiliary excretion. Prominent activity (over 3% of injected activity per organ) was observed also in liver and kidneys. An average effective dose was 0.0044 ± 0.0006 mSv/MBq for male and 0.0084 ± 0.0029 mSv/MBq for female patients. With the given activity, the radionuclide-associated dose burden per patient is 3-6 mSv per study. All known tumours were visualized already 2 h after injection. Representative images are provided in figures 1 and 2.

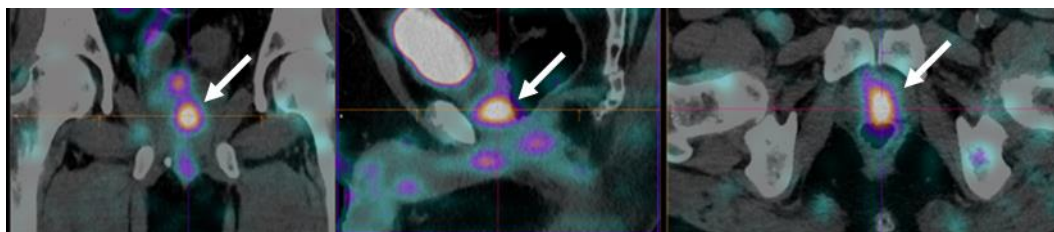


Fig. 1. SPECT/CT visualization (coronal, sagittal and transversal plane images) of primary prostate cancer (arrows) using [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26 4 h after injection

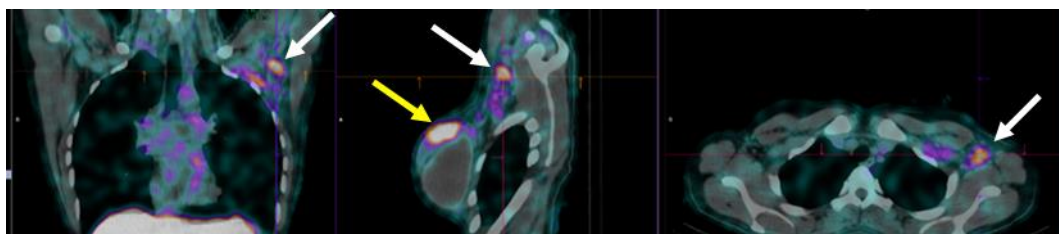


Fig. 2. SPECT/CT visualization (coronal, sagittal and transversal plane images) of primary breast cancer (yellow arrow) and its axillary lymph node metastases (white arrow) using [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26 4 h after injection

Conclusion. The intermediate results of the Phase I study show that injections of [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26 are well-tolerated, safe and associated with low absorbed doses. Imaging using [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26 enables visualization of prostate and breast cancer. Certain degree of hepatobiliary excretion of [^{99m}Tc]Tc-maSSS-PEG₂-RM26 might be an advantage in visualization of primary prostate cancer and its local metastases, because of reduced activity in urinary bladder. However, hepatobiliary excretion is undesirable in the case of breast cancer, when hepatic metastases might be expected. Development of a tracer with more hydrophilic chelator is desirable for such purpose.

References

1. Moreno P., Ramos-Álvarez I., Moody T.W., Jensen R.T. Bombesin related peptides/receptors and their promising therapeutic roles in cancer imaging, targeting and treatment. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2016;20(9):1055–1073. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1164694>.
2. Schally A.V., Comaru-Schally A.M., Nagy A., Kovacs M., Szepeshazi K., Plonowski A., Varga J.L., Halmos G. Hypothalamic hormones and cancer. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2001;22(4):248–291. <https://doi.org/10.1006/frne.2001.0217>.
3. Llinares M., Devin C., Chaloin O., Azay J., Noel-Artis A.M., Bernad N., Fehrentz J.A., Martinez J. Syntheses and biological activities of potent bombesin receptor antagonists. *The journal of peptide research: official journal of the American Peptide Society*. 1999;53(3):275–283. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.1999.00028.x>.
4. Varasteh Z., Rosenström U., Velikyan I., Mitran B., Altai M., Honarvar H., Rosestedt M., Lindeberg G., Sörensen J., Larhed M., Tolmachev V., Orlova A. The effect of mini-PEG-based spacer length on binding and pharmacokinetic properties of a 68Ga-labeled NOTA-conjugated antagonistic analog of bombesin. *Molecules*. 2014;19(7):10455–10472. <https://doi.org/10.3390/molecules190710455>.
5. Zhang J., Niu G., Fan X., Lang L., Hou G., Chen L., Wu H., Zhu Z., Li F., Chen X. PET Using a GRPR Antagonist 68Ga-RM26 in Healthy Volunteers and Prostate Cancer Patients. *Journal of nuclear medicine*. 2018;59(6):922–928. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.198929>.
6. Zang J., Mao F., Wang H., Zhang J., Liu Q., Peng L., Li F., Lang L., Chen X., Zhu Z. 68Ga-NOTA-RM26 PET/CT in the Evaluation of Breast Cancer: A Pilot Prospective Study. *Clinical nuclear medicine*. 2018;43(9):663–669. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002209>.
7. Abouzayed A., Rinne S.S., Sabahnou H., Sörensen J., Chernov V., Tolmachev V., Orlova A. Preclinical Evaluation of 99mTc-Labeled GRPR Antagonists maSSS/SES-PEG2-RM26 for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceutics*. 2021;13(2):182. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020182>.
8. Bragina O., von Witting E., Garousi J., Zelchan R., Sandström M., Orlova A., Medvedeva A., Doroshenko A., Vorobyeva A., Lindbo S., Borin J., Tarabanovskaya N., Sörensen J., Hober S., Chernov V., Tolmachev V. Phase I Study of 99mTc-ADAPT6, a Scaffold Protein-Based Probe for Visualization of HER2 Expression in Breast Cancer. *Journal of nuclear medicine*. 2021;62(4): 493–499. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.248799>.

МЕЧЕННЫЙ ТЕХНЕЦИЕМ-99М МОНОСАХАРИД: РАЗРАБОТКА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО НАБОРА И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Е.С. Стасюк*, В.С. Скуридин, Е.А. Нестеров, А.С. Рогов, В.Л. Садкин, Е.А. Шелихова
Томский политехнический университет, г. Томск, Россия
e-mail: stasyuk@tpu.ru

Ключевые слова: производная глюкозы, лиофилизаты, технеций-99м.

Введение. Выявление злокачественных новообразований на ранних стадиях развития является одной из актуальнейших проблем современной медицины (Bertagna F. et al., 2013). Сцинтиграфия с радиоактивно мечеными производными глюкозы - один из многообещающих подходов к ранней и высокоточной диагностике онкологических заболеваний, потому что раковые клетки по сравнению с нормальными клетками обладают повышенным уровнем метаболизма глюкозы (Hsu P.P., Sabatini D.M., 2008; Alessandro An., Christian W., 2010).

Цель. Разработка оригинального подхода для введения радиоактивной метки изотопа технеция-99м в производную глюкозы, имеющую в своем составе тио-группу. Полученный радиофармпрепарат позволит проводить раннюю диагностику рака, в том числе рака головного мозга и рака молочной железы (Vernadsky R.Iu. et al., 2019).

Материалы и методы. Субстанция 1-тио-D-глюкоза и другие реагенты были приобретены у Sigma-Aldrich ACS grade. Получение меченого радиофармпрепарата проводилось в 2 этапа. На первом этапе был разработан состав препарата на основе субстанции 1-тио-глюкозы, восстановителя олова дихлорида дигидрата и стабилизатора аскорбиновой кислоты. Полученную смесь лиофилизировали без предварительного замораживания в сублимационной сушилке. Последующее радиомечение проводили путем добавления 4 мл раствора пертехнетата натрия [^{99m}Tc] с активностью 1,0 ГБк и инкубацией при комнатной температуре в течение 30 мин. Контроль радиохимической чистоты (РХЧ) и образование комплекса проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле с использованием двух разных мобильных фаз. Ацетон использовали для определения количества невосстановленных пертехнетат ионов $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 0,9-1,0$) - примеси А и смесь $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 2: 5: 5$ для определения количества коллоида $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0,0$) - примеси В. Полоски анализировали гамма-счетчиком. Радиохимическую чистоту рассчитывали по формуле: $\text{РХЧ} = 100 - (\text{А} + \text{В})\%$ (Stasyuk E. et al., 2020). Стабильность *in vitro* радиоактивно меченых производных глюкозы в водном растворе определяли путем добавления 1000-кратного молярного избытка цистеина с последующим контролем радиохимической чистоты с помощью ТСХ. Создания модели опухоли проводили на мышах с использованием клеточной линии C57B1/6j (карциномы легкого Льюиса). Радиофармпрепарат вводили мышам внутривенно в дозе 0,1 мл с объемной активностью 200 МБк / мл. Сцинтиграфию всего тела животных проводили на гамма-камере E.CAM Signature 1800 (Siemens, Германия) через 15, 40 и 120 мин времени после инъекции.

Результаты. Субстанция 1-тио-D-глюкоза была успешно помечена Тс-99м с использованием восстанавливающего агента и стабилизатора. Радиохимический выход ^{99m}Tc -1-тио-D-глюкозы составил 91%, а радиохимическая чистота была более 98%. Анализ стабильности, включая анализ в присутствии избытка цистеина, не выявил неблагоприятного воздействия на радиохимическую чистоту. Через 40 минут после введения препарата сканирование животных с помощью *однофотонной эмиссионной компьютерной томографии* (ОФЭКТ) показало четкую визуализацию имплантированной опухоли правого бедра.

Заключение. Субстанция 1-тио-D-глюкоза была успешно помечена технецием-99м с высокой радиохимической чистотой (<98%) и стабильностью. Сцинтиграфия с полученным препаратом обеспечила высокоточное обнаружение имплантированной опухоли - карциномы Льюиса у мышей.

Литература

1. Bertagna F., Treglia G., Baiocchi G.L., Giubbini R. F18-FDG-PET/ CT for evaluation of intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN): a review of the literature. *Jpn. J. Radiol.* 2013;31(4):229–236. DOI: 10.1007/s11604-012-0176-2.
2. Hsu P.P., Sabatini D.M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell.* 2008;134:703-707.
3. Alessandro An., Christian W. Glucose metabolism in cancer cells. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2010;13:466–470.
4. Stasyuk E., Skuridin V., Rogov A, Zelchan R., Sadkin V., Varlamova N., Nesterov E. ^{99m}Tc -labeled monosaccharide kits: development methods and quality control. *Scientific Reports.* 2020;10:14013. DOI:10.1038/s41598-020-61707-7.
5. Vernadsky R.Iu., Medvedeva A.A., Garbukov E.Iu., Sinilkin I.G., Bragina O.D., Zelchan R.V., Slonimskaia E.M., Chernov V.I. Single-photon emission computed tomography with ^{99m}Tc -1-thio-D-glucose for metabolic breast cancer imaging. *REJR.* 2019;9(4):82-96. DOI:10.21569/2222-7415-2019-9-4-82-96.

TUMOR TARGETING USING SCAFFOLD PROTEINS (REVIEW)

V.M. Tolmachev^{1,2*}, A.M. Orlova^{1,3}, A.G. Vorobyeva^{1,2},

O.D. Bragina^{1,4}, V.I. Chernov^{1,4}, A. Schulga^{1,5}, S.M. Deyev^{1,5}

¹*Research Centrum for Oncotheranostics, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia*

²*Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Uppsala, Sweden*

³*Department of Medicinal Chemistry, Uppsala University, Uppsala, Sweden;*

⁴*Department of Nuclear Medicine, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia;*

⁵*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;*

e-mail: Vladimir.tolmachev@igp.uu.se

Keywords: tumor targeting, radionuclide, affibody molecules, ADAPT, DARPIn.

Efficient treatment of disseminated cancer requires specific targeting, i.e. molecular recognition of cancer-related molecular abnormalities (denoted molecular targets) that appear on cancer cells, tumor vasculature and/or stroma. Monoclonal antibodies constitute the major class of current cancer-targeting therapeutics. They act by blocking interactions between aberrantly expressed cell-surface receptors and their ligands, or by preventing cancer evasion from immune system. Another class of targeted therapeutics are tyrosine kinase inhibitors preventing downstream signalling of receptor tyrosine kinases overexpressed in cancers. Recognition of molecular targets can be also used for delivery of toxins, drugs or cytotoxic radionuclides. However, tumours of the same origin might or might not express a particular molecular target. Accordingly, only a fraction of tumours would be affected by a particular targeting therapy. Patients with tumours not expressing a specific target would be overtreated. A precondition for successful targeted treatment is an accurate identification of patients with tumours that express a particular target and therefore would respond to a specific treatment. Currently, the molecular profiling of tumours is based mainly on analysis of biopsies samples. However, a biopsy is an invasive procedure, and a limited number of samples can be taken from a limited number of places. A target expression might be altered due to clonal selection during therapy; however the use of repeated biopsies is infrequent. The predictive potential of biopsy-based methods is limited because of the risk of non-representative sampling due to intra- and intertumoral expression heterogeneity. Introduction of radionuclide imaging of molecular targets can improve their in vivo detection in tumours, overcoming expression heterogeneity problem associated with biopsy- and blood-samples-based methods. The issue of patient stratification for targeted therapy may be solved in this way. In addition, visualization of changes of target expression during therapy can be used for response monitoring. Thus, radionuclide molecular imaging has a potential to make cancer treatment more personalized and therefore more efficient (Tolmachev V. et al., 2010). A precondition for successful clinical application is a sufficient sensitivity and specificity of radionuclide imaging. Sensitivity depends on ratio of radioactivity concentration in tumours and in surrounding tissues. Currently, radionuclide imaging utilizes mainly radiolabelled monoclonal antibodies (Mabs) and their products (Garousi J. et al., 2020). Development in this area has enabled the production of radiolabelled probes with good specificity and high binding affinity. Still, this approach has its disadvantages. Mabs are relatively bulky proteins, and this bulkiness limits blood clearance, extravasation, and tumour penetration rates (Garousi J. et al., 2020). This reduces imaging contrast, and the diagnostic procedure may not be performed until several days after injection. In addition, an unspecific tumour accumulation of tracers with molecular weight of >45 kDa reduces specificity of antibody-based molecular imaging (Garousi J. et al., 2020). Targeted delivery of cytotoxic radionuclides (beta- or alpha-emitters) might be applied for extermination of malignant cells. In comparison to the use of toxins or drugs, radionuclide therapy offers following advantages: 1) “cross-fire effect”, when nuclides delivered to one cancer cell irradiate neighbour malignant cells. This makes unnecessary to target every cell in a tumour and may help to overcome intratumoral heterogeneity of a target expression; 2) a multidrug resistance does not exist for radionuclides. Antibody-mediated radionuclide therapy demonstrated high efficacy in radiosensitive hematologic tumours but failed in solid cancers. The main reason for failure was slow clearance of Mabs resulted in high doses to healthy tissues including radiosensitive bone marrow (Толмачев В.М. и др., 2012). Problems with the use of radiolabelled Mabs are associated with their bulkiness (Tolmachev V. et al., 2010). The use of smaller targeting agents should solve these problems. A promising alternative is creating new small targeting agents by the use of molecular display technology. High-affinity ligands may be selected by using a scaffold, a robust, structurally rigid framework for variable amino acids. One variant of engineers scaffold proteins, termed affibody molecules (Tolmachev V., Orlova A., 2020), uses the domain scaffold of the immunoglobulin-binding Staphylococcal protein A. The small size (58 amino acids) of affibody molecules enables good tumour penetration and fast blood clearance of unbound tracer from blood and nonspecific compartments (Tolmachev V., Orlova A., 2020). Affibody molecules with high affinity and specificity to such cancer-associated targets as HER2, EGFR, HER3, CAIX, IGF-1R, VEGFR2, PDGFR α and PD-L1 have been created. After radiolabelling, these affibody molecules have demonstrated high-contrast imaging of their molecular targets in murine models of cancer a few hours after injection. Clinical studies have demonstrated that ⁶⁸Ga- and ¹¹¹In-labelled affibody molecules can clearly visualise HER2-expressing breast cancer metastases 2-4 h after injection (Sörensen J. et al., 2016).

Recently, a new type of scaffold proteins, ADAPTs, has been invented by the group of Prof. Hober (Nilvebrant J. et al., 2014). ADAPTs are based on 46-amino acid albumin-binding domain, derived from streptococcal protein G.

ADAPTs are 25% smaller than affibodies, which might improve further extravasation and tissue diffusion rates, and thereby better targeting. ADAPTs with low nanomolar or subnanomolar affinity to specific molecular targets (HER2 and HER3) have been developed. Phase I clinical study has demonstrated that ^{99m}Tc-labelled ADAPT6 enables discrimination between HER2-positive breast tumours as soon as 2 h after injection (Bragina O. et al., 2021). Another variant of scaffold proteins, DARPins are somewhat bigger (130-160 amino acids) (Jost C., Plückthun A., 2014). Still, preclinical studies demonstrated that HER2 (Vorobyeva A. et al., 2019) and EpCAM-binding (Deyev S.M. et al., 2020) DARPins are capable of efficient and specific accumulation in tumours and rapid clearance from healthy tissues. Phase I clinical trial has demonstrated that imaging using ^{99m}Tc-labelled DARPIn G3 might be used for stratification of patients for HER2-targeting treatment (Tolmachev V. et al., 2021). Importantly, scaffold can be produced by chemical synthesis or by inexpensive bacterial production, which appreciably reduces the production cost comparing to Mabs.

Conclusion. In conclusion, scaffold proteins are very promising type of targeting probes for radionuclide targeting, which demonstrated their safety, tolerability, benign dosimetry and high functional capacity in clinical studies.

References

1. Tolmachev V., Stone-Elander S., Orlova A. Radiolabelled receptor-tyrosine-kinase targeting drugs for patient stratification and monitoring of therapy response: prospects and pitfalls. *The Lancet Oncology*. 2010;11(10):992–1000. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70088-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70088-7)
2. Garousi J., Orlova A., Frejd F.Y., Tolmachev V. Imaging using radiolabelled targeted proteins: radioimmunodetection and beyond. *EJNMMI radiopharmacy and chemistry*. 2020;5(1):16. <https://doi.org/10.1186/s41181-020-00094-w>
3. Толмачев В.М., Чернов В.И., Деев С.М. Таргетная ядерная медицина. Найти и уничтожить. *Успехи Химии*. 2012;1. DOI: <https://doi.org/10.1070/RCR5034>
4. Tolmachev V., Orlova A. Affibody Molecules as Targeting Vectors for PET Imaging. *Cancers*. 2020;12(3):651. <https://doi.org/10.3390/cancers12030651>
5. Sörensen J., Velikyán I., Sandberg D., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V., Orlova A., Sandström M., Lubberink M., Olofsson H., Carlsson J., Lindman H. Measuring HER2-Receptor Expression In Metastatic Breast Cancer Using [68Ga]ABY-025 Affibody PET/CT. *Theranostics*. 2016;6(2):262–271. <https://doi.org/10.7150/thno.13502>
6. Nilvebrant J., Åstrand M., Georgieva-Kotseva M., Björnmalm M., Löfblom J., Hober S. Engineering of bispecific affinity proteins with high affinity for ERBB2 and adaptable binding to albumin. *PLoS one*. 2014;9(8):e103094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103094>
7. Bragina O., von Witting E., Garousi J., Zelchan R., Sandström M., Orlova A., Medvedeva A., Doroshenko A., Vorobyeva A., Lindbo S., Borin J., Tarabanovskaya N., Sörensen J., Hober S., Chernov V., Tolmachev V. Phase I Study of ^{99m}Tc-ADAPT6, a Scaffold Protein-Based Probe for Visualization of HER2 Expression in Breast Cancer. *Journal of nuclear medicine*. 2021;62(4):493–499. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.248799>
8. Jost C., Plückthun A. Engineered proteins with desired specificity: DARPins, other alternative scaffolds and bispecific IgGs. *Current opinion in structural biology*. 2014;27:102–112. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.05.011>
9. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M., Garousi J., Chernov, V., Bragina O., Orlova A., Tolmachev V., Deyev S. M. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of ^{99m}Tc-labeled DARPIn G3. *Scientific reports*. 2019;9(1):9405. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45795-8>
10. Deyev S.M., Vorobyeva A., Schulga A., Abouzayed A., Günther T., Garousi J., Konovalova E., Ding, H., Gräslund T., Orlova A., Tolmachev V. Effect of a radiolabel biochemical nature on tumor-targeting properties of EpCAM-binding engineered scaffold protein DARPIn Ec1. *International journal of biological macromolecules*. 2020;145:216–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.147>
11. Tolmachev V., Bragina O., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A., Orlova A., Deyev S., Chernov V. First-in-human evaluation of [^{99m}Tc]Tc-(HE)3-G3, a novel DARPIn-based agent for imaging of HER2 expression in breast cancer. *Nuclear Medicine and Biology*. 2021;96–97/S1:S17–S18.

ВОЗМОЖНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОСТЕОМИЕЛИТА

В.Д. Удодов^{1*}, В.Д. Завадовская¹, А.Г. Першина^{1,2}, М.А. Зоркальцев¹, М.С. Ларькина¹,
Е.С. Стасюк², В.В. Иванов¹, А.С. Рогов², А.Я. Лущик³, А.В. Янцевич³

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

²Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия

³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

e-mail: Udodov.vd@ssmu.ru

Ключевые слова: убиквицин, сцинтиграфия, остеомиелит.

Введение. Дифференциальная диагностика остеомиелита и асептического воспалительного процесса костных структур является одной из самых актуальных клинических проблем. При этом, имеющиеся в практике высокочувствительные лучевые методы диагностики, такие, как сцинтиграфия с мечеными лейкоцитами или мультиспирометрическая МРТ, имеют недостаточную специфичность в выявлении остеомиелита (Sasser T.A. et al., 2013). Сцинтиграфия с мечеными антимикробными пептидами (АМП) является одним из многообещающих подходов к ранней и высокоточной диагностике костных инфекций. Благодаря избирательной способности АМП связываться с поверхностью мембран бактерий, их накопление происходит только в зоне гнойного воспаления (Erand R.M., Vogel H.J., 1999). Среди существующих АМП выделяются пептиды группы убиквицидина (UBI), которые проявляют высокую специфичность к бактериальной и грибковой инфекции (Akhtar M.S. et al., 2012; Shinto A.S. et al., 2017).

Цель. Разработка радиофармпрепарата на основе убиквицидина для визуализации септических процессов костных структур.

Материалы и методы. Пептид UBI29-41 получали методом твердофазного синтеза с использованием Fmoc-защищенных аминокислот. В качестве хелатирующего агента использовали сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноат (DPAH-NHS) (Podrezova E.V. et al., 2018). Элюат технеция-99м получали из генератора технеция ^{99m}Tc-ГТ-ТОМ" в форме пертехнетата натрия Na^{99m}TcO₄ (VII). Введение радиоактивной метки в виде трикарбонильного комплекса технеция-99м [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ проводили с использованием набора CRS Isolink (Paul Scherrer Institute, Villigen). Очистку радиохимических комплексов проводили с использованием колонок C18 Sep-Pak (Waters). Для создания модели остеомиелита самцам крыс Wistar три раза внутривенно вводили *Staphylococcus aureus* для сенсibilизации, а затем непосредственно в дистальный метафиз левой бедренной кости вводили *S. aureus* в 30% желатине (n = 6). Для моделирования асептического воспаления костей крысам однократно вводили ЛПС в желатине непосредственно в дистальный метафиз левой бедренной кости (n = 6). Для обнаружения воспаления *in vivo* экспериментальные крысы разбиты на две группы (с асептическим и септическим воспалением, n = 3 в каждой группе). Меченные ^{99m}Tc пептиды вводили крысам в хвостовую вену в дозе 18,5 МБк, с последующим сканированием в течение 1 часа каждые 5 минут на двухдетекторной гамма-камере «Philips BrightView». В качестве метода сравнения выполняли трехфазную сцинтиграфию с остеотропным препаратом ^{99m}Tc-пирфотех («Диамед») по стандартной методике. Сцинтиграфию проводили через 7 суток (острое воспаление) или 21 сутки (хроническое воспаление) после операции. Остеомиелит подтверждался результатом гистологического исследования участков воспаления.

Результаты. Наиболее успешно модификация пептида DPAH-NHS проходила в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 8,0-8,5) при соотношении 1:1,2 (пептид:хелатор) при проведении реакции в течение 24 часов при 4-8 °С. Радиохимический выход ^{99m}Tc-DPAH-UBI29-41 составлял 80±0,5%, а радиохимическая чистота после очистки через картридж C18 Sep-Pak составила 96,0±0,5%. Анализ стабильности, включая анализ в присутствии избытка гистидина, не выявил неблагоприятного воздействия на радиохимическую чистоту радиофармпрепарата (РФП). Анализ сцинтиграмм, полученных после внутривенного введения крысам ^{99m}Tc-DPAH-UBI29-41, показал выраженную гиперфиксацию радиоиндикатора в зоне острого гнойного воспалительного процесса и фиксацию индикатора средней интенсивности в участках хронического гнойного воспалительного процесса костных структур. Максимальная интенсивность фиксации индикатора при остром гнойном воспалительном процессе достигалась на 35 минуте исследования и составляет 2,72 [1,96-2,87] (разность счета по сравнению с симметричным участком), в случае хронического гнойного воспалительного процесса – 1,71 [1,56-2,07]. Фиксация антимикробных пептидов у группы крыс с асептическим воспалительным процессом была близка к фону. Важно отметить, что после внутривенного введения ^{99m}Tc-перфотех у крыс всех четырех экспериментальных групп выявляли усиление кровотока на (левой) стороне поражения в артериальную фазу исследования и гиперфиксацию индикатора в мягких тканях и костных структурах, что является классическим критерием наличия внутрикостного воспалительного процесса. Наблюдаемое накопление препарата в почках, мочевом пузыре, печени и кишечнике свидетельствовало о выведении радиоиндикаторов моче- и желчевыделительной системами.

Заключение. Разработан оригинальный радиохимический комплекс на основе антимикробного пептида – производного убиквицидина (UBI29-41) с радиохимическим выходом более 80% и радиохимической чистотой более 96%. Накопление полученного комплекса в очаге бактериального воспаления костных структур и отсутствие его фиксации при асептическом течении процесса подтверждено на экспериментальной модели травматического остеомиелита у крыс методом радионуклидной диагностики.

Литература

1. Sasser T.A., Van Avermaete A., White A., Chapman S., Johnson J. R., Van Avermaete T., Matthew Leevy W. Bacterial infection probes and imaging strategies in clinical nuclear medicine and preclinical molecular imaging. *Curr Top Med Chem.* 2013;13(4):479–487.
2. Erand R.M., Vogel H.J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1462:11–28.
3. Akhtar M.S., Imran M.B., Nadeem M.A., Shahid A. Antimicrobial peptides as infection imaging agents: better than radiolabeled antibiotics. *Int J Pept.* 2012;2012:965238. doi:10.1155/2012/965238

4. Shinto A.S., Mukherjee A., Karuppusamy K.K., Joseph J., Bhatt J., Korde A., Dash A. Clinical utility of ^{99m}Tc -ubiquicidin (29-41) as an adjunct to bone scan in differentiating infected versus noninfected loosening of prosthesis before revision surgery. *Nucl Med Commun.* 2017;38:285–290.
5. Podrezova E.V., Larkina M.S., Belousov M.V., Kirschning A., Zhdankin V.V., Yusubov M.S. Expedient synthesis of long-chain ω -substituted fatty acids and esters from cyclic ketones using iodine and hydrogen peroxide. *Synthesis.* 2018;50:4081–4088.

ТРАНС-1,2-ДИАМИНОЦИКЛОГЕКСАН-N,N,N',N'-ТЕТРАУКСУСНАЯ КИСЛОТА (ДЦТА) КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ХЕЛАТОР ДЛЯ МРТ- И ОФЭКТ -ВИЗУАЛИЗАЦИИ, В ВИДЕ КОМПЛЕКСОВ С МН (ЦИКЛОМАНГ) И ^{99m}Tc (ЦИКЛОТЕХ)

В.Ю. Усов^{1,2*}, М.Л. Беянин², О.Ю. Бородин¹, В.Д. Филимонов², А.И. Безлепкин¹, М.А. Зоркальцев¹, В.В. Удут¹, А.А. Чуринов¹, Ю.Б. Лишманов², Н.Л. Шимановский³

¹Томский НИМЦ, г. Томск, Россия

² НИ Томский политехнический университет, г. Томск, Россия

³ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, Россия

e-mail: ussov1962@yandex.ru

Ключевые слова: транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (ДЦТА), Мп-ДЦТА, Цикломанг, ^{99m}Tc -ДЦТА, Циклотех, МРТ, парамагнитное контрастное усиление, ОФЭКТ, ОФЭКТ-МРТ.

Введение. Совершенствование и расширение методов контрастного усиления с помощью парамагнитных контрастных средств (ПМКС) является сегодня важнейшим направлением прогресса в клинической магнитно-резонансной томографической диагностике (Панов В.О., Шимановский Н.Л., 2017), а в гамма-сцинтиграфии и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) использование радиофармпрепаратов (рфп), на основе комплексов ^{99m}Tc , вообще является основой метода (Лишманов Ю.Б., Чернов В.И., 2010). Представляет значительный интерес создание для клинической практики хелатора для радиоактивного и парамагнитного вещества с одинаковой фармакокинетикой при использовании различных методов визуализации, в частности для МРТ и ОФЭКТ (или гамма-сцинтиграфии). Для этого целесообразно использовать транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту (ДЦТА), обладающую высоким сродством и высокими показателями термодинамической и кинетической устойчивости как с ^{99m}Tc , так и с Мп (Ussov W.Yu. et al., 2016).

Цель. Мы попытались оценить возможность использования транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ДЦТА) в качестве универсального хелатора, пригодного для комплексообразования как парамагнетика — Мп — для МРТ, так и гамма-излучателя ^{99m}Tc — для ОФЭКТ, и позволяющего осуществить прямое сопоставление диагностических изображений, получаемых с их помощью. Проведены доклинические исследования транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ДЦТА) как универсального контраста для МРТ и ОФЭКТ, с хелатированием Мп(Цикломанг) и ^{99m}Tc (Циклотех), соответственно.

Материал и методы. Комплекс транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ДЦТА) синтезирован по оригинальной технологии в нанопорошковой фазе с использованием карбоната марганца (II), или элюата ^{99m}Tc в растворе, и $\text{NaN}_2\text{ДЦТА}$, с получением в итоге 0,5 М раствора Мп-ДЦТА или ^{99m}Tc -ДЦТА. У 7 кошек и собак с опухолями органов грудной клетки проведены МРТ с Мп-ДЦТА и ОФЭКТ с ^{99m}Tc -ДЦТА. При проведении МРТ органов грудной клетки с парамагнитным контрастным усилением Мп-ДЦТА, доза вводимого препарата составила 2 мл/10 кг массы тела. В матрицу 256 x 256 до и спустя 10-15 мин после внутривенного введения Мп-ДЦТА записывали изображения в Т1- взвешенных спин-эхо протоколах (TR=450-500 мс, TE = 10-12 мс), в аксиальных, сагиттальных и фронтальных плоскостях. При этом область сканирования полностью охватывала грудную клетку и составляла в размерах в аксиальной плоскости как правило 250x250 мм. При ОФЭКТ с введением 37 — 54 МБк ^{99m}Tc — ДЦТА, при удельной активности 70 -184 МБк/мл, т. е. в объеме 0,4 -0,9 мл, спустя 10 мин после введения рфп записывалось 32 — 64 планарных проекции на полный оборот детекторов томографической гамма-камеры, в матрицу 64x64 элемента, при размере поля зрения 250 мм, при времени записи 12 — 15 сек на проекцию. Реконструировались поперечные томосрезы тела исследуемого животного, также в матрицу 64x64, толщиной по 5 -8 мм. При всех сцинтиграфических исследованиях использовался коллиматор высокого разрешения для низких энергий, с настройкой на пик излучения 140 КэВ для ^{99m}Tc .

Результаты. Структура цикломанга и циклотеха, по данным квантовохимического анализа оказалась практически идентичной и представлена на рисунке 1.

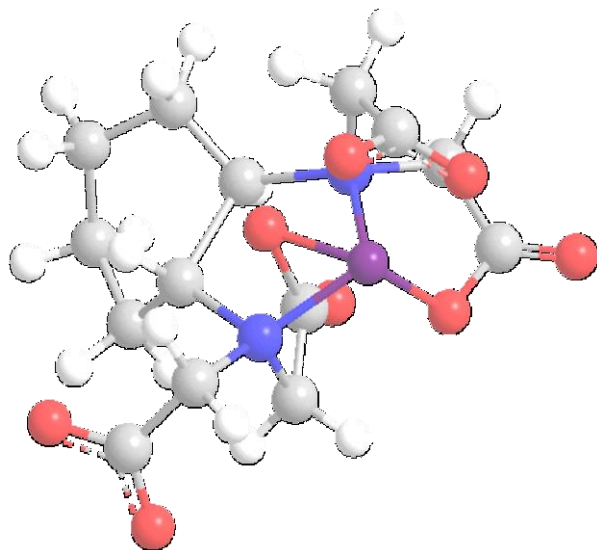


Рис. 1. Пространственная структура транс - 1, 2 - диаминоциклогексан-N,N,N',N' - тетрауксусной кислоты (ДЦТА) при формировании комплексов с Mn (Цикломанг) или ^{99m}Tc (Циклотех), по данным квантово-химического моделирования.

Хелатируемые Mn или ^{99m}Tc представлены фиолетовым, углерод — серым, кислород — красным, водород — белым, азот — синим

В обоих случаях в диапазоне физиологических pH константа термодинамической устойчивости превосходила 19,3, благодаря наличию тетраденатной устойчивой конфигурации молекулы комплекса. Для препарата Циклотех LD₅₀ > 18 /мл/кг, для 0,5M раствора Mn-ДЦТА показатель LD₅₀ достоверно превышает 16,9 мл/кг массы. Изменений содержания марганца в плазме крови крыс при введении им Mn-ДЦТА, не происходило. Величины LD₅₀ позволяют отнести препарат в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76. к группе 4 (малоопасные вещества). При исследованиях у животных при МРТ индекс усиления T1-взвешенного спин-эхо изображения опухоли во всех случаях превосходил 1,7 (в среднем 1,82 ± 0,10) (рис. 2). При расчете индекса «опухоль/фон» для ^{99m}Tc-ДЦТА он составил 2,6-7,3 (в среднем 4,12 ± 1,05).

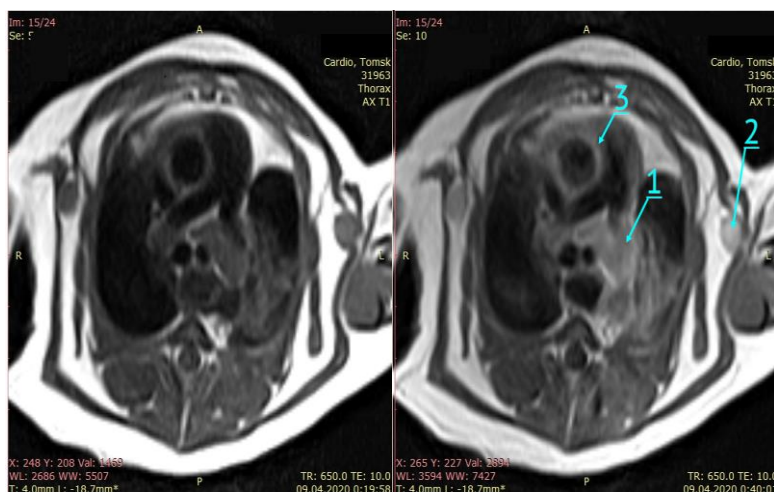


Рис. 2. Картина парамагнитного контрастного усиления поражения грудной клетки на T1-взв. спин-эхо МРТ с Mn-ДЦТА у кошки с распространенной неходжкинской лимфомой (МРТ до и после введения Mn-ДЦТА). Хорошо видно высокоинтенсивное накопление контраста-парамагнетика в лимфomatной ткани поражения средостения (1) и левой подмышечной впадины (2), а также по ходу стенки восходящей аорты (3)

Заключение. Комплексы ДЦТА с марганцем (II) — для контрастирования в МРТ и с ^{99m}Tc — для ОФЭКТ - обладают неотличимыми фармакокинетическими свойствами, нетоксичны, не диссоциируют в физиологических средах и могут быть в дальнейшем использованы для контрастирования при мультимодальных МРТ-ОФЭКТ исследованиях. Комплексообразователи ^{99m}Tc с константами термодинамической устойчивости более 16 могут в ближайшей перспективе послужить важным источником для разработки парамагнитных контрастных препаратов на основе Mn.

Литература

1. Лишманов Ю.Б. Национальное руководство по радионуклидной диагностике. / под ред. Ю.Б. Лишманова, В.И. Чернова. – Томск. 2010. Т. 1. – 432 с.
2. Панов В.О., Шимановский Н.Л. Диагностическая эффективность и безопасность макроциклических гадолинийсодержащих магнитно-резонансных контрастных средств. *Вестник рентгенологии и радиологии.* 2017;98(3):159 -166. DOI: 10.20862/0042-4676-2017-98-3-159-166
Ussov W.Yu., Belyanin M.L., Bezlepkin A.I., Borodin O.Yu., Bobrikova E.E., Shimanovskii N.L. Magnetic Resonance Imaging of Brain Involvement in Dogs Using Paramagnetic Contrast Enhancement with Mn(II)-DCTA. *Bull.Exp.Biol.Med.* 2016;161:715–718. doi: 10.1007/s10517-016-3492-1

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СТОРОЖЕВЫХ УЗЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОКОЛЛОИДНОГО ПРЕПАРАТА ^{99m}Tc -АЛОТЕХ

В.И.Чернов^{1,2}, А.А.Медведева¹, Р.В.Зельчан^{1,2}, О.Д.Брагина^{1,2}, А.Н.Рыбина¹, В.С.Скуридин², Е.С.Стасюк², А.В.Гольдберг¹, Е.Ю.Гарбуков¹

¹НИИ онкологии ТНИМЦ, г. Томск, Россия

²Научно-исследовательский центр (НИЦ) «Онкотерапевтика»,
Национальный исследовательский Томский политехнический университет
(НИ ТПУ), г. Томск, Россия

e-mail: chernov@tnimc.ru

Ключевые слова: сторожевые лимфатические узлы, рак молочной железы, рак гортани.

Введение. В современной онкологической практике все больший интерес вызывает выявление сторожевых лимфатических узлов (СЛУ) – первых узлов, стоящих на пути метастазирования злокачественных новообразований. Интраоперационное выявление СЛУ с их срочным морфологическим исследованием позволяет персонализировать объем хирургического вмешательства при раннем раке молочной железы, меланоме, опухолях гортани и гортаноглотки, новообразованиях шейки матки и эндометрия. Основным способом визуализации СЛУ является интраоперационная радиометрия с помощью гамма-зондов после паратуморального введения нанокolloидных меченных соединений (Чернов В.И. и др., 2008). Используемые для выявления СЛУ за рубежом нанокolloидные препараты обладают рядом недостатков (Лишманов Ю.Б., Чернов В.И., 2010):

- низкий уровень аккумуляции в СЛУ 1-2%;
- накопление в лимфатических узлах 2 и 3 порядков;
- отсутствие регистрации в Российской Федерации.

Поэтому в настоящее время идет непрерывный поиск более специфичных РФП для молекулярной визуализации СЛУ. В наших учреждениях в рамках гранта ФЦП «Фарма 2020» для этих целей был разработан оригинальный РФП на основе гамма оксида алюминия ^{99m}Tc - Al_2O_3 , а также проведены его доклинические исследования. Радиофармпрепарат был создан на основе субстанции, которая является нанокolloидом, но не мигрирует по лимфатическим путям – гамма-оксиде алюминия. Чтобы придать лимфотропность этому соединению – наночастицы покрывают органической оболочкой. В сторожевом узле РФП теряет эту оболочку, а вместе с ней и способность миграции по лимфатическим путям. Проведенные доклинические испытания ^{99m}Tc - Al_2O_3 продемонстрировали его эффективность, безопасность и оптимальность фармакокинетических параметров для интраоперационного выявления СЛУ. Исследование фармакокинетики ^{99m}Tc - Al_2O_3 показало, что через 24 часа после введения в лимфатическом узле аккумулируется около 12% от введенной дозы РФП, что позволяет достоверно производить детекцию СЛУ (Chernov V.I. et al., 2016). Пилотные клинические исследования применения ^{99m}Tc - Al_2O_3 показали высокую диагностическую эффективность разработанного нами РФП при ряде злокачественных новообразований (Чернышова А.Л. и др., 2012; Chernov V. et al., 2015; Doroshenko A. et al., 2016; Очиров М.О. и др., 2018).

Цель. Изучить возможность применения ^{99m}Tc - Al_2O_3 для визуализации СЛУ при раке молочной железы, гортани и гортаноглотки.

Материалы и методы. Определение СЛУ было проведено 86 больных раком молочной железы и 54 пациентам со злокачественными опухолями гортани и гортаноглотки. В 85 случаях для визуализации СЛУ применяли ^{99m}Tc - Al_2O_3 , у 55 пациентов использовался ^{99m}Tc -фитатный коллоид. Выполнение исследования включало в себя проведение паратуморальной инъекции РФП, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с последующим качественным и количественным анализом полученных изображений. Затем выполнялась интраоперационная детекция лимфатических узлов, их удаление с последующим морфологическим исследованием, результаты которого также сопоставлялись с данными однофотонной эмиссионной компьютерной томографии.

Результаты. Клинические исследования показали, что радионуклидная визуализация сторожевых лимфатических узлов с использованием ^{99m}Tc - Al_2O_3 (рисунок 1) характеризуется более высокой чувствительностью по сравнению с ^{99m}Tc -фитатным коллоидом, как при раке молочной железы (94,5% и 87,1%), так и при раке гортани/гортаноглотки (90% и 83,3%), за счет более интенсивного уровня аккумуляции ^{99m}Tc - Al_2O_3 в СЛУ.

Оптимальной временной точкой для проведения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии после инъекции ^{99m}Tc - Al_2O_3 является 18-20 часов, что позволяет визуализировать максимально возможное количество лимфатических узлов с наиболее оптимальным уровнем радиоактивности для их детекции, как на томосцинтиграммах, так и интраоперационно.

Заключение. При планировании оперативного этапа лечения для определения объема хирургического вмешательства в алгоритм обследования пациентов с опухолями молочной железы, гортани и гортаноглотки целесообразно включать радионуклидную диагностику сторожевых лимфатических узлов с ^{99m}Tc - Al_2O_3 . Оптимальной временной точкой для проведения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии после инъекции ^{99m}Tc - Al_2O_3 является 18-20 часов.

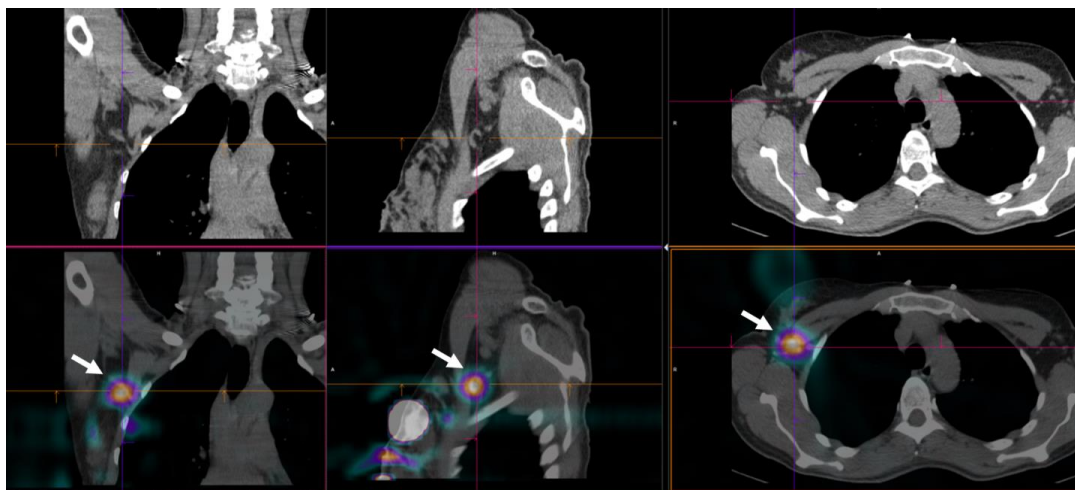


Рис. 1. ОФЭКТ/КТ пациентки с опухолью правой молочной железы после введения ^{99m}Tc - Al_2O_3 : высокая интенсивность накопления индикатора в сторожевом лимфатическом узле, расположенном в аксиллярной области (стрелки)

Литература

1. Лишманов Ю.Б. Национальное руководство по радионуклидной диагностике / под ред. Лишманов Ю.Б., Чернов В.И., Томск: STT. 2010. Том 2
2. Очиров М.О., Коломиец Л.А., Чернов В.И., Синилкин И.Г., Чернышова А.Л., Виллерт А.Б., Молчанов С.В., Чуруксаева О.Н., Кишкина А.Ю. Первый опыт клинического применения лапароскопического гамма-зонда для интраоперационной визуализации «сторожевых» лимфатических узлов при гинекологическом раке. *Сибирский онкологический журнал*. 2018;7(5):45–51. – doi: 10.21294/1814-4861-2018-17-5-45-51.
3. Чернов В.И., Афанасьев С.Г., Синилкин И.Г., Тицкая А.А., Августиневич А.В. Радионуклидные методы исследования в выявлении «сторожевых» лимфатических узлов. *Сибирский онкологический журнал*. 2008;4:5-10.
4. Чернышова А.Л., Ляпунов А.Ю., Коломиец Л.А., Чернов В.И., Синилкин И.Г. Определение сторожевых лимфатических узлов при хирургическом лечении рака шейки матки. *Сибирский онкологический журнал*. 2012;3:28-33.
5. Doroshenko A., Chernov V., Medvedeva A., Zeltchan R., Slonimskaya E., Varlamova N., Sinilkin I., Skuridin V., Dergilev A. The first experience of using of ^{99m}Tc - Al_2O_3 for detection of sentinel lymph nodes in breast cancer В сборнике: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2016:012011.
6. Chernov V., Sinilkin I., Choynzonov E., Chijevskaya S., Titskaya A., Zelchan R., Bragina O., Lyapunov A., Skuridin V. Comparative evaluation of ^{99m}Tc - Al_2O_3 and ^{99m}Tc -fitat nanocolloids for sentinel lymph nodes visualization in patients with cancer of larynx and hypopharynx. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015;42(S1):704.
7. Chernov V.I., Sinilkin I.G., Zelchan R.V., Medvedeva A.A., Lyapunov A.Yu., Bragina O.D., Varlamova N.V., Skuridin V.S. Experimental study of ^{99m}Tc -aluminum oxide use for sentinel lymph nodes detection В сборнике: *AIP Conference Proceedings*. 2016:020012-020012-5.

ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ – ИСТОЧНИК НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Высокомолекулярные и супрамолекулярные природные соединения

КОРРЕКЦИЯ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ ГИДРОКСОКОМПЛЕКСАМИ Fe(III),
СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ГУМИНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ, НА МОДЕЛИ ОСТРОЙ
ПОСТГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ АНЕМИИ

Ю.Р. Белым^{1*}, К.А. Братишко^{1,2}, В.В. Иванов¹, Е.Е. Буйко^{1,2},
А.А. Уфандеев¹, М.В. Зыкова¹, А.М. Жиркова³, И.В.Перминова³

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

²ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, Россия

e-mail: byr2406@mail.ru

Ключевые слова: гуминовые вещества, железодефицитная анемия, комплексы железа, биодоступность.

Введение. Железо является важнейшим микроэлементом, входящим в состав более 100 ферментов организма человека и принимающим участие в дыхании, кроветворении и окислительно-восстановительных реакциях. Дефицит железа является наиболее частой причиной анемии и обычно обусловлен кровопотерей. В настоящее время продолжают активные разработки по поиску препаратов с высокой биодоступностью железа на основе альтернативных лигандов, способных стабилизировать гидроксокомплексы Fe(III). Перспективными в этом отношении являются гуминовые вещества, которые представляют собой природные макролиганды, обладающие высоким сродством к связыванию Fe(III) и хорошим профилем безопасности. В лаборатории природных гуминовых систем кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ на основе гуминовых лигандов получены гидроксокомплексы Fe(III) C100 (гуминовый комплекс гидроксида железа(III)) и F50 (фульво-полимальтозатный комплекс гидроксида железа(III)). **Цель.** Провести скрининг фармакодинамической активности гуминовых железосодержащих активных фармацевтических субстанций (АФС) для коррекции железодефицитной анемии (ЖДА) на модели острой постгеморрагической анемии (ОПГА).

Материалы и методы. Исследования выполнены на крысах-самках линии Wistar конвенциональной категории массой 272-307 г., полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск). Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали рекомендациям международных этических комитетов (Директива Совета ЕС 2010/63/EU; Euroguide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011). Содержание животных и дизайн экспериментов одобрены, этическая экспертиза проведена, протокол экспериментов на животных соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований и одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 8461/1 от 5 ноября 2020 г.). Для воспроизведения острой постгеморрагической анемии (ОПГА) была выбрана модель острой кровопотери (кровь отбирали в объеме, эквивалентном 1,5 % от массы тела животного из хвостовой вены под ингаляционным наркозом) (Остроушко А.А. и др., 2017). Животные были разделены на шесть экспериментальных групп путем рандомизации. Животным первой группы (контроль, n=5) в течение 5 дней после острой кровопотери ежедневно внутрижелудочно вводили воду очищенную в объеме 1 мл. Вторая группа (n=5) служила положительным контролем, и животные этой группы в течение 5 дней ежедневно внутрижелудочно получали референтный препарат - сироп Феррум Лек® (Словения) в дозе 17 мг/кг в пересчете на элементарное железо. Животным третьей, четвертой, пятой и шестой групп (n=5) в течение 5 дней ежедневно внутрижелудочно вводили железосодержащие АФС на основе гуминовых веществ (C100, C50, F100, F50 соответственно) в дозе 17 мг/кг в пересчете на элементарное железо.

Кровь, отобранная из хвостовой вены при моделировании ОПГА у животных всех групп, подвергалась гематологическому анализу с использованием специализированного автоматизированного гематологического анализатора класса 3-diff BC-2800Vet (Mindray, Китай), предназначенного для исследования крови лабораторных животных, а также в ветеринарии. Динамику развития модели постгеморрагической анемии и влияния внутрижелудочного введения железосодержащих АФС на основе гуминовых веществ отслеживали, анализируя следующие показатели: содержание гемоглобина (HGB), г/л; уровень эритроцитов (RBC), *10³/мкл в цельной крови крыс, а также гематокрит (HCT), %. Содержание железа в сыворотке крови определяли с использованием стандартных наборов реактивов фирмы «Вектор-

Бест» (г. Новосибирск) спектрофотометрическим методом в соответствии с протоколами, предоставленными производителем. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). По окончании эксперимента на 6 сутки после острой кровопотери крыс подвергали эвтаназии методом СО₂-асфиксии. Цельную кровь отбирали для последующего гематологического анализа, а также для определения сывороточного железа. Статистический анализ материала проводили с помощью программ Statistica 8.0 (Stat. Soft. Inc.) и Microsoft Excel 2016. Использовали методы непараметрической статистики — критерии Фридмана и Краскела-Уоллиса. Для каждой выборки вычисляли среднее значение величины признака X и ошибку средней величины SE. Различия между наблюдениями/группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Результаты скрининга антианемической активности гидроксокомплексов Fe(III), стабилизированных гуминовыми лигандами, С100, С50, F100 и F50 представлены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние острой кровопотери (1,5 % от массы тела), а также ежедневного внутрижелудочного введения гидроксокомплексов Fe(III), стабилизированных гуминовыми лигандами, (С100, С50, F100, F50) и референтного препарата Феррум Лек® в течение 5 дней на гематологические показатели крови и уровень сывороточного железа у крыс ($X \pm SE$)

Группа	Гематологические показатели							
	До моделирования ОПГА				После курсового введения			
	HGB, г/л	HCT, %	RBC, $\times 10^{12}/л$	Fe, мкМ	HGB, г/л	HCT, %	RBC, $\times 10^{12}/л$	Fe, мкМ
Вода (n=5)	193,5±6,4	55,0±1,8	9,6±0,6	58,9±3,6	147,6±2,1*	44,3±0,7*	7,2±0,1*	37,4±4,0*
Феррум Лек® (n=5)	195,0±8,7	59,0±2,8	10,4±0,4	43,9±6,3	156,0±3,6*	47,2±4,5*	7,8±0,2*	46,5±4,5
С100 (n=5)	185,0±6,4	56,0±2,3	10,4±0,4	52,3±5,9	176,4±7,7#	52,7±2,3#	8,8±0,4#	50,8±2,4#
С50 (n=5)	191,0±13,3	43,6±1,6	7,8 ± 0,3	56,3±7,0	146,0 ± 2,9*	42,6 ± 0,8	7,1 ± 0,3	38,8 ± 7,3
F100 (n=5)	177,0±4,7	52,8±1,5	9,3±0,2	51,4±2,9	169,6±2,0*#	51,7±0,6#	8,6±0,1#	51,8±1,7#
F50 (n=5)	172,1 ± 3,0	43,5± 2,8	7,9 ± 0,4	58,7 ± 3,9	143,6 ± 6,8*	41,4 ± 1,9	7,1 ± 0,4	51,1 ± 4,4

Примечание. 1. * различия с группой «До моделирования ОПГА» статистически значимы, $p < 0,05$ (критерий Фридмана). 2. # различия с группой «Вода» статистически значимы, $p < 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса). 3. ^ различия с группой Феррум Лек® статистически значимы, $p < 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса).

Препарат сравнения Феррум Лек® при курсовом введении в дозе 17 мг/кг в пересчете на элементарное железо в течение 5 дней не оказывал существенного влияния на концентрацию гемоглобина, количество эритроцитов, гематокрит в сравнении с данными показателями у животных контрольной группы (таблица 1). В то же время, происходило увеличение концентрации сывороточного железа до исходных значений ($p > 0,05$). Ежедневное внутрижелудочное введение крысам с моделью ОПГА гидроксокомплекса Fe(III), стабилизированного гуминовым лигандом, С100, матрица которого содержит 100% гумата калия, в дозе 17 мг/кг в пересчете на элементарное железо в течение 5 дней приводило к повышению концентрации гемоглобина, количества эритроцитов, гематокрита и железа в сыворотке крови в сравнении с этими показателями у животных контрольной группы ($p < 0,05$) (таблица 1). При этом произошло восстановление описанных выше показателей до исходных значений ($p > 0,05$). Введение в той же дозе АФС С50, матрица которой содержит 50% гумата калия и 50% полимальтозата, приводило к повышению количества эритроцитов, гематокрита и железа в сыворотке крови на фоне острой кровопотери (таблица 1). В то же время концентрация гемоглобина в эритроцитах не достигала значений до моделирования ОПГА ($p < 0,05$), что свидетельствует о более низкой антианемической активности С50 по сравнению с С100. Курсовое пятидневное введение АФС F100, содержащей матрицу на основе 100% фульвокислот, приводило к повышению концентрации гемоглобина, количества эритроцитов, гематокрита и железа в сыворотке крови в сравнении с этими показателями у животных контрольной группы ($p < 0,05$). При этом следует отметить, что в отличие от АФС С100 концентрация гемоглобина в эритроцитах крыс не достигала значений до моделирования ОПГА ($p < 0,05$). Введение в той же дозе в пересчете на элементарное железо АФС F50, матрица которой содержит 50% фульвокислот и 50% полимальтозата, оказывало антианемическое действие, которое сопровождалось повышением количества эритроцитов, гематокрита и железа в сыворотке крови (табл. 5.). В тоже время концентрация гемоглобина в эритроцитах крыс не достигала значений этого показателя до острой кровопотери ($p < 0,05$).

Заключение. Все исследуемые АФС оказывают антианемическое действие, однако выраженность их эффектов различна. Наиболее выраженная активность показана для АФС С100, матрица которой представлена 100% гуматом калия. Менее выраженная активность отмечалась у АФС F100, матрица которой представлена 100% фульвокислотами. Наименьшую активность проявили АФС, содержащие комбинированные матрицы: С50 (50% гумата калия и 50% полимальтозата) и F50 (50% фульвокислот и 50% полимальтозата). Можно предположить, что наименьшая активность АФС С50 и F50 на основе комбинированных матриц, вероятно, обусловлена тем, что при способе синтеза, применимом для данных АФС (образование комбинированных матриц), железо раскрывает циклы полимальтозата, что снижает стабильность последнего.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБОУ ВО СибГМУ Положение № 26 «О поддержке программ развития Научно-исследовательской деятельности кафедр».

Литература

Остроушко А.А. Способ коррекции постгеморрагической анемии. Патент России № 2017124300. Остроушко А.А., Тонкушина М.О., Гагарин И.Д. 2017.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ТОРФА

К.А. Братишко^{1,2*}, М.В. Зыкова¹, В.В. Иванов¹, М.В. Белоусов^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

²ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

e-mail: kr-1295@mail.ru

Ключевые слова: гуминовые кислоты, торф, антиоксиданты, свободные радикалы.

Введение. В процессе клеточного дыхания также происходит образование побочных продуктов – свободных радикалов – частиц, имеющих неспаренный электрон, обладающих высокой реакционной способностью. В определенных условиях системы поддержания окислительно-восстановительного баланса могут оказаться недостаточно эффективными, в результате чего происходит экспоненциальный рост концентраций активных форм кислорода (АФК), и, свободно-радикальные процессы протекают более интенсивно, чем в норме – возникает состояние окислительного стресса. Окислительный стресс выполняет роль триггера целого ряда неспецифических реакций, результатом которых является каскад разнонаправленных метаболических процессов, приводящих к разрушению мембран клеток, инаktivации ферментов и гормонов, окислению нуклеиновых кислот с последующим нарушением клеточного цикла и, в конечном итоге, к гибели клетки. Известно, что избыточная продукция АФК является маркером патологических состояний организма человека, а процесс радикального окисления эссенциальных веществ клеток (липидов, углеводных компонентов и др.) является одним из этиологических факторов большинства заболеваний (сахарного диабета, атеросклероза, онкологических заболеваний и др.). Значимыми являются исследования групп биологически активных соединений (БАС), обладающих способностью прерывать развитие цепных свободно-радикальных процессов с образованием нейтральных молекул и радикалов со значительно меньшей активностью, в том числе на основе природного сырья. Перспективной группой таких БАС являются гуминовые кислоты (ГК) торфа, как природные гетерогенные и полидисперсные высокомолекулярные соединения, содержащие в своей структуре различные ароматические и алифатические азот- и кислородсодержащие функциональные группы. Высокая биологическая активность ГК с одной стороны обусловлена сложностью их химической организации, с другой – высокой тропностью к биологическим мембранам, участием в ионном обмене и др.

Цель. Провести сравнительный анализ антирадикальных свойств ГК торфа в зависимости от их этиологии и способа выделения.

Материалы и методы. Антирадикальная активность (АРА) ГК была исследована с использованием четырех различных, нетрадиционных для гуминовых соединений колориметрических методик оценки АРА. Объектами исследования являются ГК, выделенные из девяти видов торфа низинного, переходного и верхового типов щелочной (ГКщ) и пирофосфатной экстракцией (ГКп). Колориметрия с катион-радикалом АВТС⁺. Взаимодействие ГК со стабильным свободным катион-радикалом АВТС⁺ (диаммониевая соль 2,2'-азино-ди-(3-этилбензтиазолинсульфоновой кислоты) оценивали по снижению его содержания в реакционной среде в присутствии различных концентраций ГК. Катион-радикал АВТС⁺ формировали в растворе действием калий пероксодисульфата (Bentayeb K. et al., 2012). АРА оценивали по показателю IC50 – концентрации ГК, при которой концентрация катион-радикала АВТС⁺ в данной модельной системе снижалась в 2 раза. В качестве положительного контроля использовали водорастворимый аналог токоферола – препарат «Тролокс» (Acros Organics, Slovakia). НСТ-тест. Взаимодействие ГК с супероксид-анион-радикалом (O^{2-•}) исследовали прямым методом по измерению концентрации O^{2-•}. Для создания постоянного уровня O^{2-•} использовали неферментативную систему генерации O^{2-•} (Schepetkin I. et al., 2006), где электроны с НАДН+Н⁺ через феназинметасульфат (ФМС) переносятся на молекулярный кислород с образованием супероксида, который восстанавливает нитросиний тетразолий (НСТ) до формазана, имеющего максимум поглощения при 560 нм (Mahakunakorn P. et al., 2004). Эффективность ингибирования

реакции $O^{2\cdot-}$ -зависимого восстановления НСТ оценивали по способности ГК блокировать эту реакцию. АОА оценивали по показателю IC50 – концентрация исследуемого образца ГК, при которой скорость реакции восстановления НСТ уменьшается в 2 раза. Положительным контролем служил водорастворимый антиоксидант - аскорбиновая кислота (Sigma Aldrich, USA). Колориметрия с феррозином. Специфическую железосвязывающую (хелатирующую) активность определяли по реакции с комплексом феррозин- Fe^{2+} (Mahakunakorn P. et al., 2004). Данный метод позволил оценить способность образцов ГК связывать ионы Fe^{2+} , тем самым подавляя инициацию перекисного окисления липидов (ПОЛ) и реакции разветвления свободнорадикального процесса окисления липидов. Железосвязывающую активность оценивали по показателю IC50 – концентрация исследуемых образцов ГК, при которой интенсивность окраски комплекса феррозин- Fe^{2+} в модельной системе снижалась в 2 раза. В качестве эталона был использован классический хелатор - этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Sigma Aldrich, USA). Колориметрия с ТБК. Гидроксильный радикал (HO^{\cdot}) - очень мощный окислитель, который реагирует почти со всеми биомолекулами, находящимися в живых клетках (Trembl J., Šmejkal K., 2016). Генерацию HO^{\cdot} осуществляли в реакции Хабера – Вейса в присутствии дезоксирибозы. Под влиянием HO^{\cdot} происходила дегградация дезоксирибозы до малонового диальдегида (МДА). Последний определяли по реакции взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), которая при высокой температуре и кислом pH протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 532 нм (Mahakunakorn P. et al., 2004). В связи с наличием высокой хелатирующей активности образцов ГК, необходимо учитывать возможность связывания Fe^{3+} с молекулами ГК, что может привести к снижению концентрации HO^{\cdot} . Известно, что ЭДТА связывает ионы Fe^{3+} в комплекс, который способен генерировать HO^{\cdot} (Mahakunakorn P. et al., 2004), поэтому способность ГК связывать HO^{\cdot} была изучена в модельной системе с ЭДТА и без ЭДТА. На основании кривой зависимости «доза–эффект» рассчитывали концентрацию образца ГК, при которой наблюдалось 50% ингибирование образования МДА из дезоксирибозы под действием HO^{\cdot} . В качестве эталона был использован маннитол (Acros Organics, China) - классическая ловушка гидроксильного радикала. Статистическая обработка данных производилась путем расчета среднего (M) и стандартного отклонения ($M \pm m$) с использованием программного обеспечения SPSS 17.0 (IBM, США).

Результаты. Все 18 образцов ГК снижали концентрацию катион-радикала $ABTS^{\cdot+}$ в модельной системе. Стоит отметить, что наиболее высокая АРА активность в отношении катион-радикала $ABTS^{\cdot+}$ была выражена у ГКщ, а именно для ГК, полученных из двух низинных видов торфа - травяного и травяно-мохового, и двух верховых - магелланикум и сосново-пушицевого видов торфа. Активность ГК торфа сопоставима с эталонным антиоксидантом – Тролокс. При оценке способности ГК инактивировать $O^{2\cdot-}$ в реакции восстановления НСТ до формазана были получены схожие результаты с предыдущим исследованием. ГКщ показали более высокую АРА активность по сравнению с ГКп. Наиболее активными образцами оказались ГК, полученные из трех низинных видов торфа - травяного, травяно-мохового и древесно-травяного, и трех верховых - сосново-пушицевого, магелланикум и сфагново-мочажинного видов торфа. Для некоторых образцов отмечена более высокая АРА (5,5-12,4 мкг/мл) в сравнении с препаратом сравнения-аскорбиновой кислоты (13,2±0,8 мкг/мл), для остальных образцов активность была сопоставима с эталонным препаратом. При изучении специфической железосвязывающей (хелатирующей) активности в модельной системе ГК с комплексом феррозин- Fe^{2+} , отмечался противоположный эффект по сравнению с предыдущими двумя исследованиями, а именно, что ГКп в сравнении с ГКщ обладают более высокой хелатирующей активностью. Таким образом, хелатирующая активность ГК сопоставима с эталонным хелатором ЭДТА. При изучении ингибирующей способности ГК в отношении гидроксильного радикала была показана их очень высокая активность. Подобная активность вероятнее всего связана не только со способностью ГК инактивировать HO^{\cdot} , но и наличие хелатирующей активности в отношении ионов железа, что было доказано в предыдущем исследовании. Основываясь на этих данных, было проведено дополнительное исследование, чтобы исключить хелатирующую активность ГК, с добавлением ЭДТА, поскольку он образует комплекс с ионами железа, способного генерировать HO^{\cdot} в модельной системе. В результате была показана истинная способность ГК ингибировать HO^{\cdot} . Отметим, что более высокая АРА активность в отношении HO^{\cdot} отмечена у ГКщ. Таким образом, все образцы ГК показали способность ингибировать HO^{\cdot} в диапазоне концентраций 0,5-2,0 мг/мл сопоставимую с препаратом сравнения маннитолом. Показано, что активность ГК в разных модельных системах неодинаковая, это объясняется неодинаковым химическим строением, которое зависит от вида торфа и способа выделения ГК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-65-47052)

Литература

1. Bentayeb K., Rubio C., Nerín C. Study of the antioxidant mechanisms of Trolox and eugenol with 2, 2'-azobis (2-amidinepropane) dihydrochloride using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analyst*. 2012;137(2):459-470. DOI: 10.1039/c1an15505a.
2. Mahakunakorn P., Tohda M., Murakami Y., Matsumoto K., Watanabe H. Antioxidant and free radical-scavenging activity of Choto-san and its related constituents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(1):38-46. DOI: 10.1248/bpb.27.38.
3. Schepetkin I., Potapov A., Khlebnikov A., Korotkova E., Lukina A., Malovichko G., Kirpotina L., Quinn M.T. Decomposition of reactive oxygen species by copper (II) bis(1-pyrazolyl)methane complexes.

4. Trembl J., Šmejkal K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2016;15(4):720-738. DOI: 10.1111/1541-4337.12204.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРООКСИДАНТНОЙ И АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
БИОНАНОМАТЕРИАЛОВ И КОМПОЗИЦИЙ С АНТИМИКРОБНЫМИ И РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИМИ
СВОЙСТВАМИ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *IN VITRO* В
ПРИСУТСТВИИ ПРООКСИДАНТОВ

Е.Е. Буйко^{1,2*}, К.А. Братишко^{1,2}, А.А. Уфандеев¹, В.В. Иванов¹, М.В. Зыкова¹,
М.В. Белоусов^{1,2}, И.В. Перминова³

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

²ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, Россия

e-mail: buykoevgen@yandex.ru

Ключевые слова: гуминовые вещества, наночастицы серебра, антирадикальная активность, прооксиданты.

Введение. На сегодняшний день нанотехнологии получают все более активное развитие вследствие возможности применения наночастиц в широком спектре отраслей, в том числе, в фармацевтической науке для поиска новых перспективных лекарственных средств (Abbasi E. et al., 2016). В частности, для наночастиц серебра (AgNPs) характерна выраженная противомикробная и ранозаживляющая активности (Jiang H. et al., 2004), что позволяет рассматривать их как потенциальные агенты для подавления резистентных к действию антибиотиков штаммов микроорганизмов и ускорения заживления гнойных ран (Hwang I.S. et al., 2012). На базе лаборатории природных гуминовых систем (кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова) был осуществлен синтез наночастиц, содержащих биологически активное серебро, ультрадиспергированное в среде матриц гуминовых веществ и их производных (ГВ-AgNPs). Известно, что окислительный стресс является одной из основных причин нарушения процесса нормальной смены стадий ранозаживления, особенно, если высокий уровень активных форм кислорода (АФК) сохраняется в течение продолжительного времени (Roy S. et al., 2008). Поэтому, оценка прооксидантной или антирадикальной активности (АРА) новых субстанций-кандидатов для разработки средств терапии ран (в том числе и гнойных) является актуальной задачей (Зиновкин Р.А. и др., 2018).

Цель. Оценка влияния исходных матриц гуминовых веществ, а также наночастиц серебра, ультрадиспергированных в исходных матрицах гуминовых веществ, на базальную и стимулированную прооксидантами продукцию активных форм кислорода клетками линий 3T3-L1 и HepG2 *in vitro*.

Материалы и методы. В экспериментах использовали клеточные линии 3T3-L1 и HepG2. Оценка внутриклеточной продукции АФК проводилась с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата (ДХФДА) (Жаркова Л.П. и др., 2010). Для стимуляции продукции АФК использовали перекись водорода в конечной концентрации 100 мкМ. Клетки культивировали в стандартных условиях (атмосфера 5% CO₂, полная питательная среда DMEM/F-12). В исследовании участвовали семь образцов исходных матриц гуминовых веществ (ГВ): СНР-К, СНЕ-К, СНС-К, FА, РНF-T3, Peat1, Peat2, а также соответствующие им ГВ-AgNPs. Использовали 96-луночные планшеты, черные, для оценки флуоресценции. Плотность клеток на лунку составляла 10 000 клеток в 90 мкл среды. Схема рассадки клеток и внесения веществ представлена на рисунке 1. Образцы исследуемых соединений в виде водных растворов вносили в соответствующие лунки в конечной концентрации 12.5 мкг/мл.

Культивирование клеток с исследуемыми образцами проводили в течение 24 ч. Затем, клетки отмывали от образцов ГВ и ГВ-AgNPs, в соответствующие лунки вносили рабочий раствор ДХФДА в конечной концентрации 5 мкМ. Планшеты инкубировали в термостате 20 минут при 37°C. Клетки отмывали от ДХФДА, в лунки «ДХФДА + H₂O₂», «ДХФДА + H₂O₂. + Исх. матрица», «ДХФДА + H₂O₂. + Исх. матрица— AgNPs» вносили раствор перекиси водорода в конечной концентрации 100 мкМ. После инкубации в течение 60 минут при 37°C определяли флуоресценцию в лунках культурального планшета при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны испускания 530 нм, используя многофункциональный микропланшетный ридер Tecan® Infinite 200 PRO (Tecan, Швейцария). Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для выявления достоверности различий использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Достоверность различий считали значимой при $p < 0,05$.

Результаты. В результате проведенных экспериментов установлено, что подавляющее большинство из исследованных ГВ и ГВ-AgNPs обладают способностью снижать уровень АФК, стимулированный введением прооксиданта *in vitro*, то есть демонстрируют АРА. В то же время, ни для одного образца ГВ и ГВ-AgNPs не было показано прооксидантных свойств. В целом, установлено, что исследуемые образцы в значительно большей степени влияют на стимулированный уровень АФК по сравнению с базальным. Исследуемые образцы ГВ-AgNPs демонстрируют более выраженную АРА, в сравнении с исходными ГВ.

Так, из исследованных ГВ, только СНР-К снижает базальный уровень АФК (в культуре НерG2). Стимулированный уровень АФК снижают в двух клеточных линиях (3Т3-L1 и НерG2) образцы: СНР-К, FА, СНS-К, Peat1; только в одной клеточной линии: СНЕ-К (НерG2), Peat2 (НерG2); не демонстрирует АРА только образец РНF-Т3. При исследовании влияния ГВ-AgNPs на базальный уровень АФК, установлено, что три образца (СНР-AgNPs, FА-AgNPs, СНЕ-AgNPs) демонстрируют АРА в двух клеточных линиях (3Т3-L1 и НерG2) два образца (СНС-AgNPs (НерG2), РНF-Т3 (3Т3-L1)) – только в одной, и два образца (Peat1-AgNPs и Peat2-AgNPs) не обладают АРА. Наконец, на стимулированный уровень АФК в двух клеточных культурах (3Т3-L1 и НерG2) влияют все исследуемые образцы ГВ-AgNPs, кроме образца Peat2-AgNPs (АРА обнаружена только в культуре НерG2). В зависимости от количественных значений снижения уровней АФК (базального и стимулированного) в двух культурах клеток, исследуемые образцы ГВ можно расположить в следующий ряд в зависимости от снижения их АРА: FА→СНР-К→СНЕ-К→СНС-К→РНF-Т3→Peat1→Peat2. При построении аналогичного ряда для исследуемых ГВ-AgNPs была получена следующая последовательность: FА-AgNPs→СНР-AgNPs→СНС-AgNPs→СНЕ-AgNPs→РНF-Т3-AgNPs→Peat2-AgNPs→Peat1-AgNPs. Таким образом, наиболее выраженной АРА обладают образцы FА (снижение стимулированного уровня АФК в культуре 3Т3-L1 - на 27,9% (p<0,05), в НерG2 – на 32,1% (p<0,05)) и СНР-К (снижение стимулированного уровня АФК в культуре 3Т3-L1 - на 10,7% (p<0,05), в НерG2 – на 10,8% (p<0,05)). Ультрадиспергирование наночастиц серебра в образцах этих исходных матриц приводит к получению ГВ-AgNPs, обладающих наибольшей способностью снижать уровни АФК: FА-AgNPs снижает базальный уровень АФК в культуре 3Т3-L1 на 20,5% (p<0,05), в НерG2 – на 43,3% (p<0,05), стимулированный уровень АФК в культуре 3Т3-L1 - на 48,7% (p<0,05), в НерG2 – на 55,9% (p<0,05)). СНР-AgNPs снижает базальный уровень АФК в культуре 3Т3-L1 на 49,8% (p<0,05), в НерG2 – на 47,0% (p<0,05), стимулированный уровень АФК в культуре 3Т3-L1 - на 32,4% (p<0,05), в НерG2 – на 49,9% (p<0,05)).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 20-65-47052).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	Blank	К	Исх. матрица	Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА	ДХФДА + Исх. матрица	ДХФДА + Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА + H ₂ O ₂ .	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. матрица	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. Матрица—AgNPs	PBS
PBS	Blank	К	Исх. матрица	Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА	ДХФДА + Исх. матрица	ДХФДА + Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА + H ₂ O ₂ ..	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. матрица	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. Матрица—AgNPs	PBS
PBS	Blank	К	Исх. матрица	Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА	ДХФДА + Исх. матрица	ДХФДА + Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА + H ₂ O ₂ ..	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. матрица	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. Матрица—AgNPs	PBS
PBS	Blank	К	Исх. матрица	Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА	ДХФДА + Исх. матрица	ДХФДА + Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА + H ₂ O ₂ ..	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. матрица	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. Матрица—AgNPs	PBS
PBS	Blank	К	Исх. матрица	Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА	ДХФДА + Исх. матрица	ДХФДА + Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА + H ₂ O ₂ ..	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. матрица	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. Матрица—AgNPs	PBS
PBS	Blank	К	Исх. матрица	Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА	ДХФДА + Исх. матрица	ДХФДА + Исх. Матрица—AgNPs	ДХФДА + H ₂ O ₂ ..	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. матрица	ДХФДА + H ₂ O ₂ .. + Исх. Матрица—AgNPs	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Рис.1. Схема раскладки клеток и внесения веществ для определения влияния исходных матриц гуминовых веществ и наночастиц серебра, ультрадиспергированных в исходных матрицах, на продукцию АФК клетками линий 3Т3-L1 и НерG2. 1 – контроль аутофлуоресценции клеточной культуры; 2 - контроль аутофлуоресценции растворителя исследуемых веществ; 3 - контроль аутофлуоресценции исходных матриц гуминовых веществ, 4 - контроль аутофлуоресценции наночастиц серебра, ультрадиспергированных в матрицах гуминовых веществ; 5 – базальный уровень продукции АФК в клеточных культурах; 6 – влияние исходных матриц гуминовых веществ на базальную продукцию АФК; 7 - влияние наночастиц серебра, ультрадиспергированных в матрицах гуминовых веществ, на базальную продукцию АФК; 8 – уровень продукции АФК, стимулированный перекисью водорода; 9 - влияние исходных матриц гуминовых веществ на стимулированную перекисью водорода продукцию АФК; 10 - влияние наночастиц серебра, ультрадиспергированных в матрицах гуминовых веществ, на стимулированную перекисью водорода продукцию АФК

Литература

1. Зиновкин Р.А., Попова Е.Н., Плетюшкина О.Ю., Ильинская О.П., Перспективы использования средств на основе митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 в лечении труднозаживающих ран (обзор). *Общая реаниматология*. 2018;14(2):1.
2. Жаркова Л.П., Князева И.Р., Иванов В.В. Влияние импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах. *Вестник Томского государственного университета*. 2010;333.
3. Abbasi E., Milani M., Fekri Aval S., Kouhi M. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical reviews in microbiology*. 2016;42(2):173-180.
4. Jiang H., Manolache S., Wong A.C.L. Plasma-enhanced deposition of silver nanoparticles onto polymer and metal surfaces for the generation of antimicrobial characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004;93(3):1411-1422.
5. Hwang I.S., Hwang J.H., Choi H. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *Journal of medical microbiology*. 2012;61(12):1719-1726.
6. Roy S., Khanna S., Sen C.K. Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: Hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free radical biology and medicine*. –2008;44(2):180-192.

ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ УГЛЯ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА НА БАЛАНС АРГИНИНА В АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ МЫШЕЙ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

М.Г. Данилец^{1*}, Е.С. Трофимова¹, М.В. Зыкова², Е.Ю. Шерстобоев¹, А.А. Лигачева¹,
А.В. Цупко², Д.А. Михалев², М.В. Белоусов^{2,3}

¹НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

²ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

³НИ ТПУ, г. Томск, Россия

e-mail: m.danilets@mail.ru

Ключевые слова: гуминовые вещества угля, наночастицы серебра, баланс аргинина.

Введение. Не вызывает сомнения тот факт, что для поддержания благополучия любому организму требуются полноценное питание, здоровая окружающая среда и своевременная профилактика болезней. Сделать это достаточно сложно в условиях ухудшения экологического окружения и обилия химических соединений и заменителей натуральных продуктов в пище. Благодаря широкому спектру действия, гуминовые вещества (ГВ) оказывают положительный эффект на все системы организма и не имеют побочных эффектов для здоровья человека. В наше время в экспериментальной медицине наблюдается повышение интереса к изучению ГВ различного происхождения, описаны их фармакологические свойства (иммунокорректирующие, гепатопротекторные, ранозаживляющие и пр.), а также предполагаемые механизмы действия (Белоусов М.В. и др., 2014; Бузлама А.В., 2015). В частности, в Германии на основе натуральных гуминовых кислот угля WH67 зарегистрирован лекарственный препарат для перорального применения Активомин® (Institut AllergoSan, Германия) для активации защитных сил организма и иммунной системы за счет устранения токсинов, лечения и профилактики желудочно-кишечных и метаболических расстройств, как противовоспалительное средство при ревматических болях. Известно, что макрофаги (МФ) в ответ на микробное поражение, повреждение тканей или активацию Th1 или Th2 лимфоцитами претерпевают два разных состояния поляризации: классически активированный фенотип M1 и альтернативно активированный M2. Одним из критериев различных функциональных фенотипов поляризации МФ, кроме секреции специфических цитокинов, является метаболизм аргинина. M1 характеризуются экспрессией NOS2 и продукцией NO – важным эффектором их микробицидной активности. Напротив, M2 не продуцируют NO, но экспрессируют высокие уровни аргиназы (Arg1), которая катализирует утилизацию полиаминов, необходимых для синтеза коллагена, пролиферации клеток, фиброза и других функций ремоделирования тканей (Sharoufi-Moghaddam A. et al., 2018). В работе изучено влияние ГВ угля (Gen), бионаноструктурированной композиции на основе Ag и ГВ Gen и препарата сравнения из гуминовых кислот (ГК) угля Активомин® на баланс аргинина в антигенпрезентирующих клетках мышей.

Цель. Выявить влияние ГВ угля различного генеза на функциональные характеристики макрофагов (*in vitro*) и механизмы реализации их иммуномодулирующего действия.

Материалы и методы. ГВ угля (производства ООО НПП «Генезис» (Gen)) представляют собой аморфный порошок тёмно-коричневого цвета, без запаха, хорошо растворимый в воде, активная фармацевтическая композиция Gen-AgNP – жидкость насыщенного тёмно-коричневого цвета, содержащая водный раствор реакционных наночастиц серебра, ультрадиспергированных в матрице ГВ – Gen. Препарат ГК угля «Активомин» (Activomin®, Weinböhla GmbH, Германия) представляет собой аморфный порошок тёмно-коричневого цвета, без запаха, плохо растворимый в воде. Баланс аргинина и цитотоксические свойства оценивали в культуре перитонеальных МФ, полученных из интактных мышей линии C57BL/6 (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга). Зрелые МФ выделяли с помощью набора EasySep™ Biotin Positive Selection Kit и антител, специфических к макрофагальным рецепторам Anti-Mouse F4/80 Antibody («Stem Cell») из

клеточной взвеси, полученной вымыванием ледяным изотоническим раствором хлорида натрия 0,9% (ФР) из брюшной полости мышей, и культивировали ($3,0 \times 10^6$ клеток/мл) 48 часов в плоскодонных 96-луночных планшетах в полной культуральной среде (90% среды RPMI-1640 («Sigma»), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Hyclone»), 20 мМ HEPES («Sigma»), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma»), 50 мкг/мл гентамицина («Sigma»), 2 мМ L-глутамин («Sigma»)), при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности в присутствии различных концентраций ГВ, Активомин® или 0,1 мкг/мл ЛПС (серотип O111:B4, «Sigma»). Колориметрическим методом оценивали в супернатантах клеток при помощи реактива Грейса концентрацию нитритов (NO), в лизате клеток в тесте с мочевиной активность аргиназы и в тесте тетразолиевым красителем (МТТ, «Sigma») пролиферацию, измеряя абсорбцию полученных растворов на многоканальном спектрофотометре при длине волны 540 нм (Belska N.V. et al., 2010). Концентрацию нитритов рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия. Примеси ЛПС (эндотоксина) определяли в тесте с антибиотиком полимиксином В («InvivoGen»). Статистическую обработку проводили с помощью пакета статистических программ Statistica 13.3, для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка, однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Даннета. Результаты представлены в виде $X \pm m$, где X — среднее значение, m — стандартная ошибка среднего при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Прежде всего, в работе проводилось сравнение NO-стимулирующих свойств отечественного образца ГВ угля Gen и его бионаноконпозиции с серебром Gen-AgNP с Активомин® в антигенпрезентирующих клетках мышей (табл. 1).

Таблица 1. Влияние различных гуминовых веществ угля на пролиферацию и продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей, ($X \pm m$)

Исследуемое вещество	Концентрация мкг/мл	Пролиферация, ед. опт. плотности, 10^{-3}	Концентрация нитритов, мкМ
Среда (контроль 1)	-	457±10	1,13±0,13
ЛПС (контроль 2)	0,1	407±10	14,77±1,06*
Активомин®	1	456±3	1,72±0,04*●
	10	489±5	2,44±0,05*●
Среда (контроль 1)	-	282±12	2,44±0,17
ЛПС (контроль 2)	0,1	279±7	37,89±0,71*
Gen	1	264±8	41,61±0,28*
	10	260±5	33,91±0,71*
Gen-AgNP	1	294±9	2,53±0,07●
	10	255±2	2,41±0,07●

Примечание. *– различия показателя с контролем 1 достоверны, ● – различия показателя с контролем 2 достоверны. $p < 0,05$, $n=5$

Культивирование МФ с препаратом сравнения приводило к усилению продукции оксида азота относительно интактного контроля в 1,5 и 2 раза в концентрациях 1 и 10 мкг/мл, соответственно. Инкубация с Gen вызывала значительное усиление секреторных свойств МФ в 17 (1 мкг/мл) и 14 (10 мкг/мл) раз по сравнению с контролем 1. Бионаноконпозиция с серебром не влияла на показатель. При этом NO-стимулирующее действие Gen было сравнимо с уровнем активации митогеном, а Активомин® на порядок его ниже. Оценка влияния ГВ на пролиферацию МФ выявила, что изучаемые вещества не обладают цитотоксическим действием на клетки. Дальнейшее изучение ГВ показало, что все образцы не проявляют пирогенных свойств, не содержат примеси эндотоксина и на фоне значительной активации продукции оксида азота резко снижают уровень экспрессии аргиназы в 7 (Gen) и 2 (Активомин® и Gen-AgNP) раза (табл. 2). Причем при обработке Gen ингибция Arg1 была в 3 раза более выраженной, как по сравнению со митоген-стимулированным контролем, так и препаратом сравнения.

Заключение. Гуминовые вещества, выделенные из угля Gen, бионаноконпозиция на основе серебра Gen-AgNP и Активомин® не обладают цитотоксическими свойствами. Gen и Активомин® обладают собственной иммуотропной активностью за счет направленной экспрессии NO-синтазы и продукции нитритов. Функциональная поляризация макрофагов при обработке Gen определяется преимущественной направленностью метаболизма аргинина в антигенпрезентирующих клетках по классическому пути и, как следствие, способностью регулировать иммунный ответ Th1 и Th2 типов. Полученные данные позволяют рассматривать отечественный образец ГВ в качестве перспективного природного и низкотоксичного источника лекарственных средств, для разработки диагностических и терапевтических стратегий, ориентированных на макрофаги, для лечения множественных заболеваний, в частности фармакологических корректоров иммунного ответа.

Таблица 2. Влияние различных гуминовых веществ угля на баланс аргинина и пирогенность в перитонеальных макрофагах интактных мышей, ($X \pm m$)

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов, мкМ		Активность аргиназы, ЕА
		инкубация без полимиксина В	инкубация с полимиксином В	
Среда (контроль)	–	2,48±0,07	2,16±0,13	28,00±0,47
ЛПС (контроль 2)	0,1	36,63±0,62*	2,72±0,10▲	12,87±0,61*
Активомин®	10	4,86±0,11*●	4,19±0,10**◆	14,05±0,07*
Gen	10	45,30±0,51*●	41,02±0,54**◆	3,94±0,14*●
СНР-AgNP	10	2,66±0,06●	2,29±0,06	13,20±0,22*

Примечание. * – различия показателя с контролем 1 без полимиксина достоверны, ** – различия показателя с контролем 1 с полимиксином достоверны, ▲ – различия показателя с инкубацией каждого вещества без полимиксина, ● – различия показателя с контролем 2 без полимиксина достоверны, ◆ – различия показателя с контролем 2 с полимиксином достоверны. $p < 0,05$. $n = 5$.

Литература

1. Белоусов М.В., Ахмеджанов Р.Р., Зыкова М.В., Гурьев А.М., Юсубов М.С. Исследование гепатозащитных свойств нативных гуминовых кислот низинного торфа Томской области. Химико-фармакологический журнал. 2014;48(4): 28-31.
2. Бузлама А.В. Экспериментальное изучение фармакологических свойств солей гуминовых кислот: Автореф. дис. д-ра мед. наук. М.: ВГМА им.Н.Н. Бурденко. 2015. – 48 с.
3. Belska N.V., Guriev A.M., Danilets M.G., Trophimova E.S., Uchasova E.G., Ligatcheva A.A., Belousov M.V., Agarphonov V.I., Golovchenko V.G., Yusubov M.S., Belsky Y.P. Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates Th1 response. *International Immunopharmacology*. 2010;10(8): 933-942.
4. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaeili S.A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease *J. of Cell. Physiology*. 2018;233(9): 6425-6440.

КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА (III) С ГУМИНОВЫМИ И ПОЛИСАХАРИДНЫМИ МАКРОЛИГАНДАМИ ДЛЯ БОРЬБЫ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ

А.М. Жиркова^{1*}, А.Б. Воликов¹, Д.С. Волков¹, Е.Е. Буйко², М.В. Зыкова², И.В. Перминова¹

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

e-mail: Zhirkova_am@mail.ru

Ключевые слова: гуминовые вещества, железо (III), биодоступность, цитотоксичность. **Введение.** Более 2 миллиардов человек в мире страдают от анемии, наиболее распространённым типом которой является железодефицитная анемия (ЖДА) (Edison E.S. et al., 2008). По данным Росстата, несмотря на разнообразие выпускаемых препаратов, уровень заболеваемости не уменьшается. Для лечения ЖДА проводится заместительная терапия препаратами железа (II) — соли и комплексы низкомолекулярных кислот, и препаратами железа (III) — в основном, высокомолекулярные комплексы гидроксида железа (III) с полисахаридными лигандами (Стуклов Н.И., Семенова Е.Н., 2013). Препараты Fe(III) являются более безопасными ввиду медленной кинетики высвобождения железа в окисленной форме, однако биодоступность препаратов на основе солей Fe(II) выше примерно в 5 раз (Heinrich H.C. et al., 1983; Dietzfelbinger H., 1987). В связи с этим весьма актуальным является поиск новых лигандов, способных повысить биодоступность железа (III) для организма и снизить количество побочных реакций. Особый интерес в этом контексте представляют природные гуминовые вещества (ГВ). Гуминовые макролиганды содержат фенольные и карбоксильные фрагменты, обладают комплексообразующими и окислительно-восстановительными свойствами, что определяет перспективность их применения для получения биодоступных комплексов с Fe(III).

Цель. Получить водорастворимые соединения железа (III) и гуминовых веществ и исследовать их цитотоксичность и биодоступность.

Материалы и методы. В ходе работы были синтезированы комплексы железа (III) с гуминовыми кислотами угля (ГК) и фульвокислотами торфа (ФК), а также смешаннолигандные комплексы, доля

полимальтозата (ПМ) в которых составляла 50%. В качестве референсного препарата аналогично был синтезирован полимальтозат гидроксида железа (III). Для оценки биодоступности железа в составе полученных препаратах применяли феррозиновый метод. Суть которого состоит в моделировании высвобождения железа (III) из препаратов в клетке и восстановлении его до железа (II). Высвобождение проводили в кислой среде рабочего раствора, содержащего гидроксиламин в качестве восстанавливающего агента. Количество восстановленного железа измеряли спектрофотометрически по окраске комплекса с феррозином при длине волны 512 нм. Концентрация железа в исследуемых растворах составляла не более 89 мкмоль/л. Оценку цитотоксичности проводили на двух клеточных линиях — 3T3-L1 и HepG2 — методом МТТ-теста. Для этого готовили раствор МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) в PBS с концентрацией 5 мг/мл. Количество жизнеспособных клеток определяли по оптической плотности растворов формазана при длине волны 540 нм.

Результаты. Было синтезировано 5 препаратов: смешанный и монолигандный препараты гуматов гидроксида железа (III) с содержанием железа 12-13%; фульватов гидроксида железа (III) с содержанием железа 7-8% и полимальтозат гидроксида железа (III) – 6% от массы сухого препарата. Эти препараты были охарактеризованы методами рентгенофазового анализа (РФА) и просвечивающей электронной микроскопии. Дифрактограммы, подтвердили, что все образцы характеризуются низкой кристалличностью железосодержащей фазы, представленной в виде ферригидрита. Присутствуют фазы NaCl в фульватных и KCl в гуминовых образцах. По данным ПЭМ для препаратов наблюдаются дискретные наночастицы размером 2-5 нанометров.

По результатам проведения феррозинового исследования было показано, что наибольший процент содержания биодоступного железа в образце показали препараты смешаннолигандные препараты около 6%. В монолигандных препаратах процент биодоступного железа оказался ниже в пределах 1-4%. Результаты оценки цитотоксичности показали отсутствие выраженной цитотоксичности у всей линейки препаратов, не было достигнуто IC₅₀.

Заключение. Максимальная концентрация общего железа была достигнута в гуминовых препаратах. Железо в препаратах находится в форме нанодисперсного ферригидрита. Результаты оценки цитотоксичности показали отсутствие выраженной цитотоксичности у всей линейки препаратов, не было достигнуто IC₅₀. Наименьшую цитотоксичность показали фульвокислотные образцы. Результаты оценки биодоступности железа феррозиновым методом показали большую биодоступность железа в составе смешаннолигандных препаратов. Наиболее перспективным показал себя гуминово-полимальтозатный препарат гидроксида железа (III). Ввиду их нецитотоксичности и биодоступности железа можно говорить о перспективности дальнейшего изучения смешаннолигандных препаратов в качестве потенциальной активной фармацевтической субстанции» (АФС).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-25065

Литература

1. Здравоохранение в России. 2019: Стат.сб./Росстат. - М., 3-46 2019. 170 с.
2. Стулков Н.И., Семенова Е.Н. Лечение железодефицитной анемии. Что важнее: эффективность или переносимость? Существует ли оптимальное решение? *Журнал международной медицины.* 2013;1(2):47–55. 36.
3. Dietzfelbinger H. Bioavailability of bi- and trivalent oral iron preparations. Investigations of iron absorption by postabsorption serum iron concentrations curves. *Arzneimittelforschung.* 1987;37 (1A):107–12.
4. Edison E.S., Bajel A., Chandy M. Iron homeostasis: new players, newer insights. *European Journal of Haematology.* 2008;81(6):411–424.
5. Heinrich H.C., Fischer R., Gabbe E.E., Theobald N. Bioverfügbarkeit des in einem oralen Eisenpräparat enthaltenen Eisen (III)-Hydroxid-Dextrin-Komplexes. *Klinische Wochenschrift.* 1983;61(2):103–110.

ХИМИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В СОСТАВЕ ПИЩЕВЫХ ГУМИНОВЫХ ПРОДУКТОВ КОМПАНИИ ООО «НОВОЛЭНД»

М.В. Зыкова^{1*}, В.В. Иванов¹, К.А. Братишко^{1,2}, Е.Е. Буйко^{1,2}, Л.А. Логвинова¹, М.Г. Данилец³, А.А. Уфандеев¹, А.В. Цупко¹, Д.А. Михалёв¹, А.П. Зима¹, А.С. Горбунов⁴, Е.С. Трофимова³, А.А. Лигачева³, Т.В. Ласукова⁴, И.А. Передерина¹, Е.С. Рабцевич^{1,5}, М.В. Белоусов^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

²ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

³НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ, г. Томск, Россия

⁴НИИ кардиологии ТНИМЦ, г. Томск, Россия

⁵ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

e-mail: gmy2@rambler.ru

Ключевые слова: гуминовые вещества, пищевые продукты, биологическая активность, фармакологическая, микробиологическая и химическая безопасность.

Введение. Гуминовые вещества (ГВ) уже более 3000 лет используются в народной медицине и ветеринарии (Davies G., Ghabbour E.A., 1998), но впервые о них в научном мире заговорили в последнюю четверть 18 века, когда на страницах журнала «Chemische Annalen» появилась заметка немецкого естествоиспытателя Ф.К. Ахарда об опытах по выделению каустической содой из разных видов торфа химических соединений, которые позже (в 1786 г.) исследователи немецкой школы назвали гуминовыми веществами (от лат. «humus» почва) (Орлов Д.С. и др., 1997). С этого момента начался век изучения ГВ, а разработанная Ф.К. Ахардом схема экстракции ГВ применяется до сих пор в небольших модификациях, как в лабораторных условиях, так и в крупнотоннажном производстве различных гуминовых препаратов. Десятью годами позже французский химик Л.Н. Вокелен выделил аналогичные вещества из древесины старого вяза. Затем уже многие ученые со всего мира (И. Валлериус, М.В. Ломоносов, И.Г. Леман, В.Ф. Зуев, М.И. Афонин и мн. др.) стали интересоваться ГВ, и их работы послужили отправной точкой для современной гуминологии. Гуминовые вещества являются важным постоянным компонентом для существования жизни на Земле как необходимый структурный компонент всех обменных биосферных процессов, как наиболее естественная и термодинамически устойчивая форма сохранения органических веществ в биосфере (Орлов Д.С. и др. 1997). Они входят в состав различных биокостных тел: почвы, торфа, угля, мумиё, морских и озерных отложений, сланцев, и являются их главными компонентами. Гуминовые вещества также обнаружены в водах рек и озер, в воздухе, в бурых водорослях, моллюсках, грибах, чаге и др. В природе сложно найти подобные гуминовым веществам соединения, с таким же набором важных химических и биологических свойств, биосферных функций и народохозяйственным значением. Ввиду чего, ГВ являются весьма перспективными объектами исследования с позиций химии и биологии, в т.ч. как потенциально важные биологически активные вещества (БАВ) для поиска и разработки лекарственных средств и пищевых продуктов нового поколения (Зыкова М.В. и др., 2018). Весьма важным обстоятельством также является то, что получение ГВ представляет собой процесс, в котором используют нетоксичные вещества – щелочные растворы, кислоты, что целиком и полностью согласуется с требованиями «Зеленой химии» (Перминова И.В. и др., 2004). В современной литературе описана многопрофильная фармакологическая активность ГВ (Зыкова М.В. и др., 2018). При этом важно отметить, что многопрофильность фармакологической активности вовсе не свидетельствует о неспецифичности действия ГВ. Проявление ими плейотропных эффектов является результатом каскадных реакций в организме, обусловленных влиянием ГВ на его системы, активируемые окислительно-восстановительными, кислотнo-основными, макроколлоидными свойствами ГВ и их неспецифическим лиганд-рецепторным взаимодействием. Учитывая такие факты, как многопрофильность фармакологической активности и отсутствие строгого постоянства химического состава, сложным моментом в исследовании ГВ на сегодняшний день остается невозможность внеэкспериментального прогнозирования их биологической активности (Зыкова М.В. и др., 2018). В литературе существует достаточное много примеров того, что ГВ в каждом конкретном случае могут быть источниками новых разнообразных БАВ в зависимости от этиологии сырья, способа выделения, а также при их какой-либо специфической обработке. Именно этот факт и обуславливает необходимость постоянной биологической и химической стандартизации каждого конкретного образца ГВ. **Цель.** Провести химико-фармакологическое исследование, оценить химическую, микробиологическую и фармакологическую безопасность гуминовых веществ в составе пищевых гуминовых продуктов компании ООО «НовоЛэнд».

Материалы и методы. Объектом исследования являлась субстанция гуминовых веществ для применения в составе пищевых продуктов и биологически активных добавок (ООО «НовоЛэнд»). Микробиологическую чистоту устанавливали в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» (Емашанова С.В. и др., 2018). Потерю в массе при высушивании определяли по ОФС 1.2.1.0010.15 (способ 1), общую золу (А, %) по ОФС 1.2.2.2.0013.15, сульфатную золу по ОФС 1.2.2.2.0014.15 (Емашанова С.В. и др., 2018). Определение неорганического элементного состава, содержания тяжелых металлов и мышьяка (согласно ОФС 1.5.3.0009.15), радионуклидов (согласно ОФС 1.5.3.0001.15) (Емашанова С.В. и др., 2018) определяли методом ИСП-МС на квадрупольном масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой Agilent 7500сх (Agilent Technologies, США). Физико-химические параметры структуры ГВ изучали методами: электронной спектроскопии на спектрофотометре Unicо 2800 США), флуоресцентной спектроскопии на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США), инфракрасной спектроскопии на ИК-Фурье-спектрометре ФСМ 2201 (Инфраспек, Россия), элементного анализа на автоматическом элементном СНН-анализаторе Carlo Erba Strumentazione 1301 (Италия), ¹³С-ЯМР спектроскопии на ЯМР Фурье-спектрометре AVANCE 400 (400 мГц, Bruker, Германия), гель-хроматографии с использованием хроматографической системы Abimed, включающей ВЭЖХ насос, автосамплер, стеклянную колонку, спектрофотометрический УФ-детектор, плату АЦП для регистрации аналитического сигнала и регистрирующий компьютер, колонку заполняли гелем “Тоуорpearl” TSK HW-55S (Тосо-Наас, Япония) с диапазоном фракционирования 1-200 кДа по полидекстранам. Доклинические исследования проводили в соответствии с существующими правилами лабораторной практики, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти РФ (Приказ МЗ РФ № 199н). Оценку острой и субхронической токсичности БАВ для приема внутрь проводили согласно ГОСТ 32644-2014 «Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека (ГОСТ 32644-2014). Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности», ГОСТ 32641-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на

организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном пероральном поступлении вещества на грызунах, 28-дневный тест» (ГОСТ 32641-2014), а также согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией Миронова А.Н. (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств). Доклинические исследования по установлению способности веществ при введении в организм вызывать состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсibilизация) проводили согласно Руководству под редакцией Миронова А.Н. (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств): алергизирующие свойства были изучены с помощью метода накожных аппликаций на морских свинках и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах. Иммунофармакологические свойства ГВ оценивали по их влиянию на функциональные характеристики перитонеальных макрофагов мышей (активность NO-синтазы и аргиназы). Антиоксидантную и антирадикальную активность оценивали физико-химическими методами анализа и в культуре клеток: колориметрии с катион-радикалом ABTS^{•+}, со стабильным хромоген-радикаломДФПГ, с нитросиним тетразолием, с комплексом феррозин-Fe²⁺, ингибирования гидроксильного радикала и супероксид-анион-радикала, катодной вольтамперометрии. Оценку внутриклеточного распределения ГВ, способности связывать/подавлять продукцию активных форм кислорода внутри клеток, а также оценку уровня активных форм кислорода в культуре клеток, в том числе в присутствии добавленных в инкубационную среду прооксидантов (водород пероксида, трет-бутилгидропероксида, ионов Fe²⁺) проводили флуоресцентным методом в культуре клеток. Оценку цитотоксического действия проводили колориметрическим методом с использованием МТТ-теста в культуре клеток. Исследование антигипоксических свойств проводили на моделях нормобарической гиперкапнической гипоксии, тканевой гипоксии и гемической гипоксии. Исследование кардиотропной активности проводили на модели изолированного интактного миокарда по методу Лангендорфа по открытому контуру. Все процедуры с лабораторными животными (содержание, введение исследуемых веществ, умерщвление) были проведены в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях по ГОСТ 33216-2014 (ГОСТ 33216-2014).

Результаты. Установленная категория микробиологической чистоты раствора ГВ для применения в составе пищевых продуктов и биологически активных добавок (ООО «НовоЛэнд») соответствует установленной категории 3 Б микробиологической чистоты согласно ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»: общее число аэробных микроорганизмов – не более 10⁴ КОЕ в 1 мл; общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10² КОЕ в 1 мл; отсутствие *Escherichia coli* в 1 мл; отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 10 мл; отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 мл; энтеробактерий, устойчивых к желчи, не более 10² КОЕ в 1 мл. Содержание радионуклидов (согласно ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0001.15) соответствует норме, Cs-137 не более 400 Бк/кг; Sr-90 не более 200 Бк/кг. Содержание тяжелых металлов и мышьяка (согласно ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0009.15) соответствует норме, свинец не более 6,0 мг/кг; кадмий не более 1,0 мг/кг; ртуть не более 0,1 мг/кг; мышьяк не более 0,5 мг/кг. Данные параметры микробиологической и химической безопасности удовлетворяют требованиям Технического регламента Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» (с изменениями на 8 августа 2019 года). В составе изучаемой субстанции ГВ для применения в составе пищевых продуктов и биологически активных добавок (ООО «НовоЛэнд») установлено наличие 10-ти биогенных (жизненно необходимых, эссенциальных) элементов – это калий, кальций, магний, марганец, железо, медь, цинк, молибден, кобальт, селен. Результаты исследования ГВ методами ИК и ¹³C ЯМР спектроскопии позволили заключить о наличии в их структуре незамещенных и замещенных алифатических и ароматических фрагментов, карбоксильных групп, простых эфирных и сложно эфирных групп, карбонильных и хиноидных групп, спиртовых и фенольных групп, амидных и аминокгрупп. Данные высокоэффективной эксклюзионной хроматографии свидетельствуют о том, что изучаемые ГВ являются гидрофильным полидисперсным биополимером со средней молекулярной массой (30,2 кДа). По данным флуоресцентной спектроскопии также отмечена невысокая гетерогенность состава флуорофоров. Обобщенные результаты физико-химического анализа структуры изучаемых ГВ свидетельствуют о более высоком вкладе алифатических структур в их строение и о высоком содержании карбоксильных групп по данным элементного анализа, ИК и ¹³C ЯМР спектроскопии. Высокая гидрофильность и низкая гидрофобность изучаемых ГВ установлена методами элементного анализа, ¹³C ЯМР спектроскопии и эксклюзионной ВЭЖХ. Достаточно большой размер молекулы установлен методами электронной и флуоресцентной спектроскопии, эксклюзионной ВЭЖХ. Поликонденсированный (не моноядерный) характер ароматического ядра и высокая степень системы полисопряжения макромолекулы установлена по результатам электронной и флуоресцентной спектроскопии, элементного анализа. Доклинические токсикологические исследования направлены на выявление и оценку выраженности токсических эффектов, возникающих при взаимодействии БАВ с организмом лабораторных животных, и, согласно Федеральному закону от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», являются неотъемлемой частью исследований по доказательству безопасности (Федеральный закон № 61-ФЗ). Конечной целью токсикологических исследований является получение данных, достаточных для определения возможности и риска проведения клинических исследований БАВ. По результатам оценки токсичности при введении однократной дозы (острая токсичность) и оценки токсичности при введении повторных доз (28-дневная

токсичность) установлено, что изучаемые ГВ при внутрижелудочном введении не оказывают токсического влияния на органы и системы экспериментальных животных и относятся к V классу опасности – вещества малоопасные (ГОСТ 32644-2014). При оценке раздражающего действия и сенсибилизации установлено, что ГВ не обладают аллергизирующими свойствами. При токсикологических исследованиях на культуре клеток *in vitro* установлено, что изучаемые ГВ не обладают цитотоксическим действием в широком диапазоне доз. По результатам исследования внутриклеточного распределения изучаемых ГВ в культуре клеток установлена способность данных ГВ проникать через клеточные барьеры и накапливаться во внутриклеточном пространстве, преимущественно в перинуклеарном пространстве и ядре клеток. При изучении специфической фармакологической активности на различных экспериментальных моделях установлены антиоксидантные, иммуностропные, кардиотропные, цитопротекторные и антигипоксические свойства исследуемых ГВ. Отмечено очень важное и ценное для природных субстанций свойство – это способность ингибировать такие опасные для клеток кислородные радикалы, как гидроксильные радикалы (НО•) и супероксид-анион-радикалы (O₂^{-•}), поскольку данные радикалы способны обходить эндогенные системы антиоксидантной защиты организма. О высоком цитопротекторном потенциале исследуемых ГВ стимулировать/повышать антиоксидантную систему защиты клеток свидетельствуют результаты исследования способности данных ГВ после преинкубации клеток снижать в них уровень внутриклеточных активных форм кислорода после индукции окислительного стресса прооксидантами (трет-бутилгидропероксидом, водород пероксидом и ионами Fe²⁺). Таким образом, ГВ для применения в составе пищевых продуктов и биологически активных добавок (ООО «НовоЛэнд») являются безопасными и перспективными БАВ для разработки пищевых продуктов и биологически активных добавок, обладающих протекторными, антигипоксическими, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами.

Литература

1. ГОСТ 32644-2014 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности – М.: Стандартиформ, 2014. 26 с.
2. ГОСТ 32641-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном пероральном поступлении вещества на грызунах. 28-дневный тест». – М.: Стандартиформ, 2015. 16 с.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под. Общей редакцией Миронова А.Н. – М.: Гриф и К, 2013. 944 с.
4. ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. – Введ. 01.07.2016. – Москва: Стандартиформ, 2016. 9.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания, Том I. Введение. Общие положения. Методы анализа ЛС. Реактивы [Электронный ресурс] / С.В. Емашанова, О.Г. Потанина, Е.В. Буданова, В.В. Чистяков // Федеральная электронная медицинская библиотека. – 2018. – Режим доступа resource.rucml.ru / feml / pharmacopia / 14_1/HTML/121/index.
6. Зыкова М.В., Логвинова Л.А., Белоусов М.В. Высокомолекулярные соединения гуминовой природы – перспективные биологически активные соединения. *Традиционная медицина*. 2018;2(53):27-38.
7. Орлов Д.С. Гуминовые вещества в биосфере. *Соровский образовательный журнал*. 1997;2: 56-63.
8. Перминова И.В., Жилин Д.М. Гуминовые вещества в контексте зеленой химии. Зеленая химия в России; под ред. В.В. Лунина, П. Тундо, Е.С. Локтевой. Москва: МГУ. 2004.146-162.
9. Приказ МЗ РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». – М.: Стандартиформ, 2016. 9 с.
10. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [Элект. ресурс]. – URL: <http://ivo.garant.ru/#/document/12174909/paragraph/25019/doclist/N%2061-%D0%A4%D0%97:0/> (дата обращения: 10.08.2019).
11. Davies G., Ghabbour E.A. Humic substances, structures, properties and uses. The Royal society of chemistry: Cambridge. 1998. 260 p.

КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НИЗИННОГО ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНОГО ВИДАТОРФА

Л.А. Логвинова^{1*}, М.В. Зыкова¹, Т.В. Ласукова², А.А. Госюхина³, Т.А. Замощина^{1,3}, М.В. Белоусов¹
¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия
²ФГБОУ ВО «Томский государственный педагогический университет», г. Томск, Россия
³ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства», г. Томск, Россия
e-mail: ludmila_logvinova@mail.ru

Ключевые слова: гуминовые кислоты, антиоксиданты, актопротекторы.

Введение. Сочетанное влияние неблагоприятных социально-экономических условий, нерациональное питание, вредные привычки, дисбаланс режима труда и отдыха, антропогенное загрязнение биосферы-предпосылки для возникновения, прогрессирования и хронизации заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы. Пандемический характер среди всех нозологий носят сердечно-сосудистые заболевания, основная опасность которых связана с полиорганным поражением. Для снижения риска осложнений от сердечно-сосудистых заболеваний и предотвращения фатальных событий, тактика ведения такой группы пациентов заключается в проведении комбинированной антигипертензивной, гиполипидемической, противодиабетической и антиагрегантной терапии. Ввиду этого, назначения врачей включают лекарственные препараты с различным патогенетическим механизмом действия. Комбинированная терапия, с одной стороны, обеспечивает полноценную защиту органов-мишеней, с другой, регулярный предписанный прием лекарственных препаратов приводит к росту нежелательных лекарственных реакций и, как следствие, требует титрование дозы или отмены препарата (Маршалов Д. В. И др., 2008). Лекарственные препараты растительного происхождения, воздействующие на организм целым комплексом эволюционно сформировавшихся биологически активных веществ, во многом лишены недостатков синтетических биологически активных молекул (Wu P. et al., 2017). Поэтому поиск веществ природного происхождения с кардиотропным эффектом представляет огромный интерес.

Цель. изучить влияние гуминовых кислот (ГК) низинного древесно-травяного вида торфа на показатели работы интактного миокарда: конечное диастолическое давление (КДД) и давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ) в концентрации 0,1 мг/мл в условиях ишемии-реперфузии. Установить возможные механизмы протекторного действия ГК: антиоксидантную активность и актопротекторное действие.

Материалы и методы. ГК были выделены 0,1 моль/л раствором NaOH из низинного древесно-травяного вида торфа, заготовленного на месторождении «Таган» Томской области, по методике, описанной ранее (Зыкова М.В. и др., 2017б). Готовили раствор ГК в концентрации 0,1 мг/мл (растворитель раствор Кребса-Хензелята). Ретроградную перфузию сердечной мышцы осуществляли по методу Лангендорфа по открытому контуру. Функциональную активность миокарда в условиях ишемии-реперфузии устанавливали по показателям КДД (мм. рт. ст.) и ДРЛЖ мм. рт. ст.) (Зыкова М.В. и др., 2017а). Исследование антиоксидантных эффектов осуществляли физико-химическими методами (колориметрия с ДФПГ, катодная вольтамперометрия, спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), колориметрия с феррозином) (Зыкова М.В. и др., 2018). Актопротекторную активность исследовали в тесте «принудительное плавание» (с грузом) и биохимически (уровень лактата в плазме) (Замощина Т.А., и др. 2020).

Результаты. Установлено, что применение образца ГК в период, предшествующий ишемии-реперфузии, способствовало повышению устойчивости изолированного миокарда к данным патологическим условиям. Это подтверждалось восстановлением его сократимости (уменьшалось КДД и ДРЛЖ). Одним из возможных механизмов реализации кардиопротекторного действия явилась активация гуминовыми кислотами конститутивного фермента – эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и, как следствие, снижение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (в эксперименте с применением неселективного ингибитора активности NOS L-NAME кардиопротекция исчезала) (табл. 1).

Таблица 1. Влияние блокатора NO-синтазы L-NAME и ГК на показатели сократимости изолированного сердца

Давление, развиваемое левым желудочком, мм рт. ст.					Конечное диастолическое давление, мм рт. ст.			
Экспозиция	Контроль, n=14	Образец ГК, 0,1 мг/мл	L-NAME, 100 мкМ/л	Образец ГК + L-NAME	Контроль, n=14	Образец ГК	L-NAME	Образец ГК + L-NAME
Перфузия, мин								
20 мин	91±5,8	93±3,2	92±2,2	90,9±6,1	15,6±0,3	15,3±0,3	15,7±0,6	14±0,3
10 мин	90,9±4	¹ 70,8±4	87±5,2	90,8±6,9	13,6±0,2	¹ 12,4±0,5	14,7±0,8	13,4±0,9
Реперфузия, мин								
5 мин	³ 10,3±2,7	^{1,3} 37,4±11	³ 10,2±3	³ 12,2±4,4	³ 79,2±7,1	³ 65,8±1,4	³ 79±3,6	³ 77±3,6
15 мин	³ 18,5±2,4	^{1,3} 45,3±9	³ 16,5±2,4	³ 19,5±3,8	³ 75,8±5,4	^{1,3} 60±7,1	76±6,6	³ 74±6,3
30 мин	³ 25,7±3	³ 37,7±4,2	³ 20,7±3	³ 28,4±3,5	³ 64±8,2	³ 59,8±4,5	³ 65,9±5	³ 62,9±8

Примечания

¹ Достоверно относительно аналогичных значений в контроле $p < 0,05$

² Достоверно относительно аналогичных значений в контроле $p < 0,01$

³ Достоверно относительно исходных значений в группе $p < 0,05$

Цитопротекторное действие гуминовых кислот может быть также ассоциировано с высокими антиоксидантными (АО) свойствами. По данным вольтамперометрии АО активность ГК связана с участием фенольных и хиноидных фрагментов молекул в процессе восстановления стабильного аллотропа – триплетного кислорода. По результатам колориметрии с хромоген-радикалом ДФПГ доказана высокая антирадикальная активность (АРА) за счет восстановительных свойств фенольных гидроксиллов (АРА носит дозозависимый характер и при концентрации ГК 100 мкг/мл сопоставима с АРА дигидрокверцетина в той же концентрации (73,21 % и 95,21 %, соответственно) (рис. 1). В тесте с феррозином АРА ГК связана с

хелатирующим эффектом в отношении ионов Fe^{2+} (рисунок 2). По данным ЭПР-спектроскопии предполагаемым механизмом АРА ГК является их способность выполнять роль «ловушек» свободных радикалов, на основании сходства ЭПР-параметров образца ГК свободного радикала семихинонного типа. Исследование актопротекторной активности показало, что применение раствора ГК и последующее предъявление крысам физической нагрузки (тест принудительное плавание до полного утомления) способствовало повышению их работоспособности (табл. 2), не изменяя при этом уровень лактата в их крови.

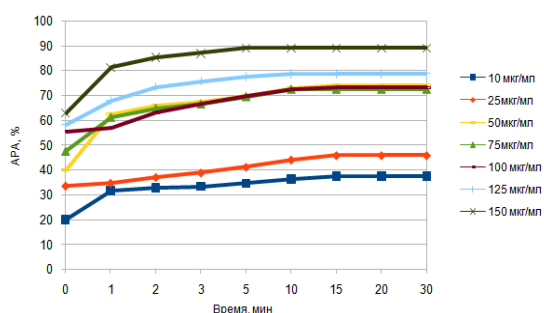


Рис. 1. Кинетическая кривая реакции ДФП (АРА, %) с ГК в концентрациях 10; 25; 50; 75; 100; 125 и 150 мкг/мл.

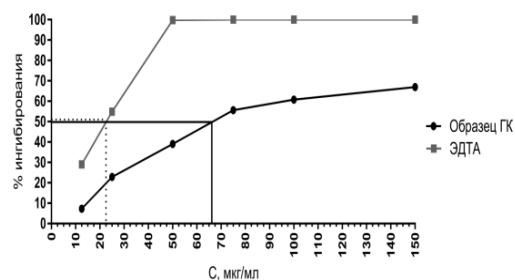


Рис. 2. Кинетические кривые реакции ингибирования гуминовыми кислотами образования комплекса феррозин- Fe^{2+}

Таблица 2. Влияние ГК на динамику работоспособности крыс в плавательном тесте

Группа животных	Интактная (n = 10)	Контрольная группа № 1 (n = 10)	Контрольная группа № 2 (n = 10)	Опытная группа (n = 10)
Дни плавания	Продолжительность плавания (с), 1Me (2Q_1 ; 3Q_3)			
1	Не плавали	38 (34;49)	64 (55;84) $p=0,038$	70 (57;95) $p=0,005$
2		46 (45;57) $^4p_0=0,01$	61 (80;68)	76 (57;195) $p=0,005$
3		53 (44;67) $^4p_0=0,007$	65 (62;76)	101 (66;114) $^4p_0=0,02$, $p_1=0,05$
4		52 (37;58) $^4p_0=0,007$	69 (57;87)	97 (77;133) $^4p_0=0,007$, $p_1=0,05$
5		47 (40;68) $^4p_0=0,04$	63 (41;71)	97 (61;113) $^4p_0=0,03$, $^5p_1=0,04$

Примечания: 1Me – медиана; 2Q_1 – квантиль, 25 %; 3Q_3 – квантиль, 75 %;
 4p_0 – уровень статистической значимости к первому предъявлению плавательного теста внутри соответствующей группы; 5p_1 – уровень статистической значимости к соответствующей контрольной группы

Заключение. Гуминовые кислоты обладают кардиопротекторными свойствами в условиях ишемии-реперфузии. Возможными механизмами действия являются: активация eNOS, проявление антиоксидантной и актопротекторной активности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 18-43-700014 p_a, 2018 г.

Литература

1. Замощина Т.А., Зыкова М.В., Гостюхина А.А., Логвинова Л.А., Зайцев К.В., Ласукова Т.В., Светлик М.В., Курцевич Е.А., Абдулкина Н.Г., Белоусов М.В., Дыгай А.М. Влияние гуминовых кислот низинного торфа на работоспособность крыс в плавательном тесте с нагрузкой и уровни кортикостерона и лактата в сыворотке крови. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2020;169(6):673-676.
2. Зыкова М.В., Белоусов М.В., Ласукова Т.В., Горбунов А.С., Логвинова Л.А., Дыгай А.М. Кардиоваскулярные эффекты высокомолекулярных соединений гуминовой природы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2017а;163(2):167-170.
3. Зыкова М.В., Логвинова Л.А., Кривошеков С.В., Воронова О.А., Ласукова Т.В., Братишко К.А., Жолобова Г.А., Голубина О.А., Передерина И.А., Дрыгунова Л.А., Тверякова Е.Н., Белоусов М.В.

- Антиоксидантная активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы. *Химия растительного сырья*. 2018;3:239-250.
4. Зыкова М.В., Трофимова Е.С., Кривошеков С.В., Лигачёва А.А., Данилец М.Г., Логвинова Л.А., Жолобова Г.А., Прищепова О.Ф., Юсубов М.С., Белоусов М.В. Спектральные параметры и биологическая активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017;16(1):36-49.
 5. Маршалов Д. В., Петренко А. П., Глушач И. А. Реперфузионный синдром: понятие, определение, классификация. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2008;3:67-72. Wu P., Li F., Zhang J., Yang B., Ji Zh., Chen W. Phytochemical compositions of extract from peel of hawthorn fruit, and its antioxidant capacity, cell growth inhibition, and acetylcholinesterase inhibitory activity. *BMC Complement Altern Med*.2017;17(1):151-158.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ БИОНАНОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Д.А. Михалёв^{1*}, М.В. Зыкова¹, Е.Е. Буйко^{1,2}, В.В. Иванов¹, К.А. Братишко^{1,2},
А.В. Цупко¹, И.В. Перминова³, М.В. Белоусов^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

²ФГАУ ВО Национальный исследовательский Томский Политехнический Университет, г. Томск, Россия

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, Россия

e-mail: diman021999@gmail.com

Ключевые слова: гуминовые вещества, наночастицы серебра, цитотоксичность, клеточные культуры, нейтральный красный.

Введение. Большую озабоченность в обществе вызывает проблема лечения хронических ран из-за высокой частоты развития язв и пролежней. Большие надежды в медицине возлагаются на применение новых бионаноматериалов, обладающих как собственной биологической активностью, так и способных осуществлять доставку терапевтических агентов. В последнее время всё больше внимания стали уделять природным полимерам, включая целлюлозу, хитозан и альгинаты, в качестве безопасной и экономически эффективной матрицы для синтеза ранозаживляющих агентов. Так, например, описаны наноконструкции Ag/Zn, ковалентно привитые к органической матрице (Wang Y. et al., 2019) и показана их способность подавлять рост как грамм+, так и грамм- микроорганизмов, их местное применение уменьшает возмозжность негативного влияния на иммунную систему и токсического влияния на органы, что значительно повышает безопасность данных соединений. Использование перевязочных материалов с различными композициями серебра в работе (Xuan X. et al., 2019) также позиционируется с их антибактериальным действием и используется для лечения острых асептических и инфицированных ран. Но отмечается, что "серебряная повязка" без биологически активного функционального элемента обычно замедляет процесс заживления ран на поздних стадиях, в отличие от использования хитозанового гидрогеля, содержащего серебро, действующим в комплексе с основным фактором роста фибробластов (bFGF). В связи с чем, для гуминовых веществ (ГВ) открываются большие перспективы для использования в качестве базовой матрицы в синтезе бионаноматериалов с улучшенным профилем безопасности, учитывая то, что наночастицы тяжелых металлов обладают высокой токсичностью. Гуминовые вещества по своей химической природе представляют собой сложные молекулярные ансамбли с широким спектром биологической активности, поэтому, создание бионаноматериалов на основе ГВ, содержащих наночастицы серебра и цинка представляет сегодня большой интерес для лечения бактериальных инфекций и для ранозаживления.

Цель. Исследовать профиль безопасности новых бионаноматериалов на основе гуминовых веществ и наночастиц серебра как их цитотоксическое действие в культуре клеток с использованием метода для оценки жизнеспособности клеток с помощью нейтрального красного красителя в диапазоне концентраций.

Материалы и методы. Цитотоксическое действие 8 различных исходных образцов ГВ (таблица 1) и образцов наночастиц серебра, ультрадиспергированных в соответствующих матрицах ГВ (ГВ-AgNPs) исследовали колориметрическим методом на культурах клеток нормальных фибробластов (3T3-L1) и гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) in vitro с использованием метода для оценки жизнеспособности клеток с помощью нейтрального красного красителя в диапазоне концентраций от 7,8 мкг/мл до 1000 мкг/мл. Метод основан на эндцитозе прижизненного красителя нейтрального красного и показывает функцию лизосом живых клеток, оптическую плотность регистрировали при длине волны 540 нм, которая пропорциональна количеству метаболически активных жизнеспособных клеток. Этот метод является стандартным методом оценки цитотоксичности природных веществ с восстанавливающими свойствами (Borenfreund E., Puerner J.A., 1985; Repetto G. et al., 2008). Для сравнения использовали препарат коллоидного серебра «Протаргол». Для всех данных применяли описательную статистику, для образцов ГВ-AgNPs также рассчитывали значения IC₅₀. Для выявления достоверности различий в случае множественных сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) для

группового сравнения, затем критерий Даннета для попарных сравнений с контрольной группой. Достоверность различий считали значимой при $p < 0,05$.

Таблица 1. Экспериментальные образцы бионаноматериалов на основе гуминовых веществ и наночастиц серебра

Шифр образца ГВ (базовой матрицы)	Описание образцов ГВ	Шифр образца ГВ-AgNPs (с наночастицами серебра)
СНР-К	Гуминовые кислоты угля «Powhumus» (Гуминтех, Германия)	СНР-AgNPs
FA	Фульвокислоты торфа «Fulvagra» (Гуминтех, Германия)	FA-AgNPs
СНС-К	Гуминовые вещества угля (Сахалинские гуматы, Россия)	СНС-AgNPs
СНІ-К	Гуминовые вещества угля (Иркутские гуматы, Россия)	СНІ-AgNPs
СНЕ-К	Гуминовые вещества угля (Генезис, Россия)	СНЕ-AgNPs
Peat1	Гуминовые кислоты верхового ангустифолиум торфа (Томская область)	Peat1-AgNPs
Peat2	Гуминовые кислоты верхового сфагново-мочажинного торфа (Томская область)	Peat2-AgNPs
РНФ-Т3	Нефракционированный препарат из верхового торфа (Россия)	РНФ-Т3-AgNPs

Результаты. При изучении цитотоксических свойств образцов исходных матриц ГВ, мы установили, что все они не обладают значимыми токсическими свойствами в культуре клеток. Токсические эффекты проявлялись только в концентрациях 500 и 1000 мкг/мл для большинства тестируемых субстанций исходных матриц ГВ, поэтому значения IC_{50} не были достигнуты в исследуемом диапазоне концентраций для всех клеточных линий кроме двух образцов ГК торфа Peat1 (250 мкг/мл) и Peat2 (125 мкг/мл). При изучении цитотоксических свойств препарата сравнения «Протаргол», содержащего коллоидное серебро, мы установили значения IC_{50} 165,7±17,6 мкг/мл и 517,8±71,9 мкг/мл для 3Т3-L1 и НерG2, соответственно. Близкими значениями величины цитотоксических эффектов, как и у препарата сравнения «Протаргол», имел образец СНР-AgNPs (169,4±4,9 мкг/мл и 498,9±74,7 мкг/мл для 3Т3-L1 и НерG2, соответственно). Затем по уменьшению значений цитотоксических эффектов находятся два образца с близкими результатами: Peat2-AgNPs (241,0±9,8 мкг/мл и 360,4±2,9 мкг/мл для 3Т3-L1 и НерG2, соответственно) и FA-AgNPs (274,2±26,0 мкг/мл и 465,9±12,8 мкг/мл для 3Т3-L1 и НерG2, соответственно). Затем в данном ряду по снижению цитотоксичности располагались образцы СНС-AgNPs (325,7±24,0 мкг/мл и 407,6±2,6 мкг/мл для 3Т3-L1 и НерG2, соответственно) и СНІ-AgNPs (478,1±31,9 мкг/мл и 719,4±17,9 мкг/мл для 3Т3-L1 и НерG2, соответственно). Самыми не цитотоксичными в ряду тестируемых веществ были образцы СНЕ-AgNPs (625,0±10,2 мкг/мл и 847,5±27,3 мкг/мл для 3Т3-L1 и НерG2, соответственно), Peat1-AgNPs (636,0±44,5 мкг/мл и 1281,3±63,8 мкг/мл для 3Т3-L1 и НерG2, соответственно) и РНФ-Т3-AgNPs (839,7±16,3 мкг/мл и 536,0±12,9 мкг/мл для 3Т3-L1 и НерG2, соответственно). Также отмечено, что более высокий цитотоксический эффект относительно культуры клеток нормальных фибробластов (3Т3-L1) установлен для образца СНР-AgNPs, что сопоставимо и не превышает цитотоксических эффектов эталонного препарата сравнения «Протаргол». Наименьшее значение цитотоксичности на данной клеточной культуре отмечено для образца РНФ-Т3-AgNPs, что показывает цитотоксичность меньше в 5 раз по сравнению с препаратом «Протаргол». Более высокий цитотоксический эффект относительно культуры клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека (НерG2) установлен для образца Peat2-AgNPs, что превышает цитотоксический эффект препарата сравнения в 1,4 раза. Также более цитотоксичными относительно культуры клеток НерG2 были еще три экспериментальных образца СНР-AgNPs, FA-AgNPs и СНС-AgNPs. Полученные результаты показывают, что раковые клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека в сравнении с нормальными клетками фибробластов, являются более устойчивыми к токсическому действию некоторых субстанций. Наименьшее значение цитотоксичности на данной клеточной культуре отмечено для образца Peat1-AgNPs, что показывает цитотоксичность меньше в 2,5 раз по сравнению с препаратом сравнения.

Заключение. Таким образом, можно сделать вывод, что ГВ при ультрадиспергировании в их матрице наночастиц серебра, способствуют улучшению профиля безопасности токсического действия серебра как тяжелого металла. В культуре клеток нормальных фибробластов (3Т3-L1) все тестируемые образцы AgNP/ГВ показали меньшую цитотоксичность в сравнении с препаратом коллоидного серебра «Протаргол». Более высокий профиль безопасности в тестах на обеих клеточных культурах имеют образцы: РНФ-Т3-AgNPs, Peat1-AgNPs, СНЕ-AgNPs и СНІ-AgNPs.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-65-47052).

Литература

1. Borenfreund E., Puerner J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*. 1985;24:119-124.
2. Repetto G., del Peso A., Zurita J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. 2008;3:1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
3. Wang Y., Shi L., Wu H., Li Q., Hu W., Zhang Z., Jiang Z. Graphene Oxide–IPDI–Ag/ZnO@Hydroxypropyl Cellulose Nanocomposite Films for Biological Wound-Dressing Applications. *ACS Omega*. 2019;4(13):15373–15381.
4. Xuan X., Zhou Y., Chen A. Silver crosslinked injectable bFGF-eluting supramolecular hydrogels speed up infected wound healing. *Journal of Materials Chemistry B*. 2019; 8(7):1359-1370.

РАЗРАБОТКА НАПИТКА БЕЗАЛКОГОЛЬНОГО НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ И ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

А.В.Цупко^{1*}, М.В. Зыкова¹, Л.А. Логвинова¹, Д.А. Михалёв¹, М.В.Белоусов^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

²ФГАУ ВО Национальный исследовательский Томский Политехнический Университет, г. Томск, Россия

e-mail: frikins@my.com

Ключевые слова: гуминовые вещества, гуминовые кислоты, торф, безалкогольный напиток.

Введение. Важной частью подготовки специалистов в вузах, является формирование понимания и практики здорового образа жизни – основой работоспособности любого человека. Но, современный образ жизни студентов имеет тенденцию к ухудшению состояния здоровья в течение обучения (Магомедова М.А., Касимова К.А., 2012; Каскаева Д.С., Дашиева Е.Б., 2016). Лидирующими патологиями, распространенными среди студентов, являются офтальмологические нарушения, заболевания нервной системы, ЖКТ и опорно-двигательного аппарата, лор-патологии. По разным данным, процент заболеваний ЖКТ среди студентов составляет от 9 до 21% (в зависимости от курса обучения), заболеваний нервной системы – от 1 до 7%, эндокринные патологии – от 4 до 36% (Магомедова М.А., Касимова К.А., 2012; Медведкова Н.И. и др., 2012; Самылина И.А., 2013; Влощинский П.Е. и др., 2015; Каскаева Д.С., Дашиева Е.Б., 2016). По мнению ВОЗ, состояние здоровья человека зависит от нескольких факторов – образ жизни (на 50-52%), генетика (20-22%), экология (18-20%), структура здравоохранения (7-12%). Студенты подвержены по большей части нарушениям, которые берут свое начало в неправильном образе жизни – нерегулярное, несбалансированное питание, стрессы и отсутствие навыков работы с ними (Магомедова М.А., Касимова К.А., 2012). В связи с чем, разработка нутрицевтического продукта, улучшающего качество жизни студентов в условиях хронического стресса и недосыпания, а также несбалансированного питания (fast food, junk food) и питания «на ходу», является актуальной современной задачей.

Цель. Целью является разработка продукта функционального питания, который будет по своему составу, свойствам и ценовой политике отвечать потребностям современных студентов.

Материалы и методы. Основой безалкогольного напитка является водный раствор гуминовых кислот (ГК) из низинного древесно-травяного торфа Томской области, физико-химические и фармакологические свойства которых ранее были глубоко и всесторонне изучены (Логвинова Л.А., 2019). Вторым компонентом безалкогольного напитка является комплексный водный экстракт из лекарственного растительного сырья, заготовленного компанией ООО «Вистерра» в Алтайском крае. Составными частями растительного сбора являются: корневища с корнями родиолы розовой, трава лабазника вязолистного, цветки бессмертника песчаного, плоды фенхеля. Готовый продукт подвергали стандартным испытаниям, согласно ГФ XIV издания: «Микробиологическая чистота», «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой). Проводили также стандартизацию готового продукта по основным группам действующих веществ, согласно ГФ XIV издания: флавоноидам, дубильным веществам, гуминовым кислотам, с использованием спектрофотометра ПЭ-5400 УФ (Россия).

Результаты. Анализ научной литературы позволил нам разработать компонентный состав безалкогольного функционального напитка, с учетом желаемых фармакологических эффектов. Комплексный водный экстракт из лекарственного растительного сырья имеет хорошо сочетаемый состав. В частности, экстракт из корневищ с корнями родиолы розовой оказывает адаптогенное и психостимулирующее действие, способствует профилактики неврастений, борется с синдромом хронической усталости и эндокринными нарушениями, стимулирует утилизацию глюкозы (Барнаулов О.Д., 1999; Барнаулов О.Д., 2001; Самылина И.А., 2013). Экстракт из травы лабазника вязолистного оказывает адаптогенное, противовоспалительное, стимулирующее регенерацию тканей действие, очень эффективен в качестве профилактического средства в развитии гастрита и дуоденита. Экстракт из цветков бессмертника песчаного проявляет желчегонное – холеретическое и холекинетическое действие, а также гепатопротекторное и антиоксидантное действие, на протяжении многих лет используется для профилактики холециститов, холангитов, а также как средство для снижения токсической нагрузки на печень). Плоды фенхеля обладают спазмолитическим и противовоспалительным действием, используются

для профилактики колитов и синдрома раздраженного кишечника (Барнаулов О.Д., 1999; Самылина И.А., 2013). Базовым компонентом безалкогольного напитка является водный раствор ГК из низинного древесно-травяного торфа Томской области, которые в эксперименте (Логвинова Л.А., 2019) показали высокую эффективность как средство обладающее, кардиотропным, иммулотропным, адаптогенным и антиоксидантным действием в лечении и профилактике стресс-индуцированных нарушений функции иммунитета, сезонных респираторных заболеваний, психогенных нарушений сердечной деятельности и др. В стандартных фармакопейных испытаниях готового продукта установлены: соответствие продукта по микробиологической чистоте категории 3Б согласно ГФ XIV издания (ОФС.1.2.4.0002.18); соответствие продукта параметрам безопасности по содержанию тяжелых металлов и мышьяка, согласно ГФ XIV издания (ОФС.1.5.3.0009.15). Содержание флавоноидов составило 40 мг/мл, содержание дубильных веществ – 150 мг/мл, содержание ГК – 20 мг/мл.

Заключение. Разработан перспективный коммерческий продукт функционального питания на основе лекарственного растительного сырья и гуминовых кислот, ориентированный на студенческое сообщество, обеспечивающий иммуномодулирующее, адаптогенное, психостимулирующее, кардиопротекторное, гастропротекторное, гепатопротекторное, спазмолитическое действие.

Литература

1. Барнаулов О.Д. Введение в фитотерапию. / О.Д. Барнаулов. – СПб: Лань, 1999. 158 с.
2. Барнаулов О.Д. Женьшень и другие адаптогены. Лекции по фитотерапии. / О.Д. Барнаулов. – СПб: Элби, 2001. 138 с.
3. Влощинский П.Е., Загайнова В.Ю., Румынская В.С., Сулова В.Е. Постпрандиальная гликемия типичного студенческого перекуса. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2015;4.
4. Казимова В.М., Алиева Р.Х., Казимов Мирза Агабаба Оглы Особенности заболеваемости студентов медицинского университета. *ЗНУСО*. 2018;5(302):26-29.
5. Каскаева Д.С., Дашиева Е.Б. Анализ заболеваемости студентов- выпускников красноярского государственного медицинского университета. *IN SITU*. 2016;12.
6. Логвинова Л.А.; дисс. ... канд. фарм. наук / Л.А. Логвинова. – Томск, 2019. 243 с.
7. Магомедова М.А., Касимова К.А. Общее состояние здоровья студентов (на примере БХФ ДГПУ). *Известия ДГПУ. Естественные и точные науки*. 2012;3.
8. Медведкова Н.И., Медведков В.Д., Аширова С.В. Заболеваемость студентов и пути ее снижения. *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2012. №4:39-40.
9. Самылина И.А. Фармакогнозия: учебник / Самылина И.А., Яковлев Г.П. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 976 с.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЦИКЛОСИВЕРСИОЗИДА F ИЗ РАСТЕНИЯ
ASTRAGALUS PTEROCEPHALUS МЕТОДОМ HPLC-ELSD

М.А. Агзамова^{1*}, Fatih Goger², А.А. Жанибеков¹, Gulmira Ozek²

¹Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова, г. Ташкент, Узбекистан

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department Medicinal Plant, Drug and Scientific Research Center, Eskishehir, Turkey

e-mail: agzamova_manzura@mail.ru

Ключевые слова: Циклосиверсиозид F, *Astragalus pteroccephalus*, HPLC, кардиопротекторная активность.

Введение. Флора Узбекистана насчитывает 275 видов растений обширного рода *Astragalus* (Коровин Е.Р., Введенский А.И., 1955) семейства *Fabaceae* и около 650 распространены в странах Центральной Азии. Растения рода *Astragalus* издревле применяют в народной медицине. В литературе имеется информация о практическом применении биологически активных соединений, содержащихся в растениях рода Астрagal. Особое место отводится тритерпеноидам циклоартанового ряда. Заболевания сердечно-сосудистой системы в мире занимают первое место, как по распространенности, так и по угрозе для жизни. Большинство этих заболеваний (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда) сопровождается нарушениями обмена веществ в миокарде и в сосудах. Для лечения больных с сердечными патологиями применяют лекарственные средства – кардиопротекторы, которые способствуют нормализации нарушенных процессов обмена веществ в организме. Целенаправленные исследования компонентного состава растений флоры Узбекистана и создание на их основе природных лекарственных средств для населения и медицины является актуальной задачей. Циклоартановые гликозиды, обладают кардиотонической активностью, гипотензивным, диуретическим, седативным, анальгетическим, гиполипидемическим действиями, не обладают кумулятивными свойствами и не токсичны, имея большую широту фармакологического действия. Циклосиверсиозид F, выделенный из растительного сырья, показал кардиопротекторную активность.

Цель. Разработка метода количественного определения тритерпеноида циклоартанового ряда, циклосиверсиозид F в сумме экстрактивных веществ, полученных при экстракции растения *Astragalus pteroccephalus* Bunge.

Материалы и методы. Растительное сырье *A. pteroccephalus* было заготовлено в период цветения в Сурхандарьинской области Узбекистана. Измельченное воздушно-сухое сырье (4 кг) тщательно экстрагировали 70%-ным этиловым спиртом пятикратно. Воздушно-сухое сырье *A. pteroccephalus* экстрагировали при комнатной температуре 70% - ным спиртовым раствором. Растворитель отгоняли, сумму экстрактивных веществ сгущали до 1 л, разбавляли равным объемом воды и отфильтровывали для удаления липофильных веществ. Далее проводили обработку водного экстракта неполярными растворителями: хлороформом, этилацетатом и *n*-бутанолом, последовательно извлекая сумму экстрактивных веществ методом жидкость-жидкостной экстракции. Использован прибор для анализа: Shimadzu CTO-10AS VP, модуль связи CBM-20A HPLC, насос для подачи растворителя: LC-20AT, пробоотборник: SIL-20A, детектор: ELSD-LT II, колонка: Nucleosil C₁₈, 250×4.6 mm, 5 μm, Macherey-Nagel. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Приготовления испытуемого раствора. К навеске 2.5 мг сухого экстракта добавляли 1 мл метанола. При растворении экстракта получен испытуемый раствор. Приготовление стандартного раствора. 1.5 мг циклосиверсиозид F растворяли в 0.5 мл метанола и разбавляли тем же растворителем, чтобы получить растворы 0.3, 0.45 и 0.6 мг / мл.

Результаты. В лаборатории химии гликозидов Института химии растительных веществ АН Р Уз заложены основы для исследований биологически активных сапонинов. Фитохимические исследования вида *A. pteroccephalus* Bunge привели к выделению тритерпеноида циклоартанового ряда циклосиверсиозид F (рис. 1) (Агзамова М.А., Исаев И.М., 2016), который показал в экспериментах на животных кардиопротекторную активность (Хушбакова З.А. и др., 1994; Царук А.В. и др., 2007).

Установление структуры циклосиверсиозид F провели химическими и физико-химическими методами: определением элементного состава, температуры плавления. Разделение индивидуального гликозида провели хроматографическими методами анализа (Агзамова М.А. и др., 2021). Методами ИК, ¹H и ¹³C ЯМР, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, ROESY получены данные, которые позволили идентифицировать химическую структуру. Разработан метод количественного определения циклосиверсиозид F ВЭЖХ с испарительным детектором светорассеяния ELSD в образцах суммы экстрактивных веществ, полученных при выделении гликозида: этанольном экстракте, полученных при элюировании бутанолом и этилацетатом из водного маточника растительного сырья.

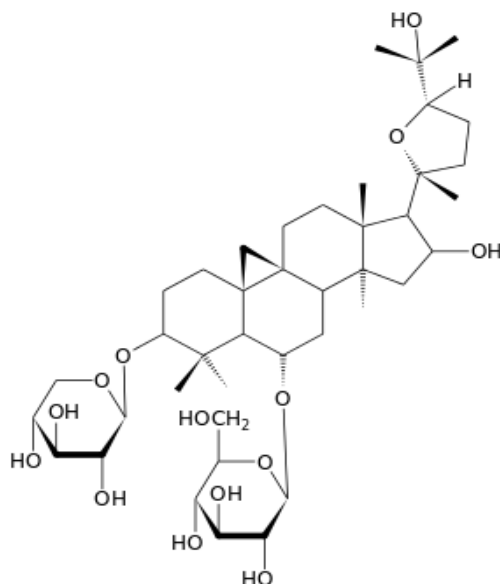


Рис 1. Структура циклосиверсиозида F

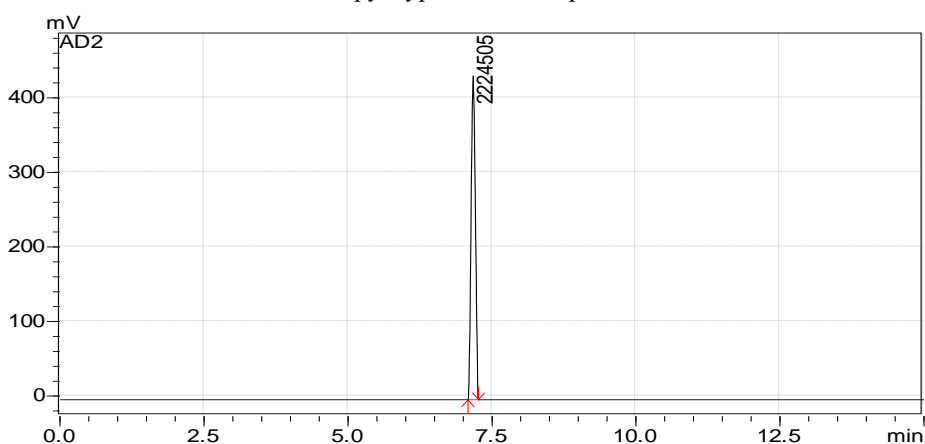


Рис. 2. Метод ВЭЖХ (ELSD) для стандарта циклосиверсиозида F (0.45 mg / mL)

Рассчитано процентное содержание циклосиверсиозида F, используя уравнение из калибровочной кривой, полученной для эталонного соединения (рис. 2). Для элюирования применялся изократический режим (ацетонитрил:вода, 50:50). На хроматограмме ВЭЖХ-ELSD пик соответствует времени удерживания для стандартного гликозида циклосиверсиозида F. Проведены семь тестов опытов для оценки количественного состава экстрактов методом RP-HPLC с ELSD детектором, которые приведены в таблице 1.

Образец 2 – Бутанольная вытяжка, полученная путем экстрагирования в системе: водный маточник-бутанол, Образец 3 – водный маточник после обработки хлороформом, Образец 4 – экстракт, полученный при экстракции растения 70%-ным этиловым спиртом, пятикратно, Образец 5 – водный маточник после обработки этилацетатом, Образцы 6 и 7 – экстракты, полученные при экстрагировании 70% этиловым спиртом (I и II сливы, соответственно).

Таблица 1. Количественное содержание циклосиверсиозида F в образцах экстрактов

Образцы*	Циклосиверсиозид F мг / 100 мг
Образец № 2	16.17
Образец № 3	6.89
Образец № 4	15.27
Образец № 5	11.09
Образец № 6	6.30
Образец № 7	6.27

Примечание. *Образцы, содержащие циклосиверсиозид F, полученные при экстрагировании растительного сырья *A. pterocerphalus* и обработки экстрактов неполярными растворителями.

Растение *A. pterocephalus* Bunge, произрастающее в Узбекистане, является источником тритерпенового гликозида циклосиверсиозида F, который проявил кардиопротекторную активность. Для количественного определения гликозида из полученных экстрактов разработан метод ВЭЖХ с испарительным детектором светорассеяния (ELSD).

Литература

1. Агзамова М.А., Халилов Р.М., Жанибеков А.А. Хроматографический анализ циклосиверсиозида F. *Химия растительного сырья*. 2021;2.
2. Коровин Е.Р., Введенский А.И. Флора Узбекской ССР. 1955. 3. С. 684.
3. Агзамова М.А., Исаев И.М. *Chemistry of Natural Compounds*. 2016;52(3):501-502.
4. Хушбактова З.А., Агзамова М.А., Сыров В.Н., Радченко Н.В., Мирсалихова Н.М., Умарова Ф.Т. Влияние циклоартанов растений рода *Astragalus* и их синтетических аналогов на сократительную функцию миокарда и активность Na, K-АТФазы. *Chemistry of Natural Compounds*. 1994;30(4):510–514.
5. Царук А.В., Хушбактова З.А., Мамедова Р.П., Сыров В.Н. *Фармацевтический журнал*. 2007;4:93-95.

СЕМЕНА (ПЛОДЫ) ЛОПУХА БОЛЬШОГО – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР)

А.К.Х. Али^{1*}, Р.С. Боев², Н.Э. Коломиец¹

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

² ООО «Вистерра», г. Барнаул, Россия

e-mail: jalilalshemiry@yahoo.com

Ключевые слова: Лопух большой, *Arctium lappa* L., Fructus Arctii, химический состав, биологическая активность.

Лопух большой (*Arctium lappa* L.) – один из самых распространенных в мире видов рода *Arctium* семейства *Asteraceae*. Этот вид является одним из самых изученных в целом, но, несмотря на большое количество информации, сведения о химическом составе, применении, фармакологических свойствах семян лопуха большого носят фрагментарный характер. Одно из первых исследований жирного масла семян лопуха большого датируется 1904 г. Позднее было установлено, что в состав жирного масла (22-30%), входят глицериды олеиновой (19,1%), линолевой (58,5%), миристиновой, стеариновой, пальмитиновой кислот; триацилглицеролы коронаровой, верноловой, цис-9,10-эпоксиктадекановой и транс-9,10-эпоксиктадекановой кислот, высшие алифатические углеводороды, тритерпеновые спирты, стероиды, ацилглицеролы. В семенах также идентифицированы органические кислоты (яблочная, лимонная), горький алкалоид лаппин, сапонины, кумарины, фенолкарбоновые кислоты (кофейная, хлорогеновая, изохлорогеновая), лигнаны арктиин, арктигенин, неоарктин-В, лаппаол А, лаппаол В, диарктигенин, металрезинол, арктиисескинеолигнан В и арктиифенолгликозид А. Для семян лопуха большого в отличие от других частей этого вида характерен высокий уровень кофеилхиновой кислоты. А к числу основных лигнанов семян лопуха некоторые исследователи относят арктиин и арктигенин. В нескольких исследованиях изучен состав фенольных соединений семян, в результате установлено присутствие лютеолина, кверцетина рамнозида, кверцитрина, кверцетина, галловой кислоты, кофеилхиновой кислоты, циннаматов (Narisa K., 2006; Wang G.X. et al., 2009; Eun H.S., 2011; Wei J.T., 2011; Hwan Y., 2012; Aboutabl E.A. et al., 2013; Chih Z.C., 2015; Hee S.S., 2015; Stefanov S.M., 2019; Sun B.L. et al., 2021). Семена лопуха большого (*Fructus Arctii*) используются в качестве традиционного травяного лекарственного средства в Китае, Японии и Корее. В связи с чем не является случайным, то, что в разных странах проводятся исследования фармакологических свойств, в которых исследователи получают экспериментальное подтверждение применению лопуха в народной медицине, и изучают новые, ранее не известные свойства. Большинство этих исследований носят междисциплинарный характер (Kondo H. et al., 2013; Tezuka Y. et al., 2013; Beitollah A., 2014; Wang P. et al., 2017; Gao Q. et al., 2018; Qasim A.A. et al., 2018; Alsamarrai A.Z. et al., 2020; Lyu Y.R., 2020). Противовоспалительные и антиоксидантные свойства *F. Arctii* подтверждаются его этнофармакологическим использованием для лечения воспалений различного генеза, при котором он подавляет провоспалительные факторы, такие как фактор каппа В (*NF-κB*), индуцибельная синтаза оксида азота и окислительный стресс. Большой интерес представляют сообщения об экспериментальном изучении и клинической апробации применения семян лопуха большого. Среди химических веществ, выделенных и идентифицированных из семян лопуха (хлорогеновая кислота, рутин, кофейная кислота и *n*-кумаровая кислота), были зарегистрированы как антиоксиданты. В одном из исследований было показано, что три лигнана, (-)-арктигенин, (-)-матирезинол и (+)-7,8-дидегидроарктигенин из плодов лопуха, обладают антипролиферативным действием (Eun H.S., 2011; Wei J.T., 2011; Chih Z.C., 2015; Hee S.S., 2015; Sun B.L. et al., 2021). Цитотоксичность арктиина, арктигенина и других лигнанов семян лопуха большого доказана в опытах *in vitro* и *in vivo* на культурах клеток и перевиваемых опухолях. В одном из исследований показано, что арктигенин проявляет 100 % цитотоксичность при вынужденном голодании опухолевых клеток (Hee S.S.,

2015; Wang P. et al., 2017; Sun B.L. et al., 2021). Экспериментальные исследования на животных показали, что спиртовые экстракты оказывают стимулирующее воздействие на процессы сперматогенеза. Арктигенин предупреждает поражение нервных клеток амилоидом и этиловым спиртом. Назначение экстрактов лопуха предупреждает поражение тестикулярного аппарата, печени солями кадмия. Фруктан проявляет противокашлевую активность, сопоставимую с ненаркотическими синтетическими препаратами, а в митогенных и комитогенных тестах его действие сопоставимо с действием иммуномодулятора «Зимозана». Арктиин из семян лопуха большого показывает эффективность при экспериментальном гломерулонефрите, защищая мочевыделительную систему от поражения *Schistosoma haematobium*, тем самым, предупреждая развитие рака мочевого пузыря. При наружном применении арктиин улучшает трофику кожи, предупреждает образование морщин. Клинические исследования показали, что лопух оказывает терапевтическое воздействие при юношеских угрях воспалительного характера. Рандомизированные, плацебо, контролируемые клинические исследования показали, что слизь семян лопуха оказывает терапевтическое воздействие при сухости, зуде и ожогах кожи. Арктиин обладает радиопротекторными свойствами (Tezuka Y. et al., 2013). Неочищенный этанольный экстракт семян (плодов) лопуха большого, в составе которого идентифицированы дибензилбутиролактоновые лигнаны (арктиин и арктигенин), обладает *in vitro* выраженным шистосомицидным (в отношении взрослых червей *Schistosoma mansoni*) действием в дозе 400, 50 и 3,125 мкг/мл, и противогерпетической активностью (при репликации вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1)) в дозе 400 мкг/мл (Aboutabl E.A. et al., 2013). Экстракт плодов лопуха большого (AFE) и его ферментированная форма (F-AFE) обладают противоаллергическим действием. Также полученные авторами результаты позволили предположить, что арктигенин играет важную роль в противоаллергическом действии F-AFE (Eun H.S., 2011).

Заключение. Приведенные сведения демонстрируют, с одной, что семена (плоды) лопуха большого (*Fructus Arctii*) содержат богатый комплекс биологически активных веществ, с другой – показывают, что по отдельным группам БАВ, динамике их накопления, этих данных недостаточно. Результаты изучения фармакологической активности семян (плодов) лопуха большого (*Fructus Arctii*) показывают перспективность их дальнейшего изучения в ряде областей медицинской практики, а также возможности использования с целью разработки лекарственных и парафармацевтических препаратов на их основе.

Литература

1. Aboutabl E.A., El-Tantawy M.E., Shams M.M. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile constituents from the roots, leaves, and seeds of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) grown in Egypt. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2013;12:173–176. DOI: <https://doi.org/10.4103/1687-4315.124036>.
2. Alsamarrai A.Z., Al-Samarrai R.R., Tawfeeq A.T. Isolation and Identification of Flavonoids from *Arctium Lappa* Stem and Study the HepatoProtective Effect on Acetaminophen Induced Liver Damage. *International Journal of Psychosocial Rehabilitation*. 2020;24(5):5191-5198. DOI: 10.37200/IJPR/V24I5/PR2020226.
3. Beitollah A. Effect of *arctium lappa* l. (burdock) root tea on clinical signs and symptoms in patients with knee osteoarthritis. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 2014;12(4):149-154.
4. Chih Z.C. Arctigenin, a Potent Ingredient of *Arctium lappa* L., Induces Endothelial Nitric Oxide Synthase and Attenuates Subarachnoid Hemorrhage-Induced Vasospasm through PI3K/Akt Pathway in a Rat Model. *BioMed Research International*. 2015;10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/490209>.
5. Eun H.S. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L. *Clinical and Molecular Allergy*. 2011;9:1-11. Available from: <http://www.clinicalmolecularallergy.com/content/9/1/4>.
6. Gao Q., Yang M., Zuo Z. Overview of the anti-inflammatory effects, pharmacokinetic properties and clinical efficacies of arctigenin and arctiin from *Arctium lappa* L. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018;39(1671-4083):787–801. DOI: <https://doi.org/10.1038/aps.2018.32>.
7. Hee S.S. Arctigenin from *Fructus Arctii* (Seed of Burdock) Reinforces Intestinal Barrier Function in Caco-2 Cell Monolayers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/368105>.
8. Hwan Y. Anti-wrinkle Compounds Isolated from the Seeds of *Arctium lappa* L. *Journal of Life Science*. 2012;22(8):1062~1068. DOI: <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.8.1062>.
9. Kondo H., Hirano S., Chiba S., Andika I.B., Hirai M., Maeda T., Tamada T. Characterization of burdock mottle virus, a novel member of the genus Benyvirus, and the identification of benyvirus-related sequences in the plant and insect genomes. *Virus Res*. 2013;177(1):75-86.
10. Lyu Y.R. Efficacy and safety of CAEC (Canavalia gladiata *arctium lappa* extract complex) on immune function enhancement: An 8 week, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods*. 2020;75:1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104259>.
11. Narisa K. The Isolation of the Anti-Helicobacter Pylori Compounds in Seeds of *Arctium lappa* Linn. *Thai Pharmaceutical and Health Science*. 2006;1(2):12-18. DOI: <https://www.researchgate.net/publication/242181205>.

12. Qasim A.A., Sajid O.M., Al-Muthanna Effect of planting date and salicylic acid spray on growth of burdock plant (*Arctium lappa* L.) and its roots content of quercetin and arctiin compounds. *J. For Agric. Sc.* 2018;6(1):56-65.
13. Stefanov S.M. Extraction and characterization of Burdock extracts (leaves, seeds and roots) with compressed solvents technologies. *Bulgarian Chemical Communications.* 2019 ;51:35–38. DOI: <https://doi.org/DOI10.34049/bcc.51..019>.
14. Sun B.L., Cai E.B., Zhao Y., Wang Y., Yang L.M., Wang J.Y. Arctigenin triggers apoptosis and autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition in PC-3M cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2021: c21-00021.
15. Tezuka Y. Yamamoto K., Awale S. Anti-austeric Activity of Phenolic Constituents of Seeds of *Arctium lappa*. *Natural Product Communications.* 2013;8(4):463 – 466.
16. Wang G.X., Han J., Feng T.T., Li F.Y., Zhu B. Bioassay-guided isolation and identification of active compounds from Fructus *Arctii* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res.* 2009;106(1):247-255.
17. Wang P., Solorzano W., Diaz T., Magyar C.E., Henning S.M., Vadgama J.V. Arctigenin inhibits prostate tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Clin Nutr Exp.* 2017;13:1-11.
18. Wei J.T. Arctigenin from *Arctium lappa* inhibits interleukin-2 and interferon gene expression in primary human T lymphocytes. *Chinese Medicine.* 2011.6:1-8. DOI: 10.1186/1749-8546-6-12.

ВЛИЯНИЕ 8-С-,4'-О-ДИГЛЮКОЗИДА АПИГЕНИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ

А.М. Богоутдинова^{1*}, М.Ю. Гончаров, С.П. Гамбарян²

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Минздрава России,
г. Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: alina.bogoytdinova@pharminnotech.com

Ключевые слова: флавоноиды, тромбоциты, апигенин, гликозиды апигенина, антиагреганты.

Введение. Тромбоциты – безъядерные форменные элементы крови, важнейшей функцией которых является регуляция гемостаза. Нормальный гемостаз может быть нарушен в результате воздействия патологических факторов, которые приводят к активации тромбоцитов с последующим неконтролируемым образованием тромба и возникновению тромбозов. Активация тромбоцитов может быть опосредована факторами, воздействующими на поверхностные рецепторы тромбоцитов с последующей активацией сигнальных путей, которые в свою очередь индуцируют ряд внутриклеточных событий, таких как ингибирование аденилатциклазы, мобилизацию ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо, перестройку цитоскелета, что ведёт к изменению формы тромбоцитом с плоской на шарообразную с многочисленными отростками и их агрегации. Флавоноиды – это полифенольные растительные соединения, являющиеся производными хромана. В растениях флавоноиды присутствуют обычно в форме гликозидов, реже агликонов. Было выявлено, что некоторые флавоноиды, как агликоны (кверцетин, нобилетин) (Vaiyapuri S. et al., 2015), так и О-гликозиды (рутин, гликозиды формонетина) (Зверев Я.Ф. и др., 2017) способны ингибировать активацию тромбоцитов. Данные их свойства наряду с низкой токсичностью, широким распространением в объектах лекарственного растительного сырья и относительной простотой их выделения в виде индивидуальных веществ делают флавоноиды перспективными кандидатами для создания препаратов для профилактики и лечения тромбозов. Апигенин является агликоном флавоновой природы, который также встречается в лекарственном растительном сырье в виде О-гликозидов и С-гликозидов (витексин, виценин). Из литературных данных известно, что агликон апигенина ингибирует активацию тромбоцитов, снижая PAR1-PAR4-индуцированное высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Navarro-Núñez L. et al., 2008; Navarro-Núñez L. et al., 2009). О влиянии на функциональную активность тромбоцитов С-гликозидов и О-гликозидов апигенина в виде индивидуальных соединений данные практически отсутствуют.

Цель. Целью данного исследования является оценить влияние индивидуального соединения 8-С-,4'-О-диглюкозида апигенина на функциональную активность тромбоцитов и сравнить полученные результаты с имеющимися литературными данными для агликона апигенина.

Материалы и методы. Объектом исследования служил образец апигенин-8-С-(4'-О-β-D-глюкопиранозил)-β-D-глюкозида под кодовым названием ПЛ-3, выделенный из листьев морозники *Rubus chaetomerus*, сем. *Rosaceae* (Розоцветные) на кафедре фармакогнозии СПХФУ. Подлинность изучаемого вещества подтверждена методами хромато-масс-спектрологии и ЯМР. Изучение влияния вещества на индуцированную активацию тромбоцитов проводилось на тромбоцитах человека, выделенных из крови здоровых добровольцев. Кровь отбиралась в пробирку с цитратным буфером с добавлением EGTA (2,5 мМ), затем центрифугировалась 7 минут при 1400 g. Затем отбиралась плазма, обогащённая тромбоцитами (platelet-rich plasma, PRP). Для исследования влияния ПЛ-3 на активацию тромбоцитов, PRP разбавлялось HEPES буфером (состав: 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида калия, 1 мМ хлорида магния, 1 мМ хлорида кальция, 5 мМ D-глюкозы, 10 мМ HEPES, pH = 7.4; разведение 1:13), добавлялся $CaCl_2$ (1 мМ). В

качестве агентов, индуцирующих активацию тромбоцитов, использовались ADP и TRAP-6. Для оценки зависимости влияния ПЛ-3 на функциональную активность тромбоцитов от его концентрации, пробы, за исключением контрольного образца, инкубировались в течение 30 минут с конечными концентрациями вещества 1 μM , 5 μM , 10 μM и 20 μM . По окончании времени инкубации к исследуемым образцам и образцам позитивного контроля прибавлялся активатор и фибриноген, меченый Alexa-647. После инкубации с активирующим фактором в течение 5 минут, все образцы фиксировались при помощи 1% раствора формальдегида, затем прибавлялся фосфатный буфер PBS в соотношении 10:1. Для оценки активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (связывание с фибриногеном, меченым Alexa-647) на поверхности тромбоцитов использовался метод проточной цитофлуориметрии на приборе Cyto-FLEX (Beckman-Coulter, США). Каждый образец оценивался по 15 000 событий.

Результаты. ADP путем активации P2Y₁₂ и P2Y₁ рецепторов вызывает существенную активацию тромбоцитов. Апигенин-8-С-,4'-О-диглюкозид, начиная от концентрации 5 мкМ, потенцирует активацию $\alpha\text{IIb}\beta_3$ интегринов (рис. 1).

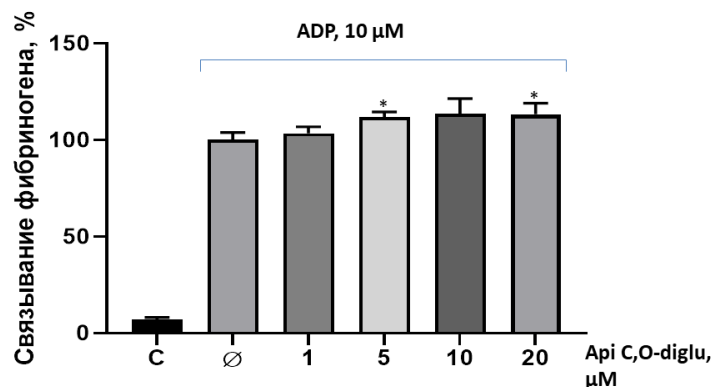


Рис. 1. Апигенин-8-С-,4'-О-диглюкозид потенцирует ADP-индуцированную активацию тромбоцитов

Активация тромбоцитов, вызванная ADP, была принята за 100 % и рассматривалась как позитивный контроль. В контрольной пробе без активации наблюдалось 7% активированных тромбоцитов (рисунок 1). В пробах с апигенин-8-С-,4'-О-диглюкозидом и ADP наблюдается потенцирование активации тромбоцитов – процент активных тромбоцитов колеблется в пределах 103-113 % при дозах 1 μM , 5 μM , 10 μM и 20 μM апигенин-8-С-,4'-О-диглюкозидом. Сходные результаты были получены при активации тромбоцитов рецепторов (рис. 2).

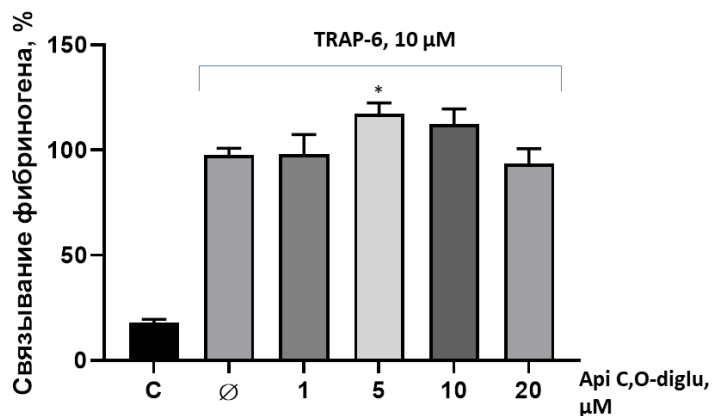


Рис. 2. Апигенин-8-С-,4'-О-диглюкозида потенцирует TRAP-6-индуцированную активацию тромбоцитов

Также как и в первом случае, активация тромбоцитов, вызванная TRAP-6 в контрольном образце была принята за 100 %. На рисунке 2 видно, что процент активированных тромбоцитов в контрольной пробе равен 18 %. В пробах с TRAP-6 и апигенин-8-С-,4'-О-диглюкозидом в концентрациях 5 μM и 10 μM наблюдается потенцирование активации тромбоцитов.

Заключение. Хорошо известно, что многие флавоноиды, в том числе апигенин, действуя на различные внутриклеточные механизмы, могут ингибировать активацию тромбоцитов и применяются при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Однако представленные данные указывают на то, что сходные соединения могут вызывать активацию тромбоцитов. Предполагается, что различия в действии данных

веществ на функциональную активность тромбоцитов связаны с различиями в их химической структуре, в частности, с присутствием С-гликозидной связи.

Литература.

1. Зверев Я.Ф., Кудинов А.В., Момот А.П., Федорев С.А., Замятина С.В., Кулеш Н.И. Антиромботическая *in vitro* активность 7-гидрокси-7-гидроксибиозиды формонетина. Экспериментальная и клиническая фармакология. *Folium Publishing Company*. 2017;80(8):19–22. <http://dx.doi.org/10.30906/0869-2092-2017-80-8-19-22>
2. Navarro-Núñez L., Lozano M.L., Palomo M., Martínez C., Vicente V., Castillo J., Benavente-García O., Diaz-Ricart M., Escolar G., Rivera J. Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway. *J Agric Food Chem*. 2008;56(9):2970-6. doi: 10.1021/jf0723209.
3. Navarro-Núñez L., Rivera J., Guerrero J.A., Martínez C., Vicente V., Lozano M.L. Differential effects of quercetin, apigenin and genistein on signalling pathways of protease-activated receptors PAR(1) and PAR(4) in platelets. *Br J Pharmacol*. 2009;158(6):1548-1556. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00440.x.
4. Vaiyapuri S., Roweth H., Ali M.S., Unsworth A.J., Stainer A.R., Flora G.D. Pharmacological actions of nobiletin in the modulation of platelet function. *British Journal of Pharmacology*. 2015;172(16):4133–45. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13191>.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 5,8-ДИГИДРОКСИФЛАВОНОВ ИЗ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *SCUTELLARIA COMOSA*

А.М. Каримов¹, Ю.В. Остроушко², М.А. Мулюкин², М.А. Маматханова¹,
Ш.А. Эргашева¹, О.К. Аскарова³, Э.Х. Ботиров^{1*}

¹ Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова, АН РУз, г. Ташкент, Узбекистан

² Сургутский государственный университет, г. Сургут, Россия

³ Наманганский инженерно-технологический институт, г. Наманган, Узбекистан
e-mail: botirov-nepi@mail.ru

Ключевые слова: *Scutellaria comosa* Juz., гиполаетин, 7-О-β-D-глюкопиранозиды норвогонина, изоскутеллареина и гиполаетина.

Введение. В научном мире интерес к флавоноидам очень высок, что обусловлено их высокой биологической активностью и малой токсичностью. Флавоноиды входят в число биологически активных соединений с широким спектром фармакологического действия (Тараховский Ю.С. и др., 2013). Высокая физиологическая активность флавоноидов указывает на их важную роль в жизнедеятельности, как растений, так и животных. Одним из богатых источников флавоноидов являются растения рода *Scutellaria* L. (семейство *Lamiaceae*) (Shang X. et al., 2010; Shen J. et al., 2021), которые на земном шаре представлены более 400 видами и широко распространены в умеренных, субтропических и тропических регионах, включая Европу, Северную Америку и Восточную Азию. На территории Узбекистана произрастают 38 видов *Scutellaria*, некоторые из которых используются в народной медицине для лечения эпилепсии, аллергии, невроза, гипертонии и других заболеваний. Анализ данных литературы о химическом составе флавоноидов растений рода *Scutellaria* свидетельствует о его разнообразии. Флавоноиды растений указанного рода представлены флавонами, флаванонами, флавонолами, халконами, изофлавонами, бифлавонами и флаволигнанами (Azimova S.S., 2013; Karimov A.M. et al., 2017). К настоящему времени накоплен большой фактический материал по выделению, идентификации, установлению строения и биологической активности фенольных соединений различных видов *Scutellaria* (Shang X. et al., 2010; Azimova S.S., 2013; Karimov A.M. et al., 2017; Wang Z.L. et al., 2018; Shen J. et al., 2021).

Цель. С целью выделения биологически активных веществ нами изучены флавоноиды надземной части *Scutellaria comosa* Juz. (шлемник хохлатый), собранной в период массового цветения в предгорных местностях Наманганской области.

Материалы и методы. Методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором (подвижная фаза уксусная кислота – ацетонитрил) установлено наличие в составе спиртового экстракта надземной части не менее 15 флавоноидов. Флавоноиды из измельченного воздушно-сухого сырья экстрагировали 92%-ным этанолом, объединенный экстракт упаривали в вакууме, разбавили водой, осадок хлорофилла и липофильных соединений отфильтровали, фильтрат упаривали в вакууме, разбавили водой (1:1), промывали хлороформом. Выпавший осадок светло-желтого цвета отфильтровали и высушивали. Часть полученного осадка хроматографировали на колонке с силикагелем в градиентной системе хлороформ-метанол (98:2–80:20). Из отдельных элюатов перекристаллизацией из различных растворителей и рехроматографированием на колонке с сефедексом LH-20 выделили четыре флавоноида.

Результаты. Строение выделенных флавоноидов установлено на основании изучения спектральных данных и результатов химических превращений. *Гиполаетин* (1) состава C₁₅H₁₀O₇, УФ-спектр (λ_{max}, метанол, нм): 278, 308 перегиб, 337 характерен для производных флавона. В (+)ESI-МС спектре флавоноида присутствует пик квазимолекулярного иона с m/z 303 а.е.м. ([M+H]⁺). Положительная госсипетиновая

проба с *n*-бензохиноном свидетельствует о наличии *n*-дигидроксигруппировки в положениях С-5 и С-8 флавонового ядра. В спектре ¹Н ЯМР рассматриваемого флавоноида в Ру-d₅ присутствуют сигналы протонов Н-3 (6.78 м.д., 1Н, с, Н-3), Н-6 (6.84 м.д., 1Н, с, Н-6), замещенного в положениях 3', 4' кольца В (7,13 м.д., 1Н, д, 8,0 Гц, Н-5'; 7.57 м.д., 1Н, дд, 2,2 и 8,0 Гц, Н-6'; 8.01 м.д., 1Н, д, 2,2 Гц, Н-2') и гидроксильной группы в положении С-5 (13.18 м.д., с, 5-ОН). В спектре ¹³С ЯМР (100 МГц, Ру-d₅, δ, м.д.) проявляются сигналы атомов углерода при 183.87 (С-4), 165.39 (С-2), 155.60 (С-5), 156.17 (С-7), 152.21 (С-9), 150.35 (С-4'), 123.79 (С-1'), 117.42 (С-5'), 147.70 (С-3'), 127.62 (С-8), 115.25 (С-2'), 120.26 (С-6'), 104.10 (С-3), 100.43 (С-6), 105.38 (С-10). На основании изложенных спектральных данных установили, что флавоноид 1 является 5,7,8,3',4'-пентагидроксифлавоном (гиполаетином) (Buckingham J. et al., 2015; Karimov A.M. et al., 2017). Норвогонин 7-О-β-D-глюкопиранозид (2) состава C₂₁H₂₀O₁₀ с т.пл. 276-278 °С; УФ-спектр (λ_{max}, метанол, нм): 279, 350 нм. Флавоноид дает положительную госсипетиновую реакцию с *n*-бензохиноном, что свидетельствует о наличии *n*-диоксигруппировки в его составе. В спектре ¹Н ЯМР (ДМСО-d₆) присутствуют сигналы протонов Н-3, Н-6, незамещенного кольца В, гидроксильных групп в положениях С-5 и С-8, а также одного углеводного остатка. ¹³С ЯМР-спектр (100 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 182.61 (С-4), 163.48 (С-2), 152.38 (С-5), 151.49 (С-7), 144.44 (С-9), 132.20 (С-4'), 130.83 (С-1'), 129.20 (С-3',5'), 127.06 (С-8), 126.53 (С-2',6'), 104.97 (С-3), 98.78 (С-6), 105.38 (С-10), 101.21 (С-1''), 77.30 (С-5''), 75.74 (С-3''), 73.22 (С-2''), 69.69 (С-4''), 60.65 (С-6''). В результате ферментативного гидролиза флавоноида 2 β-гликозидазой получили норвогонин (5,7,8-тригидроксифлавоны) и D-глюкозу. Сравнительным изучением спектров ¹³С ЯМР норвогонина и флавоноида 2 установлено, что последний является норвогонин 7-О-β-D-глюкопиранозидом (Buckingham J. et al., 2015; Karimov A.M. et al., 2017). Изоскутеллареин 7-О-β-D-глюкопиранозид (3) состава C₂₁H₂₀O₁₁ с т.пл. 288-289 °С; УФ-спектр (λ_{max}, метанол, нм): 278, 307, 328 (пл.), 364 (пл.) нм. Флавоноид 3 дает положительную реакцию с *n*-бензохиноном, что указывает на наличие в составе его молекулы *n*-дигидроксигруппировки в положениях С-5 и С-8. В спектре ¹Н ЯМР рассматриваемого флавоноида (ДМСО-d₆) присутствуют сигналы протонов Н-3, Н-6, замещенного в положении 4' кольца В, гидроксильных групп в положениях С-5, С-8 и С-4', а также углеводного остатка. Положительная госсипетиновая проба с *n*-бензохиноном свидетельствует о наличии фенольных гидроксильных групп в положениях С-5 и С-8 флавонового ядра. В (+)ESI-МС спектре флавоноида 3 присутствует квазимолекулярный ион ([M+H]⁺) 449 а.е.м. Характер фрагментации свидетельствует о том, что рассматриваемый флавоноид являются гликозидом изоскутеллареина (присутствие иона [Y₀]⁺ 287 а.е.м. – [агликон+Н-гексоза]⁺). ¹³С ЯМР-спектр (100 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 182.40 (С-4), 164.04 (С-2), 152.34 (С-5), 151.21 (С-7), 144.32 (С-9), 161.33 (С-4'), 128.64 (С-2',6'), 126.96 (С-8), 121.28 (С-1'), 116.03 (С-3',5'), 105.13 (С-10), 102.66 (С-3), 101.25 (С-1''), 98.63 (С-6), 77.30 (С-5''), 75.75 (С-3''), 73.23 (С-2''), 69.70 (С-4''), 60.67 (С-6''). В результате ферментативного гидролиза флавоноида 3 β-гликозидазой получили изоскутеллареин (5,7,8,4'-тетрагидроксифлавоны) и D-глюкозу. На основании изложенных данных флавоноид 3 идентифицировали с изоскутеллареин 7-О-β-D-глюкопиранозидом (Markham K.R., Given D.R., 1988). Гиполаетин 7-О-β-D-глюкопиранозид (4) состава C₂₁H₂₀O₁₂, УФ-спектр (λ_{max}, метанол, нм): 278, 308, 337. Рассматриваемый флавоноид дает положительную реакцию с *n*-бензохиноном, что указывает на наличие в его составе фенольных гидроксильных групп в положениях С-5 и С-8. ¹Н ЯМР-спектр (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): 3.09-3.47 (4Н, м, Н-2'- Н-5''), 3.67 (2Н, м, 2Н-6''), 4.64 (1Н, уш. с, 6''-ОН), 4.88 (1Н, д, 7.6 Гц, Н-1''), 5.09 (1Н, уш. с, 2''-ОН), 6.68 (1Н, с, Н-3), 6.58 (1Н, с, Н-6), 6.85 (1Н, д, 8,4 Гц, Н-5'), 7.42 (1Н, дд, 2,3 и 8,4 Гц, Н-6'), 7.44 (1Н, д, 2,3 Гц, Н-2'), 12.34 (1Н, с, 5-ОН). ¹³С ЯМР-спектр (100 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 182.32 (С-4), 164.26 (С-2), 152.35 (С-5), 151.13 (С-7), 145.72 (С-9), 149.88 (С-4'), 121.62 (С-1'), 116.04 (С-5'), 144.32 (С-3'), 126.95 (С-8), 113.55 (С-2'), 119.25 (С-6'), 102.69 (С-3), 98.60 (С-6), 105.19 (С-10), 101.30 (С-1''), 77.31 (С-5''), 75.70 (С-3''), 73.23 (С-2''), 69.70 (С-4''), 60.67 (С-6''). В результате ферментативного гидролиза флавоноида 4 β-гликозидазой получили гиполаетин (1) и D-глюкозу. Сравнительным изучением спектров ¹³С ЯМР гиполаетина и флавоноида 4 установлено, что последний является гиполаетин 7-О-β-D-глюкопиранозидом (Siddiqui S.A., Sen A.B., 1971). Гликозиды гиполаетина обладают противовоспалительным, антиоксидантным и противоязвенными свойствами (Buckingham J. et al., 2015). В результате фармакологических исследований, проведенных в отделе фармакологии и токсикологии Института химии растительных веществ АН Республики Узбекистан, установлено противогипоксическое и адаптогенное действие суммы флавоноидов из надземной части *S. comosa*. Для оценки количественного содержания флавоноидов в надземной части *S. comosa* разработан методика дифференциальной УФ-спектрофотометрии. Методика основана на проведении реакции комплексообразования с 1% спиртовым раствором алюминия хлорида. В качестве стандартного вещества для пересчета содержания флавоноидов выбран изоскутеллареин 7-О-β-D-глюкопиранозид, являющийся по данным ВЭЖХ, доминирующим в надземной части *S. comosa* флавоноидом. УФ-спектр спиртового извлечения надземной части содержит два экстремума при 270 и 335 нм. Спектр поглощения изоскутеллареин 7-О-β-D-глюкопиранозид почти совпадает с таковым спиртового извлечения из растительного сырья, поэтому он был выбран нами в качестве стандартного вещества для определения содержания флавоноидов. Измерение оптической плотности исследуемых спиртовых извлечений и раствора стандартного образца после реакции с раствором алюминия хлорида проводили при 346 нм, т.к. максимумы поглощения при указанной длине волны практически совпадали. Суммарное содержание флавоноидов в надземной части *S. comosa*, определенное дифференциальным методом анализа в пересчете на изоскутеллареин 7-О-β-D-глюкопиранозид составляет 7,97%.

Заключение. Из надземной части *S. comosa* выделены флавоноиды гиполаетин, 7-О-β-D-глюкопиранозиды норвогонина, изоскутеллареина и гиполаетина, содержащие *n*-дигидроксигруппировки в положениях С-5 и С-8 флавонового ядра. Установлена противогипоксическая и адаптогенная активность суммы флавоноидов из надземной части *S. comosa*. Данные о качественном и количественном составе химических компонентов надземной части будут использованы при разработке лекарственных средств на основе растительного сырья.

Литература

1. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchronbook. 2013. 310 с.
2. Azimova S.S. Natural compounds. Flavonoids. Plant Sources, Structure and Properties. Editors: S.S. Azimova, V.I. Vinogradova. New York: Springer. 2013. 661p.
3. Buckingham J., Ranjit V., Munasinghe N. Dictionary of Flavonoids, Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2015:623–624.
4. Karimov A.M., Botirov E. Kh. Structural Diversity and State of Knowledge of Flavonoids of the *Scutellaria* L. Genus. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017;43(7):691–711.
5. Markham K.R., Given D.R. The major flavonoids of an antarctic *Bryum*. *Phytochem.* 1988;27(9):2843–2845.
6. Shang X., He X., He X., Li M., Zhang R., Fan P., Zhang Q., Jia Z. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *J. Ethnopharmacol.* 2010;128:279–313.
7. Shen J., Li P., Liu Sh., Liu Q., Li Y., Sun Y., He Ch., Xiao P. Traditional uses, ten-years research progress on phytochemistry and pharmacology, and clinical studies of the genus *Scutellaria*. *J. Ethnopharmacol.* 2021;265:113198.
8. Siddiqui S.A., Sen A.B. Hypolaetin 7-glucoside from *Juniperus macropoda*. *Phytochem.* 1971;10(2):434–435.
9. Wang Z.L., Wang S., Kuang Y., Hu Z.M., Qiao X., Ye M. A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*. *Pharm. Biol.* 2018;56(1):465–484.

НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПОБЕГОВ БОЯРЫШНИКА В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

Н.А. Волкова*, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева, И.Х. Шайхутдинов
ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, г. Самара, Россия
e-mail:n.a.volkova@samsmu.ru

Ключевые слова: род Боярышник, *Crataegus* L., боярышника побеги, флавоноиды, спектрофотометрия.

Введение. Различные виды рода боярышник (*Crataegus* L.) широко применяются в качестве лекарственных растений как в нашей стране, так и за рубежом (ГФ, 14 издание; Соколов С.Я., 1954). В нашей стране в качестве сырья успешно используются плоды и цветки боярышника для получения кардиотонических препаратов (Куркин В.А., 2012; Куркин В.А., 2019; Куркин В.А. и др., 2020). При этом лекарственное растительное сырье возможно заготавливать от 12 видов растений рода боярышник ГФ, 14 издание; Соколов С.Я., 1954). Ведущей группой биологически активных соединений сырья боярышника являются флавоноиды (Куркин В.А., 2019). Причем в плодах боярышника преобладают их восстановленные формы, в то время как в цветках, листьях и побегах доминируют окисленные формы флавоноидов (Куркин В.А. и др., 2020). Однако ряд зарубежных стран использует для получения лекарственных препаратов не цветки, а цветущие побеги боярышника (Куркин В.А., 2012). Такое сырье представляет собой недревесневшие побеги с листьями и соцветиями. На наш взгляд, сбор цветущих побегов гораздо менее трудоемкий. К тому же препараты листьев и цветков боярышника могут обладать разным фармакологическим действием, дополняя друг друга при совместном присутствии в препаратах (Куркин В.А. и др., 2020). Экстракты цветков и листьев входят в некоторые биологически активные добавки, имеющиеся на прилавках аптек. Следует отметить, что сырьем для производства препаратов могут быть не только дикорастущие виды боярышника, но и культивируемые растения, такие как боярышник мягковатый (полумягкий) (*Crataegus submollis* Sarg., сем. розоцветные – *Rosaceae*), который выращивается в качестве пищевого и декоративного растения, при этом к числу фармакопейных видов не относится (Соколов С.Я., 1954). Как известно, заготовка сырья от культивируемых растений не наносит сильного ущерба природе. Также ранее нами было показано целесообразность получения препаратов на основе плодов боярышника мягковатого.

Цель. Целью настоящей работы является сравнительное фитохимическое исследование цветущих побегов боярышников кроваво-красного, боярышника однопестичного и боярышника мягковатого.

Материалы и методы. Цветущие побеги боярышника были заготовлены нами в мае 2020 года в Ботаническом саду Самарского университета. Все сырье было высушено на воздухе без доступа прямых солнечных лучей. Для заготовки были использованы боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pall.), боярышник однопестичный (*Crataegus monogyna* Jack.) и боярышник мягковатый (*Crataegus submollis*

Sarg.). Все виды сырья были исследованы методом тонкослойной хроматографии на содержание флавоноидов на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» в системе хлороформ-этиловый спирт-вода в соотношении 26:16:3. Для проведения эксперимента были использованы извлечения из сырья, сделанные на основе 70% этилового спирта в соотношении 1:10. В качестве растворов сравнения нами был использован раствор гиперозид и 2¹¹-О-рамнозида витексина. Детекция хроматограмм осуществлялась путем просматривания в УФ-лампах при 366 и 254 нм, проявлением раствором диазотированной сульфаниловой кислоты и раствора хлорида алюминия. Также был проведен сравнительный анализ методом дифференциальной спектрофотометрии на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena).

Результаты. Результаты исследования показывают, что метод тонкослойной хроматографии позволил выявить некоторые отличия в химическом составе побегов трех изучаемых видов боярышника. Было определено, что для побегов боярышника кроваво-красного характерно высокое содержание 2¹¹-О-рамнозида витексина, тогда как в извлечениях из сырья двух других видов этот флавоноид не обнаружен. В побегах боярышника мягковатого выявлено высокое содержание гиперозид, а в побегах боярышника однопестичного – рутина. Некоторые отличия можно заметить и в полученных спектрах извлечений из побегов трех видов боярышника. Они заключаются в максимумах поглощения у спектров с раствором алюминия хлорида. Максимум поглощения для извлечения из побегов боярышника кроваво-красного составляет 392 нм, в то время как для двух других видов находится на отметке 410-412 нм (рисунок 1).

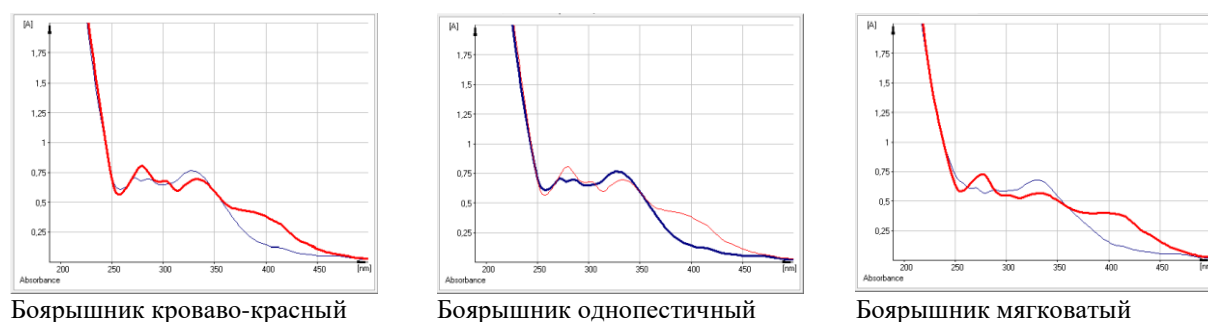


Рис. 1. Электронные спектры извлечений из побегов боярышника

Заключение. Выявленные отличия в химическом составе побегов боярышника могут влиять на фармакологические действия препаратов побегов боярышника. Ранее нами было показано, что жидкие экстракты на основе цветущих побегов боярышника кроваво-красного и боярышника мягковатого обладают выраженной антидепрессантной активностью за счет содержания 2¹¹-О-витексина рамнозида и гиперозид (Куркин В.А., 2012). На наш взгляд побеги боярышника мягковатого также являются перспективным видом лекарственного растительного сырья.

Литература

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Четырнадцатое издание. М.: Министерство здравоохранения РФ; 2018. [Электронный ресурс] / URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
2. Куркина В.А. Флавоноиды фармакопейных растений: монография. Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России; 2012. 290 с.
3. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 4-е изд., перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России; 2019. 1278 с.
4. Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Шайхутдинов И.Х., Куркина А.В., Зайцева Е.Н., Волкова Н.А. Виды рода боярышник (*Crataegus* L.): стандартизация и создание лекарственных препаратов: Монография. Самара: ООО «Офорт»; 2020. 118 с.
5. Соколов С.Я. Деревья и кустарники СССР. Издание Академии наук СССР: Москва-Ленинград, 1954. Т. 3. 872 с.

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КОЛЮРИИ ГРАВИЛАТОВИДНОЙ (*COLURIA GEOIDES* (PALL.) LEDEB.), *ROSACEAE*) – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИММУНОКОРРЕКТОРЫ

С.В. Дутова*, М.А. Лебедева

¹ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», Абакан, Россия

²Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: coluria@mail.ru

Ключевые слова: фенольные соединения, иммунокорректоры, фитопрепараты.

Введение. Несмотря на многочисленные сведения о наличии иммуностимулирующих свойств у многих растений, введение в практическую медицину лекарственных препаратов на их основе остается проблематичным. Это связано с серьезными трудностями в стандартизации комплексов биологически активных соединений (БАС) растительного происхождения и контроле качества фитопрепаратов. В

результате доклинических исследований комплекса биологически активных соединений, извлекаемого из сырья *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*) 40 % спиртом этиловым (субстанция Сg), нами было выявлено его выраженное иммуностимулирующее и иммунокорригирующее действие (Дутова С.В., Карпова М.А., 2019). Иммунотропную активность растений многие исследователи связывают с фенольными соединениями, объясняя это их антиоксидантными свойствами (Куркин В.А. и др., 2005; Ильина И.Г. и др., 2013). Полифенольные соединения стимулируют репаративные процессы в иммунокомпетентных клетках, стабилизируют мембраны, предотвращают деструктивные изменения в клетках под влиянием активных радикалов. Высокое содержание в сырье и суммарных извлечениях *C. geoides* соединений фенольной природы также может являться причиной их выраженной иммунотропной активности.

Цель. Выявление действующих веществ разработанной фармацевтической субстанции с иммунотропным действием.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила субстанция Сg, полученная из сырья *C. geoides* методом перколяции 40 %-ного спиртом этиловым, стандартизованная по *m*-кумаровой кислоте. При фитохимических исследованиях использовали хроматографические методы. ВЭЖХ проводили на аналитической системе (жидкостный хроматограф «Agilent 1200» с диодноматричным детектором, система для обработки хроматографических данных ChemStation). Для идентификации компонентов использовали ГСО, время удерживания, УФ-спектры, базы данных и обзорные статьи по спектральным характеристикам соединений. Количественное содержание групп БАС определяли хромато спектрофотометрическим методом. С целью выявления действующих веществ получали фракции Сg: 28,3 г субстанции растворяли в 200 мл воды и фракционировали рядом растворителей с увеличивающейся полярностью (хлороформ, ацетон, бутанол-1, этанол). Перед экспериментом фракции высушивали, суспендировали в растворителе. Доза извлечений в экспериментах *in vivo* 50 мг/кг (вводили животным через зонд в желудок 1 раз в день в течение 5 дней). Исследование проводили согласно «Методическим рекомендациям по исследованию иммунотропной активности лекарственных средств» (Миронов А.Н., 2012). Иммунотропные свойства изучали на инбредных мышцах-самках линии СВА/СаЛас. Эффекты субстанции Сg и фракций оценивали в сравнении с официнальным иммуностимулятором растительного происхождения – настойкой эхинацеи пурпурной (ООО «Ватхэм-Фармация», рег. № ЛСР-007043/09). Экспериментальную модель иммунодепрессии у животных создавали однократным введением циклофосфана (ОАО «Биохимик», г. Саранск, рег. № Р N001579/01, далее ЦФ), внутривенно в дозе 250 мг/кг. Полученные результаты обрабатывали с использованием пакетов программ «IBM SPSS Statistics 19» и «Statistica 6.1». Результаты исследования представлены в виде медианы с интерквартильным размахом. Для проверки статистической значимости различий показателей использовали непараметрические критерии – Манна-Уитни (для сравнения независимых выборок), различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты. Установили, что надземная и подземная части растения содержат следующие БАС:

- 1,469-1,658 % эфирного масла, доминирующим компонентом (98,45 %) которого является простой фенилпропаноид из группы фенилпропанов – эвгенол;
- 29 фенольных соединений (7 кумаринов, 6 фенолкарбоновых кислот, 16 флавоноидов).

Максимально фенольные соединения из сырья растения извлекались 40 %-ным спиртом этиловым. Субстанция Сg (проявившая наиболее выраженные иммунотропные свойства) содержала больше фенолкарбоновых кислот и меньше флавоноидов, чем другие суммарные извлечения. Преобладающими компонентами субстанции являлись простые фенилпропаноиды (производные коричневых кислот). Именно эти соединения, по-видимому, обеспечивают иммунокорригирующее действие извлечений *C. geoides*, как и сырья *E. purpurea* (Куркин В.А. и др., 2005). Кроме того, за иммунотропную активность изучаемых извлечений могут отвечать галловая и эллаговая кислоты (составляющие 15-19 % от массы извлечений). Другой не менее важной находкой явилось обнаружение в субстанции Сg после кислотного гидролиза 20-гидроксиэкдизона. Это соединение также может быть носителем иммунотропных свойств растения, так как известно о влиянии 20-гидроксиэкдизона на фагоцитарную активность лейкоцитов крови животных (Репина Е.Н. и др., 2004). С целью установления действующих веществ субстанции Сg были получены ее фракции, изучено их иммунотропное действие и химический состав. Подобный подход является традиционным для изучения суммарных растительных препаратов (Плотников М.Б. и др., 2000; Хобракова В.Б. и др., 2010). Исследовали химический состав фракций, имеющих значительный выход экстрактивных веществ (бутаноловой, ацетоновой, этаноловой и водной) до и после кислотного гидролиза. Наиболее богатыми БАС оказались 2 фракции: водная (СgА) и этаноловая (СgЕ). В водную фракцию в значительной степени переходили соединения II (81,0 %), эллаговая (61,78 %), галловая (53,67 %) и *m*-кумаровая кислоты (43,19 %), 20-гидроксиэкдизон (100 %); в этаноловую фракцию – соединение III (25,43 %) кемпферол (16,88 %), *m*-кумаровая кислота (36,41 %). В составе изученных фракций БАС, как и в цельной субстанции, преобладали фенолокислоты (в том числе простые фенилпропаноиды), извлекаемые и этанолом, и водой. Далее оценивали иммунотропные свойства двух фракций – СgА и СgЕ которые имели наибольший выход БАС (45,7 % и 51,3 % соответственно) в отношении показателей, которые стимулировало (или корригировало) применение цельной субстанции Сg. Исследуемые фракции проявили менее выраженное стимулирующее действие на фагоцитоз перитонеальных нейтрофилов, чем цельная субстанции Сg. Действие фракции СgЕ было достоверно ниже, чем у цельной субстанции Сg, а фракции СgА –

сопоставимо с ее действием. Фракция СgА стимулировала активность фагоцитоза в 1,89 раза (цельная субстанция – в 2,18 раза), интенсивность фагоцитоза – в 1,39 раза (цельная субстанция – в 1,23). В эксперименте *in vivo* обе фракции проявили, в целом, менее выраженное стимулирующее действие на фагоцитарную активность. Но на способность перитонеальных нейтрофилов к окислительному взрыву в большей степени влияли фракции субстанции Сg: СgЕ – в 4,00 раза, СgА – в 2,71 раза, что достоверно ($p=0,000$ и $0,007$ соответственно) выше показателей животных, получавшей цельную субстанцию Сg. Фракции субстанции Сg оказывали также неодинаковое влияние на первичный гуморальный иммунный ответ и иммунопролиферативные процессы в селезенке в обычных условиях и при экспериментальном иммунодефиците. СgА по влиянию на все исследованные показатели иммунного ответа превосходила СgЕ, но ее эффект был сопоставим с действием цельной субстанции Сg, а по влиянию на пролиферацию антителообразующих клеток селезенки (АОК) – достоверно ниже. Фракции субстанции Сg влияли на клеточный иммунный ответ в целом так же, как цельное извлечение. Однако угнетающее действие на сенсибилизирующей стадии иммунного ответа было выражено сильнее. Кроме того, СgЕ оказало более эффективное стимулирующее действие на синтез провоспалительных цитокинов на разрешающей стадии иммунного ответа.

Заключение. Таким образом, иммунотропная активность фракций субстанции Сg несколько различается. Водная фракция в большей мере стимулирует активность фагоцитоза и способность нейтрофилов к окислительному взрыву, лимфопротропные процессы в селезенке и синтез иммуноглобулинов в процессе гуморального иммунного ответа; синтез провоспалительных цитокинов на стадии разрешения реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Эффект этанольной фракции более направлен на увеличение интенсивности фагоцитоза и угнетение пролиферации антигенспецифических клонов Т-лимфоцитов на стадии сенсибилизации ГЗТ. Исследованные фракции не оказали иммунокорректирующего действия на пролиферацию АОК селезенки (которое проявляет цельная субстанция). Иммуностимулирующим и иммунокорректирующим действием в той или иной степени обладают обе изученные фракции, что подтверждается сходным химическим составом. Более выраженный эффект водной фракции, скорее всего, зависит от 20-гидроксиэкдизона, который полностью (100 %) переходит в эту фракцию. Однако по суммарной эффективности исследуемые фракции уступают цельной субстанции Сg. Свою роль в реализации иммунотропного эффекта, возможно, играют и другие БАС, содержащиеся в ней. Поэтому для получения препаратов с иммунотропным действием из сырья *S. geoides* следует использовать цельное суммарное извлечение, получаемое из сырья 40 %-ным этанолом. К такому же выводу приходят и другие авторы, изучающие фармакологические эффекты комплексов БАС растительного происхождения (Плотников М.Б. и др., 2000; Шилова И.В. и др., 2012). Действующими веществами, обуславливающими иммуностимулирующие и иммунокорректирующие свойства разработанной фармацевтической субстанции из сырья *S. geoides*, по-видимому, являются простые фенилпропаноиды (фенилпропаны и производные коричных кислот) и 20-гидроксиэкдизон.

Литература

1. Дутова С.В., Карпова М.А. Результаты доклинического исследования нового иммунокорректора растительного происхождения. *Российский иммунологический журнал*. 2019;13(22):239-241.
2. Ильина И.Г., Рудакова И.П., Самылина И.А. Антиоксиданты: фармацевтические и биохимические аспекты применения. *Фармация*. 2013;8:С.3-6.
3. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Ежков В.Н. Фенилпропаноиды лекарственных растений: Монография. Самара: ООО «Офорт», 2005. 126с.
4. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 944с.
5. Плотников М.Б., Зибарева Л.Н., Васильев А.С. Гемореологическая активность экдистерона и различных фракций экстракта из наземной части *Lychnis chalcidonica L. in vitro*. *Растительные ресурсы*. 2000;36(3):91.
6. Репина Е.Н., Мойсеенко Н. А., Иванкова Ж. Е. Влияние 20- гидроксидизона из растений *Serratula sogonata L.* на свойства белой и красной крови кроликов породы шиншилла. *Фундаментальные исследования*. 2004; 2:151-153.
7. Хобракова В.Б. К механизму иммуномодулирующего действия растительного средства при экспериментальной иммуносупрессии. *Вестник Бурятского государственного университета*. 2012;SC:169-172.
8. Хобракова В.Б., Шоболова А.Б., Олейников Д.Н., Николаев С.М. Влияние сухого экстракта софоры желтоватой и выделенных из нее фракций на состояние клеточного звена иммунного ответа. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН*. 2010;2:219-221.
9. Шилова И.В., Семенов А.А., Кувачева Н.В. Выделение, идентификация и ноотропная активность веществ хлороформной фракции экстракта альфредии поникшей. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(6):С.60-66.

ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОИДОВ КОРЫ ОРЕХА ЧЕРНОГО (*JUGLANS NIGRA* L.)

Н.И. Зименкина*, В.А. Куркин

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара, Россия
e-mail: n.i.zimenkina@samsmu.ru

Ключевые слова: орех черный, *Juglans nigra* L., кора, ВЭЖХ, флавоноиды, мирицитрин, спектрофотометрия.

Введение. Орех черный (*Juglans nigra* L.) является перспективным видом лекарственного растительного сырья (Губанов И.А. и др., 1976; Paudel P. et al., 2013). На наш взгляд, кора ореха черного (*Juglans nigra* L.) представляет интерес в качестве нового вида лекарственного растительного сырья. Проведенные ранее исследования показали, что кора ореха черного содержит, кроме различных производных нафтохинона, являющихся ведущей группой биологически активных соединений (БАС), и другие химические вещества: азотистые вещества, тритерпены и фенольные соединения, в том числе флавоноиды, которые могут вносить существенный вклад в фармакологическое действие (Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н., 2010; Hasan T.N. et al., 2011; Ильичева Е.С. и др., 2015; Куркин В.А., 2019). Данные сведения свидетельствуют об актуальности изучения флавоноидов коры ореха черного. Известно, что одним из диганостически значимых флавоноидов лекарственного сырья видов рода *Juglans* является мирицитрин (Cosmulescu S. et al., 2014). Вопросы количественного определения основных групп БАС лекарственного растительного сырья (ЛРС) играют важную роль в процессе его стандартизации (Дайронас Ж.В., 2013). Следовательно, существует необходимость в определении содержания БАС с помощью современных инструментальных методов.

Цель. Цель настоящего исследования заключалась в разработке подходов к количественному определению флавоноидов коры ореха черного (*Juglans nigra* L.) с помощью спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материалы и методы. Исследовали кору ореха черного (*Juglans nigra* L.). Образцы коры были собраны в период сокодвижения (апрель) в 2020 году в Ботаническом саду Самарского университета. Для проведения анализа получали водно-спиртовые извлечения из коры ореха черного с использованием стандартного образца (СО) мирицитрина с целью количественной оценки различными методами (спектрофотометрия, ВЭЖХ). Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena, Германия). Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: изократический режим, стальная колонка «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза ацетонитрил : 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 2:8, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента - 2000 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 360 нм. Объемы инжестируемых проб: 4 мкл (мирицитрин и извлечение из коры ореха черного). Исследование ЛРС осуществлялось в соответствии с требованиями ОФС. 1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» ГФ РФ XIV издания (Государственная Фармакопея XIV издание).

Результаты и обсуждение. Ранее было проведено выделение химических соединений и определение флавоноидного состава коры ореха черного. С использованием УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии были идентифицированы доминирующий флавоноид – мирицитрин (мирицетин-3-О-α-L-рамнопиранозид), и его агликон – мирицетин, имеющий строение 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона. Полученные электронные спектры водно-спиртовых извлечений коры ореха черного имеют два максимума поглощения, что характерно для флавоноидов. Определено, что в УФ-спектре водно-спиртового извлечений наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов. Принимая во внимание тот факт, что максимумы поглощения раствора выделенного флавоноида и водно-спиртового извлечения коры ореха черного находятся в области 416 нм (дифференциальный вариант), целесообразным является определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин при длине волны 416 нм (рис. 1А и 1Б).

С целью исследования содержания спирто-водных извлечений коры ореха черного для количественного определения суммы флавоноидов ранее были определены оптимальные условия экстракции флавоноидов. При использовании метода ВЭЖХ определено, что в указанных условиях хроматографирования при использовании системы ацетонитрил – вода в соотношении 2:8 возможно идентифицировать анализируемый компонент – мирицитрин (рис. 2А и 2Б).

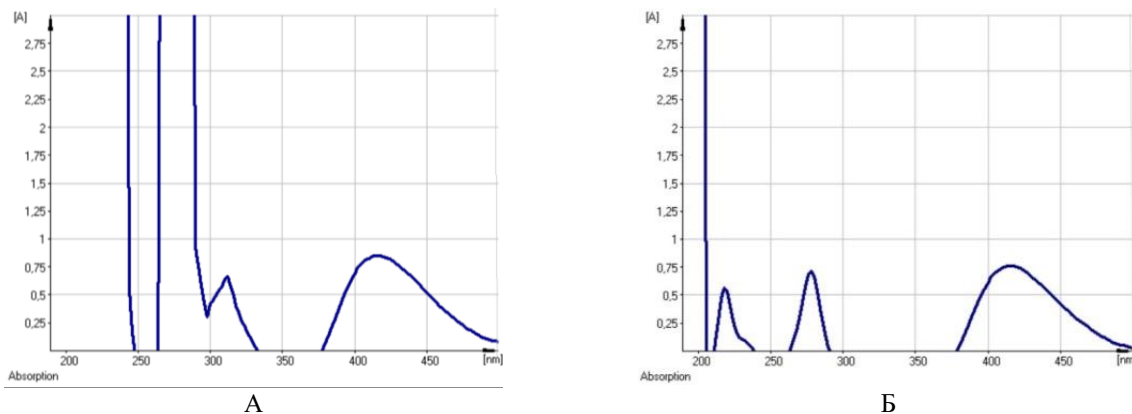


Рис. 1. Электронные спектры растворов 70% водно-спиртового извлечения ЛРС ореха черного и стандартного образца (СО) рутина
 Обозначения: А – раствор 70% водно-спиртового извлечения из коры ореха черного (дифференциальный вариант); Б – электронный спектр раствора рутина (дифференциальный вариант)

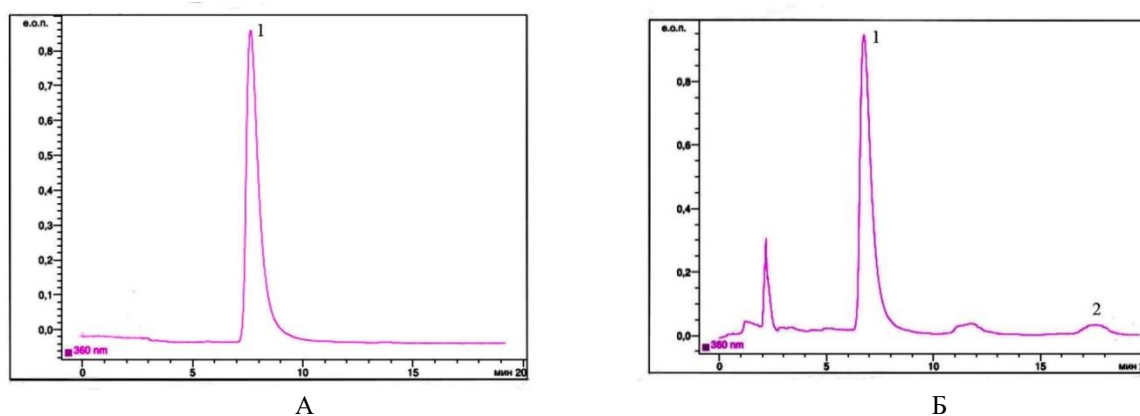


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограммы.
 Обозначения: А – ВЭЖХ-хроматограмма рутина: 1 – рутин; Б – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из коры ореха черного: 1 – рутин; 2 – рутин

Принимая во внимание невысокое содержание рутина в извлечении по сравнению с рутином, считаем целесообразным количественный анализ осуществлять только по рутину. Пробоподготовка заключалась в приготовлении спирто-водного извлечения коры ореха черного. 4 мкл полученного раствора инжестировали в хроматограф и анализировали в тех же условиях, что и СО рутина. Результаты количественной оценки содержания флавоноидов методами спектрофотометрии и ВЭЖХ представлены в таблице 1.

Таблица 1. Количественная оценка содержания флавоноидов коры ореха черного (*Juglans nigra* L.)

№ п/п	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (в %)	Метод количественного определения	Содержание (%)
1.	Кора ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, март 2020 г.)	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье методом УФ-спектрофотометрии	3,63±0,16
2.		Содержание рутина методом ВЭЖХ	3,10±0,18

Заключение. Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности количественного определения содержания суммы флавоноидов в коре ореха черного в пересчете на рутин методом УФ-спектрофотометрии, а также определения содержания доминирующего и диагностически значимого флавоноида – рутина в данном сырье с использованием метода ВЭЖХ и детектированием на УФ-детекторе при длине волны 360 нм.

Литература

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание [Электронный ресурс]. МЗ РФ. Москва, 2018; Т.2: 2327–2348. URL: http://resource.ruscml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/513/index.html (Дата обращения 22.02.2021 г.).
2. Губанов И.А., Крылова И.Л., Тихонова В.Л. Дикорастущие полезные растения СССР. – М.: Мысль, 1976:81–85.
3. Дайронас Ж.В. Определение нафтохинонов в сырье и фитопрепарате ореха черного - *Juglans nigra* L. Фармация. 2013;4:12-14.
4. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Орех грецкий - перспективное лекарственное растение (обзор литературы). Традиционная медицина: Российский фитотерапевтический съезд: сб. науч. тр. съезда 22-23 октября 2010 г. 2010;3(22):118-123.
5. Ильичева Е.С. Основные способы получения 5-окси-1,4-нафтохинона (юглона) - антибактериального препарата широкого спектра действия. Вестник Казанского технологического университета. 2015;18(3):147-150.
6. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармац. вузов - Изд. 4-е, перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт», ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2019: 1278 с.
7. Cosmulescu S., Trandafir I., Nour V. Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia*) leaves. *Pharm. Biol.* 2014;52(5):575-580. DOI: 10.3109/13880209.2013.853813.
8. Hasan T.N., B L.G., Shafi G., Al-Hazzani A.A., Alshatwi A.A. Anti-proliferative effects of organic extracts from root bark of *Juglans regia* L. (RBJR) on MDA-MB-231 human breast cancer cells: role of Bcl-2/Bax, caspases and Trp53. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2011;12(2):525–530.
9. Paudel P. *Juglans regia* and *J. nigra*, two trees important in traditional medicine: A comparison of leaf essential oil compositions and biological activities. *Nat. Prod. Commun.* 2013; 8(10):1481-1486.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНЫХ ЭКСТРАКТОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *PODOPHYLLUM PELTATUM*, В ОТНОШЕНИИ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

М.П. Китаева^{1*}, Т.А. Федотчева^{1,2}, А.В. Семейкин²

¹ФГБНУ ВИЛАР, г. Москва, Россия

²ФГБНУ ВИЛАР, ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва, Россия

e-mail:kimape@mail.ru

Ключевые слова: подофилл щитовидный, *Podophyllum peltatum*, фенольные соединения, каллусная культура, цитотоксическая активность, лейкемия.

Введение. Одно из главных направлений в современной фармации – поиск биологически активных веществ (БАВ), обладающих противоопухолевой активностью. Основные группы БАВ с противоопухолевыми свойствами, синтезируемые растениями, являются вторичными метаболитами. Это, прежде всего, фенольные соединения и алкалоиды. И те, и другие группы БАВ содержатся в растениях рода *Podophyllum* (семейство *Berberidaceae*): в Северной Америке - подофилл щитовидный *Podophyllum peltatum* L., в Китае, Тибете, Индии - подофилл Эмода (гималайский, шеститычиночный) *Podophyllum emodi* Wall. (*P. hexandrum*) (Kumar P. et al., 2015; Ardalani H. et al., 2017). Обнаружили биологическую активность соединений подофилла при следующих формах опухолей: рак толстой кишки, шейки матки, промиелоцитарный лейкоз, генитальные и аногенитальные кондиломы (Ardalani H. et al., 2017), рак легких (Ardalani H. et al., 2017; Zhao W. et al., 2021), яичников (Zhao W. et al., 2021), гепатоциркулярная карцинома (Chen H. et al., 2020), рак молочной железы (Mazzio E. et al., 2014), простаты (Hu Sh. et al., 2016). На основе биологически активных фенольных соединений (подофиллотоксин и его производные, пельтатины) (Avula Bh. et al., 2011), содержащихся в растении, разработали, исследовали и зарегистрировали новые противоопухолевые лекарственные средства: эпопозид (Kumar P. et al., 2015; Ardalani H. et al., 2017; Zhao W. et al., 2021), эпопифос, тенипозид, кондилилин (Kumar P. et al., 2015; Ardalani H. et al., 2017), Pod-Ben-25, Condofil, Verrusol, Warticon (Kumar P. et al., 2015) и некоторые другие. При этом современная фармация рассматривает в качестве источников противоопухолевых БАВ не только растительное сырье, но и биотехнологическое. Это удобный ресурс: выход БАВ не зависит от сезонности, климатических, погодных условий. Сбор биотехнологического урожая не истощает природных запасов. Помимо этого, методами клеточной и генной инженерии можно создавать клеточные линии, полученные из высокопродуктивных по определенным БАВ растениям, с особыми свойствами, синтезирующие особенно ценные вещества в нужном количестве. В частности, из растений рода *Podophyllum* в США, Бразилии, Китае, Индии и некоторых других странах получили каллусные, суспензионные, эмбриогенные клеточные культуры, культуры «бородатых» корней (Rajesh M. et al., 2014; Kumari A. et al., 2017).

Цель. Изучить цитотоксическую активность экстрактов каллусных клеточных культур *Podophyllum peltatum* L., полученных из плода, почки и корня растения, находящегося в коллекции ФГБНУ ВИЛАР. Ранее были проведены морфофизиологические исследования клеточных культур, первичный анализ летучих соединений в культурах клеток, а также подобран экстрагент для извлечения наибольшего

количества экстракта, содержащего комплекс лигнанов (Китаева М.П. и др., 2020 а,б,в). Текущее исследование продолжает начатые ранее эксперименты и позволяет получить новую информацию о биологической активности клеточных культур *P. peltatum*.

Материалы и методы. Каллусную клеточную культуру выращивали на твердой питательной среде Мурашиге и Скуга, в чашках Петри, в термостате, при постоянной температуре 26 °С, без освещения в течение 30 суток. Клеточную биомассу высушивали при температуре 26 °С в течение 7 суток. Высушенную клеточную культуру взвешивали, измельчали. Для получения экстракта использовали ацетон 80 % (Engström M.T. et al., 2015). Навеска биотехнологического сырья составляла 30 мг. Определение цитотоксической активности проводили посредством резазурин-теста (Иксанова А.Г. и др., 2016; Китаева М.П., 2020). Клеточная культура, на которой оценивали цитотоксический эффект, - K562 (лейкемические клетки человека). Экстракт добавляли в лунки планшета к опухолевым клеткам в четырех разведениях: 10, 1, 0,1 и 0,01 % экстракта в максимальной концентрации. Время инкубации опухолевых клеток с экстрактом - 72 часа при 37 °С. Данные по оптической плотности нормализовали по оптической плотности клеточной культуры опухолевых клеток без добавления экстрактов (отрицательный контроль). Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel. Уровень значимости отличий полученных результатов от контроля определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Результаты. Экстракты из каллусных культур, полученных из разных частей растения, в максимальной изученной концентрации проявили примерно одинаковую достоверную (при уровне значимости $p=0,05$) цитотоксическую активность по сравнению с отрицательным контролем - 52-54 % жизнеспособность опухолевых клеток. При этом экстракт из корневищ с корнями в изучаемом диапазоне концентраций показал жизнеспособность клеток - 31-39 %, а экстракт из листьев - максимальное значение 24 % жизнеспособных клеток при концентрации 0,1 % и минимальное значение 55 % жизнеспособных клеток при концентрациях 10 и 0,01 %. Можно предположить, что указанная особенность соответствует распространенной тенденции в биотехнологии растений, связанной с тем, что при переходе от растений к культуре клеток начальное содержание действующих веществ оказывается ниже в культуре клеток, чем в частях интактных растений.

Заключение. По результатам исследования цитотоксической активности экстрактов из каллусных культур, полученных из плода, почки и корня растения *Podophyllum peltatum* в сравнении с экстрактами из частей нативного растения, обнаружено, что более высокую цитотоксическую активность проявили экстракты из нативного сырья. Каллусные культуры проявляли цитотоксическую активность в отношении лейкемических клеток человека только при максимальной концентрации экстракта, а экстракты из нативного сырья - во всем изучаемом диапазоне концентраций. Необходимо проведение дальнейших исследований для определения диапазона действующих концентраций экстрактов из каллусных культур.

Литература

1. Иксанова А.Г., Бондарь О.В., Балакин К.В. Методы исследования цитотоксичности при скрининге лекарственных препаратов. Казань: Казанский университет. 2016. 40 с.
2. Китаева М.П. Выбор метода для определения цитостатического действия экстрактов клеточной культуры *Podophyllum peltatum*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):80.
3. Китаева М.П., Савина Т.А., Федотчева Т.А. Влияние условий экстрагирования на состав смолы подофиллин, полученной из суспензионной культуры *Podophyllum peltatum*. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2020а;23(7):30-34.
4. Китаева М.П., Федотчева Т.А. Микроскопический анализ суспензионной клеточной культуры *Podophyllum peltatum*. Международная научная конференция "От растения до лекарственного препарата". Сборник научных трудов. М.: ФГБНУ ВИЛАР. 2020б:165-170.
5. Китаева М.П., Копытько Я.Ф., Федотчева Т.А. Изучение химического состава летучих веществ клеточной культуры *Podophyllum peltatum*. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2020в;23(5):45-53.
6. Ardalani H., Avan A., Ghayour-Mobarhan M. Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2017;7(4):285-294.
7. Avula Bh., Wang Y.H., Moraes R.M., Khan I.A. Rapid analysis of lignans from leaves of *Podophyllum peltatum* L. samples using UPLC-UV-MS. *Biomedical Chromatography*. 2011;25(11):1230-1236.
8. Chen H., Zhang M., Wang Z., Li L., Li Q., Wang H. The Effect of h-53-R249S on the Suppression of Hepatocellular Carcinoma Cells Survival Induced by *Podophyllum* Derivatives. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2020;20(7):865-874.
9. Engström M.T., Päljärvi M., Salminen J.P. Rapid Fingerprint Analysis of Plant Extracts for Ellagitannins, Gallic Acid, and Quinic Acid Derivatives and Quercetin-, Kaempferol- and Myricetin-Based Flavonol Glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(16):4068-4079.
10. Hu Sh., Zhou Q., Wu W.R., Duan Yi.X., Gao Z.Y., Li Y.W., Lu Q. Anticancer effect of deoxypodophyllotoxin induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Oncology Letters*. 2016;12(4):2918-2923.

11. Kumar P., Pal T., Sharma N., Kumar V., Sood H., Chauhan R.S.. Expression analysis of biosynthetic pathway genes vis-à-vis podophyllotoxin content in *Podophyllum hexandrum* Royle. *Protoplasma*. 2015;252(5):1253-1262.
12. Kumari A., Singh Dh., Kumari S. Biotechnological interventions for harnessing podophyllotoxin from plant and fungal species: current status, challenges, and opportunities for its commercialization. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017;37(6):739-753.
13. Mazzio E., Badisa R., Mack N., Deiab S., Soliman K. F. High throughput screening of natural products for anti-mitotic effects in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. *Phytoterapy Research*. 2014;28(6):856-867.
14. Rajesh M., Sivanandhan G., Jeyaraj M., Chackravarthy R., Manickavasagam M., Selvaraj N., Ganapathi A. An efficient in vitro system for somatic embryogenesis and podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* Royle. *Protoplasma*. 2014;251(5):1231-43.
15. Zhao W., Cong Y., Li H.M., Li Sh., Shen Y., Qi Q., Zhang Y., Li Y.Zh., Tang Y.J. Challenges and potential for improving the druggability of podophyllotoxin-derived drugs in cancer chemotherapy. *Natural Product Reports*. 2021;38(3):470-488.

СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *URTICA DIOICA* L.

В УСЛОВИЯХ СРЕДНЕЙ ТАЙГИ

И.В. Кравченко^{1*}, Л.Ф. Шепелева²

¹БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа-Югры «Сургутский государственный университет», г. Сургут, Россия

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия
e-mail:kravinessa@mail.ru

Ключевые слова: крапива двудомная, *Urtica dioica* L., хлорофилл, флавоноиды, каротиноиды.

Введение. Потребность фармакологической промышленности в лекарственном растительном материале возрастает с каждым годом. Исследования биохимического состава растительного сырья приобретают особую значимость в связи с постоянно возрастающим техногенным давлением на природные объекты (Чупахина Г.Н. и др., 2012). Особенно актуальна эта проблема для Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (ХМАО), на территории которого расположены предприятия нефтегазовой промышленности. Важным условием для проведения таких исследований является сбор количественных результатов по содержанию биологически активных веществ (хлорофиллов, каротиноидов, показателей флавоноидных соединений). Крапива двудомная (*Urtica dioica* L.) – это многолетнее растение, произрастающее почти на всей территории Российской Федерации (Кавказ, Западная и Восточная Сибирь и др.). В фитотерапии водные экстракты, сок, настой из листьев крапивы, экстракты корней и корневищ используются для лечения заболеваний с различной этиологией (Буданцев А.Л., 2008). Из зелёной фитомассы *Urtica dioica* получают водные экстракты, которые оказывают противовоспалительное, анальгезирующее, гепатопротекторное, гипогликемическое действие на организм человека (Буданцев А.Л., 2008). Настой из листьев крапивы используют при лечении аллергических заболеваний у детей. Экстракты корневищ и зелёной массы лекарственных растений *Urtica dioica* обладают гипотензивным и антиоксидантным действием. Помимо этого, водный экстракт крапивы двудомной оказывает антибактериальную, антивирусную и антимутагенную активность (Буданцев А.Л., 2008). Отсутствие результатов по экологическому мониторингу состояния дикоросов, произрастающих на территории ХМАО, определило выбор данной темы исследования.

Цель. Изучение содержания пигментов фотосинтеза (хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, каротиноидов и флавоноидных соединений) в зелёной фитомассе крапивы двудомной *Urtica dioica* L., произрастающей в условиях средней тайги на территории г. Сургута и Сургутского района Ханты-Мансийского автономного округа – Югры.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были выбраны надземные части (листья и стебли) крапивы двудомной и образцы для сравнения – аптечное сырьё и растения, произрастающие на территории Краснодарского края (окрестности г. Горячий ключ). Выбор данного вида растений для исследований обусловлен тем, что крапива двудомная является широко распространённым представителем флоры лекарственных растений на территории России. Произрастает она повсюду (в лесах, зарослях кустарников, на пустырях, вдоль дорог, в местах скопления мусора) (Буданцев А.Л., 2008). *Urtica dioica* – это ценное лекарственное растение, содержащее изопреноиды, стероиды, каротиноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, флавоноидные соединения, органические кислоты, витамины, алкалоидные и другие азотсодержащие соединения, высшие жирные кислоты, жирное масло и др. (Буданцев А.Л., 2008). Сбор лекарственного сырья крапивы двудомной производился летом 2018 г. и 2021 г. с пробных площадок (ПП) в соответствии с ГОСТ 24.027.0-80 во время основного периода вегетации (с июня по сентябрь) (табл. 1). Для исследований отбиралась средняя проба и допустимые отклонения ее не должны были превышать ± 10%. В качестве контроля были взяты аптечный образец и растительное сырьё из окрестностей г. Горячий ключ Краснодарского края. В ходе работы были отобраны надземные части растений – листья и стебли.

Геоботаническое описание растительности пробных площадей и лекарственного растительного материала выполнено с помощью стандартных методов (Лавренко Е.М., Корчагина А.А., 1972). Определение лекарственных растений проводилось с использованием определителя Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (Красноборова И.М., 2006).

Таблица 1. Характеристика пробных площадей

Пробная площадка	Описание территории
ПП1	Окрестности деревни Юган Сургутского района ХМАО, ивняк вейниково-разнотравный, развитый на гриве прирусловой поймы р. Юган
ПП2	Окрестности г. Горячий Ключ Краснодарского Края
ПП3	Сургут, территория городского парка «За Саймой», смешанный березово-сосновый лес кустарничково-мелкотравный, нарушенный, развитый по берегу реки Сайма

Растительный материал высушивали до воздушно-сухого состояния и измельчали с помощью лабораторного гомогенизатора. Далее все образцы были упакованы в конверты, зафиксированы дата, место сбора, наименование растительного образца. Содержание фотосинтетических пигментов: хлорофилла *a*, *b*, каротиноидов и показателей флавоноидных соединений определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-1900i. Оптическую плотность спиртовых вытяжек определяли при длинах волн: хлорофилл *a* – 665 нм, хлорофилл *b* – 649 нм, каротиноиды – 470 нм (Мокрососов А.Т., 1994), показатели флавоноидных соединений – 410 нм (Государственная фармакопея, 12 изд.; Русак С.Н., 2012). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью стандартных методов. Работа проведена в Научно-образовательном центре института Естественных и технических наук БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа-Югры «Сургутский государственный университет» в рамках проекта «Технология выращивания и извлечения биологически активных соединений северных ягодных культур и лекарственных трав (ЮграБиоФарм)», а также в соответствии с государственным заданием Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проекты № 5.4004.2017/4.6, № 0721-2020-0019).

Результаты. Результаты проведённых биохимических анализов показали, что содержание хлорофилла *a* в листьях *Urtica dioica* находилось в пределах от 0,72-2,76 мг/г сухого вещества, хлорофилла *b* - от 0,39 до 1,42 мг/г сухого вещества, каротиноидов - от 0,08 до 0,63 мг/г сухого вещества (табл. 2).

Таблица 2. Содержание биологически активных веществ (хлорофиллов, каротиноидов и показателей флавоноидных соединений) в зелёной фитомассе *Urtica dioica*

Пробные площадки (ПП)	Хлорофилл <i>a</i> , мг/г	Хлорофилл <i>b</i> , мг/г	Каротиноиды, мг/г	Флавоноиды, %
ПП1	2,76±0,03	1,42±0,03	0,63±0,03	2,22±0,06
ПП2	1,62±0,03	0,99±0,02	0,15±0,006	0,95±0,04
ПП3	0,72±0,03	0,39±0,03	0,08±0,003	2,00±0,05
Контроль	1,69±0,03	0,82±0,03	0,27±0,01	1,26±0,03

Растения с ПП1 содержат наибольшее количество биологически активных веществ (хлорофиллов, каротиноидов и показателей флавоноидных соединений), в отличие от образцов с других пробных площадок (таблица 2). Это объясняется благоприятными условиями произрастания растений *Urtica dioica* в окрестностях д. Юган, где развит лесной покров и отсутствует сильный антропогенный пресс. Наименьшее содержание пигментов фотосинтеза обнаружено в образцах с ПП3. Территория парка «За Саймой» широко используется как место отдыха горожан и нарушена рекреационным воздействием. Вероятно, что на состоянии растительного покрова также сказывается и общее загрязнение воздушной среды г. Сургута. У растений с этой пробной площадки выявлен высокий уровень флавоноидных соединений, что объясняется высокой чувствительностью данного показателя к изменению экологических условий произрастания. Следует отметить, что в целом образцы *Urtica dioica*, отобранные на территории ХМАО, отличаются высоким содержанием флавоноидов, что характерно для северных регионов (Боначева В.М. и др., 2014; Дренин А.А., Ботиров Э.Х., 2017). В контрольных образцах и в образцах с ПП2 содержание пигментов фотосинтеза и флавоноидов находилось примерно на одном уровне.

Заключение. Полученные результаты могут быть использованы для сравнения с аналогичными показателями у растений, произрастающих в условиях интродукции, а также на территориях с различной степенью техногенной нагрузки.

Литература

1. Боначева В.М., Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Флавоноиды *Equisetum arvense* L. и *Lathyrus pratensis* L. *Химия растительного сырья*. 2014;3:195–199.
2. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 1. Семейства *Magnoliaceae* – *Juglandaceae*,

- Ulmaceae, Moraceae, Cannabaceae, Urticaceae* / Отв. ред. А.Л. Буданцев. СПб.; М.: Товарищество научных изданий, КМК, 2008. 412 с.
- ГОСТ 24.027.0-80. Сырьё лекарственное растительное. Правила приемки и методы отбора проб. *Vegetal medicine raw stuff. Acceptance rules and sampling.* [Электронный ресурс]: / Режим доступа: <http://https://docs.cntd.ru/document/1200022938>. – Загл. с экрана.
 - Государственная фармакопея Российской Федерации; XII изд.-во М.: Медицина, 2015. Т. III. С. 428-436.
 - Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Флавоноиды и изофлавоноиды растений рода *Trifolium* l. структурное разнообразие и биологическая активность. *Химия растительного сырья*. 2017;3:39–53.
 - Лавренко Е.М., Корчагина А.А. Полевая геоботаника в 4 т. М., Л.: Изд-во АН СССР, 1959-1972. Т. 1-4.
 - Красноборова И.М. Определитель растений Ханты-Мансийского автономного округа / под ред. И.М. Красноборова; И.М. Красноборов, Д.Н. Шауло: Новосибирск-Екатеринбург: Издательство «Баско». 2006. 304 с.
 - Мокрососов А.Т. Малый практикум по физиологии растений: учеб. пособие / под ред. А.Т. Мокроносова. 9-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ. 1994. 184 с.
 - Русак С.Н., Кравченко И.В., Филимонова М.В., Башкатова Ю.В. Экологическая биохимия растений: химические и биохимические методы анализа: метод. рекомендации. Сургут: Издательский центр СурГУ. 2012. 24 с.
 - Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрыпник Л.Н., Бессережнова М.И. Реакция пигментной и антиоксидантной систем растений на загрязнение окружающей среды г. Калининграда выбросами автотранспорта. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2012;2(18):71–185.

МЕСТО И РОЛЬ ФАРМАКОГНОЗИИ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ

В.А. Куркин*

*ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара, Россия
e-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru*

Ключевые слова: фармакопейные растения, лекарственное растительное сырьё, лекарственные растительные препараты, биологически активные соединения, химическая классификация, стандартизация.

Введение. В настоящее время в медицинской практике Российской Федерации используется свыше 20 тыс. лекарственных средств, среди которых около 40% производится из лекарственного растительного сырья (ЛРС), а по прогнозам ВОЗ, удельный вес фитопрепаратов в ближайшие 15-20 лет может вырасти до 60 % (Куркин В.А., 2019). Следовательно, сегодня актуальным являются создание и внедрение оригинальных, а также конкурентоспособных импортозамещающих ЛРП в соответствии со Стратегией развития фармацевтической промышленности Российской Федерации и Стратегией лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025. Для успешной реализации данных стратегий имеются объективные предпосылки, поскольку в области фармакогнозии и фармации в целом за последние 15-20 лет произошли качественные изменения в плане изучения химического состава ЛРС, причем этому способствовало то обстоятельство, что данная наука обогатилась современными спектральными и физико-химическими методами. Так, использование ¹H-ЯМР- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии позволило исследователям изучить химическое строение целого ряда новых биологически активных соединений (БАС) (Куркина А.В., 2012; Куркин В.А., 2019). Включение методов тонкослойной хроматографии, газо-жидкостной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания открыло новые возможности для целей стандартизации ЛРС и фитопрепаратов.

Цель. Научное обоснование места и роли фармакогнозии как науки и учебной дисциплины в современной медицине и фармации.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования служили лекарственное растительное сырьё, лекарственные растительные препараты (ЛРП), биологические активные соединения, стандартные образцы растительных веществ. В работе использованы УФ-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, тонкослойная и колоночная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Результаты. Фармакогнозия как наука и учебная дисциплина, предметом которой является лекарственное сырьё растительного и животного происхождения, является одной из важнейших составляющих, формирующих модель специалиста фармацевтического профиля (провизор, фармацевт) (Муравьева Д.А. и др., 2002; Куркин В.А., 2019). Среди современных тенденций развития фармакогнозии заметное место занимают исследования, посвященные изучению химического состава ЛРС, совершенствованию химической классификации сырья и методов стандартизации (Куркин В.А., 2002; Муравьева Д.А. и др., 2002; Куркина А.В., 2012; Куркин В.А., 2019). На наш взгляд, вышедшая в свет Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания, наглядно иллюстрирует актуальность и значимость фармакогнозии как науки и учебной дисциплины. Так, в Государственную фармакопею Российской

Федерации XIV издания включен целый ряд новых общих фармакопейных статей (ОФС), посвященных, в частности, анализу эфирных масел, масел жирных растительных, дубильных веществ в ЛРС и др. Кроме того, в плане оценки качества лекарственных растительных препаратов особое значение имеют такие ОФС, как эфирное число, число омыления, йодное число, кислотное число, перекисное число, определение содержания экстрактивных веществ в ЛРС и ЛРП. Важно также подчеркнуть, что в рамках Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания критически пересмотрены методики количественного определения БАС, а также обоснованы новые числовые показатели, в том числе значения нижнего предела содержания действующих веществ. На основе глубокого изучения химического состава сырья лекарственных растений, а также зависимостей физических, физико-химических, спектральных и фармакологических свойств от химической природы выделенных веществ, используемых в качестве критерия подлинности и качества сырья и фитопрепаратов, показано, что биологически активные соединения следует рассматривать как важнейшую модель в формировании методологической базы для научного обоснования химической классификации ЛРС, методов стандартизации и технологических способов получения, а также показаний к применению соответствующих лекарственных растительных препаратов. На основе изучения физико-химических, спектральных и фармакологических свойств растительных метаболитов нами была разработана современная химическая классификация лекарственного сырья фармакопейных растений (Куркин В.А., 2002), что нашло отражение в учебнике «Фармакогнозия» (Куркин В.А., 2019). Результаты изучения химического состава сырья целого ряда лекарственных растений, а также систематизация литературных данных относительно компонентного состава ЛРС создали предпосылки для создания новых учебников по фармакогнозии (Муравьева Д.А. и др., 2002; Куркин В.А., 2019), в основу которых положена разработанная химическая классификация лекарственных растений (Куркин В.А. 2002; Куркин В.А., 2019). Обосновано, что химическая классификация лекарственного растительного сырья имеет фундаментальное значение не только для фармакогнозии, но и актуальна в фармацевтической технологии, фармацевтической химии, фармакологии и фитотерапии, в случае которых химическая природа биологически активных соединений должна рассматриваться как методологическая основа в плане научного обоснования стандартизации и технологии получения лекарственных препаратов. Показана целесообразность введения в фармакогнозию нового понятия – ведущей группы БАС, а также необходимость трактовки значимости с точки зрения проявления фармакологических эффектов, не одной, а, как правило, нескольких групп действующих веществ. При этом в качестве ведущей группы БАС предложено рассматривать действующие вещества, наиболее уязвимые с точки зрения физико-химических свойств на всех стадиях технологического процесса (возделывание, заготовка, сушка, переработка, хранение ЛРС и др.). Например, в случае эфиромасличного сырья, эфирное масло, как правило, рассматривается в качестве ведущей группы БАС из-за их летучести, термолабильности и других свойств. Важно подчеркнуть, что в настоящее время становится актуальной необходимость трактовки в большинстве видов ЛРС вклада в фармакологическую активность не одной, а, как правило, нескольких групп БАС: например, в родиоле розовой – это фенилпропаноиды и простые фенолы, в расторопше пятнистой – флаволигнаны и жирное масло, в мелиссе лекарственной – эфирное масло и фенилпропаноиды, в эхинацее пурпурной – фенилпропаноиды, полисахариды и алкиламины, в пионе уклоняющемся – монотерпеновые гликозиды, простые фенолы и эфирное масло, а в зверобое продырявленном – четыре группы действующих веществ: флавоноиды, антраценпроизводные, дубильные вещества и флороглюцины (гиперфорин). Это создает научную основу как с точки зрения объяснения фармакологических эффектов, так и в плане обоснования ресурсосберегающих технологий получения лекарственных растительных средств, включая комплексную переработку ЛРС. Например, в траве мелиссы лекарственной эфирное масло обуславливает в основном седативное и спазмолитическое действие, а фенилпропаноиды – анксиолитические, иммуномодулирующие, противовирусные, антигистаминные, антимикробные и другие свойства, причем в основном за счет розмариновой кислоты. Следует также подчеркнуть, что данная трактовка дает возможность по-новому взглянуть на мелиссу лекарственную в плане трактовки фармакологической группы: сегодня данное растение, являющееся формально седативным, следует рассматривать в первую очередь как анксиолитик (Куркин В.А., 2019). Кроме того, это создает перспективу совершенствования стандартизации ЛРС и фитопрепаратов, особенно с точки зрения современной мировой тенденции, предполагающей использование в методиках качественного и количественного анализа определение 2-3 групп БАС, имеющих диагностическое значение. В соответствии с этим в 107 видах ЛРС, включенных в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания, прослеживается тенденция к использованию методологического подхода, заключающегося в оценке качества ЛРС и ЛРП, как правило, не по одной, а по нескольким группам БАС. Особенно ярко это проявляется в случае ЛРС, содержащего в качестве БАС эфирные масла и флавоноиды (Куркина А.В., 2012). В рамках современной химической классификации ЛРС (Куркин В.А., 2002), которая положена в основу учебника «Фармакогнозия» (Куркин В.А., 2019), актуальным является аспект критического пересмотра отнесения некоторых лекарственных растений к какой-либо химической группе действующих веществ. Так, трава зверобоя продырявленная отнесена нами к флавоноидам, по содержанию которых в Российской Федерации осуществляется стандартизация данного сырья, но при этом предложено осуществлять контроль качества и по содержанию второй группы действующих веществ – антраценпроизводным, к которым ранее относилось данное растение. Критически также пересмотрено отнесение корневищ родиолы розовой, в которой на

момент введения в научную медицину в качестве действующих веществ были известны лишь простые фенолы. В ходе углубленного изучения химического корневищ родиолы розовой было установлено, что действующими веществами сырья данного растения являются также фенилпропаноиды, которые имеют диагностическое значение. Это стало основанием для пересмотра химической классификации, а также обоснования новых подходов к стандартизации корневищ родиолы розовой и препаратов на основе данного сырья, заключающихся в определении доминирующего фенилпропаноида – розавина (Куркин В.А., 2019). В фармакогнозию нами введены такие группы БАС, как фенилпропаноиды, ксантоны, хиноны, иридоиды, монотерпеновые гликозиды, экистероиды, ферменты. Отнесение к фенилпропаноидам таких растений, как родиола розовая (золотой корень), элеутерококк колючий, лимонник китайский, эхинацея пурпурная, сирень обыкновенная, расторопша пятнистая, позволяет не только обосновывать подходы к стандартизации сырья вышеперечисленных растений, но и прогнозировать для препаратов на их основе иммуномодулирующее действие, осуществлять целенаправленный поиск новых растений, влияющих на иммунную систему, а также обладающих адаптогенными, анксиолитическими, ноотропными, антидепрессантными, гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами.

Заключение. Таким образом, фармакогнозия имеет фундаментальное значение не только для фармации, но и для фитотерапии, а также медицины в целом, в случае которых химическая природа БАС должна рассматриваться как методологическая основа в плане обоснования методов стандартизации и технологических способов получения препаратов, объяснения особенностей фармакотерапевтического действия, прогнозирования фармакологических эффектов, а также поиска путей достижения эффективности и безопасности лечения с использованием препаратов на основе лекарственного растительного сырья.

Литература

1. Куркин В.А. Современные аспекты химической классификации биологически активных соединений лекарственных растений. *Фармация*. 2002;50(2):8-16.
2. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). 4-е изд., перераб. и доп. - Самара: ООО «Офорт», ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России; 2019. 1278 с.
3. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: Монография. - Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России. 2012. 290 с.
4. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: Учебник. М.: Медицина; 2002. 656 с.

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

В.А. Куркин*

*ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара, Россия -
mail: v.a.kurkin@samsmu.ru*

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, лекарственные растительные препараты, биологически активные соединения, фенольные соединения, стандартизация. **Введение.** Лекарственные растения, содержащие фенольные соединения, являются ценным источником адаптогенных, тонизирующих, ноотропных, антидепрессантных, анксиолитических, седативных, иммуномодулирующих, гепатопротекторных, желчегонных, антиоксидантных, противовирусных, антимикробных и противовоспалительных лекарственных средств (Muzychkina R.A., 1998; Муравьева Д.А. и др., 2002; Куркин В.А. и др., 2005; Andersen M., 2006; Загоскина Н.В. и др., 2010; Куркина А.В., 2012; Куркин В.А., 2019). В группе фенольных веществ наиболее распространенными являются фенилпропаноиды, флавоноиды, антраценпроизводные, простые фенолы, которые в силу огромного структурного разнообразия обладают широким спектром биологической активности (Muzychkina R.A., 1998; Муравьева Д.А. и др., 2002; Куркин В.А. и др., 2005; Andersen M., 2006; Загоскина Н.В. и др., 2010; Куркина А.В., 2012; Куркин В.А., 2019). При этом следует отметить, что на основе изучения физико-химических, спектральных и фармакологических свойств ранее была разработана современная классификация фенольных веществ (Куркин В.А., 2019), а также обоснована необходимость введения в фармакогнозию фенилпропаноидов как самостоятельного класса биологически активных соединений (БАС), что нашло отражение в учебнике «Фармакогнозия» (Государственная фармакопея, 14 издание). Интересно, что среди 107 видов лекарственного растительного сырья (ЛРС), включенных в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания, стандартизация более 70 % видов сырья осуществляется по содержанию фенольных соединений. В настоящее время одной из нерешенных в полной мере проблем является стандартизация лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных растительных препаратов (ЛРП), содержащих фенольные соединения, в том числе в плане гармонизации методических и методологических подходов к анализу, причем эта проблема особенно актуальна для ЛРС, содержащего флавоноиды. За последние 15-20 лет число фармакопейных видов сырья, отнесенных к флавоноидам,

увеличилось с 11 до 30 наименований (Куркина А.В., 2012). Кроме того, флавоноиды имеют статус второй группы БАС в 35 видах лекарственных растений, включая эфиромасличное сырье, а также виды, содержащие фенилпропаноиды, в частности, гидроксикоричные кислоты (Куркина А.В., 2012).

Цель. Обоснование новых подходов к созданию и стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих фенольные соединения.

Материалы и методы. В качестве объектов использованы корневища и биомасса родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), корневища и корни элеутерококка колючего [*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.], кора сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.), семена и плоды лимонника китайского (*Schizandra chinensis* Baill.), трава Melissa лекарственной (*Melissa officinalis* L.), листья гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.), трава зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) и зверобоя пятнистого (*Hypericum maculatum* Grantz.), трава эхинацеи пурпурной [*Echinacea purpurea* (L.) Moench.], плоды расторопши пятнистой [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.], листья гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.), цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), цветки бессмертника песчаного [*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.], почки тополя черного (*Populus nigra* L.), цветки календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), листья березы бородавчатой (*Betula verrucosa* Ehrh.), корни солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.), плоды черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.), плоды жостера слабительного (*Rhamnus cathartica* L.), кора крушины ольховидной (*Frangula alnus* Mill.), листья кассии остролистной (*Cassia acutifolia* Del.), корни шавеля конского (*Rumex confertus* Willd.), листья толокнянки обыкновенной [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.], листья брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) а также фенилпропаноиды, флавоноиды, антраценпроизводные и простые фенолы, выделенные из исследуемого ЛРС. В работе использованы тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), спектрофотометрия, ¹H-ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, различные химические превращения. ¹H-ЯМР-спектры получали на приборах «Bruker AM 300» (300 МГц), масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Kratos MS-30», регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). Контроль за разделением веществ с использованием колоночной хроматографии осуществляли с помощью ТСХ-анализа на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в различных системах растворителей.

Результаты. В настоящей работе обоснованы новые подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, содержащих фенольные соединения, с использованием стандартных образцов розавина, сирингина (элеутерозид В), гамма-схизандрин, розмариновой кислоты, цикориевой кислоты, арбутина, силибина, лавандозида (фенилпропаноиды), рутина, гиперозида, изосалипурпозид, ликуразида, пиностробина, цинарозида, тилианина, гинкгетина, 3,8¹¹-биаспигенина, никотифлорина, нарцисина, цианидин-3-О-глюкозида (флавоноиды), франгулина А, сеннозида В, 8-О-глюкозида эмодаина, 1,7-дигидрокси-3-карбоксиянтрахинона (антраценпроизводные), арбутина (простые фенолы). Разработаны методики качественного и количественного анализа исследуемых видов сырья и фитопрепаратов с использованием ТСХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии. В результате изучения химического состава целого ряда лекарственных растений выделены и охарактеризованы с использованием УФ-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, ТСХ и ВЭЖХ, различных химических превращений фенилпропаноиды, флавоноиды, антраценпроизводные и простые фенолы, представляющие интерес с точки зрения стандартизации сырья и препаратов соответствующих лекарственных растений. На основе изучения химического состава целого ряда видов ЛРС сформулированы подходы к стандартизации сырья и фитопрепаратов, заключающиеся в использовании в методиках анализа стандартных образцов розавина (родиола розовая), триандрин (биомасса родиолы розовой), сирингина (элеутерококк колючий, сирень обыкновенная), силибина (расторопша пятнистая), розмариновой кислоты (Melissa лекарственная), цикориевой кислоты (эхинацея пурпурная), гамма-схизандрин (лимонник китайский), гинкгетина (гинкго двулопастный), 3,8¹¹-биаспигенина (зверобой продырявленный), тилианина (пижма обыкновенная), цинарозида (пижма обыкновенная), гиперозида (береза бородавчатая, зверобой пятнистый), никотифлорина (гинкго двулопастный), нарцисина (календула лекарственная), изосалипурпозид (бессмертник песчаный), ликуразида (солодка голая), пиностробина (тополь черный), цианидин-3-О-глюкозида (черника обыкновенная, арония черноплодная), франгулина А (крушина ломкая, жостер слабительный), сеннозида В (сенна), 1,7-дигидрокси-3-карбоксиянтрахинона, или неореина (сенна), 8-О-β-D-глюкопиранозида эмодаина (щавель конский), арбутина (толокнянка обыкновенная, брусника обыкновенная). Принципиально новым направлением в области создания лекарственных растительных средств является использование фенилпропаноидов как самостоятельного класса биологически активных соединений в качестве перспективного источника адаптогенных, иммуномодулирующих, гепатопротекторных, антиоксидантных и нейротропных лекарственных средств. Это связано с тем, что в настоящее время одним из актуальных направлений фармации является разработка лекарственных средств, повышающих сопротивляемость организма человека к стрессам, повышенной техногенной нагрузке, а также активизирующих механизмы адаптации. В этом отношении особый интерес представляют лекарственные растения, содержащие фенилпропаноиды, которые в структурном плане являются производными коричных спиртов и коричных кислот. На примере фенилпропаноидов, введенных нами в фармакогнозию как самостоятельная группа БАС (Куркин В.А. и др., 2005; Куркин В.А., 2019), наглядно иллюстрируются новые возможности в плане разработки научно обоснованных подходов к стандартизации, технологии получения ЛРП, а также

показаний к применению фитопрепаратов. Отнесение к фенилпропаноидам таких растений, как родиола розовая (золотой корень), элеутерококк колючий, эхинацея пурпурная, сирень обыкновенная позволяет не только обосновать подходы к стандартизации сырья вышеперечисленных растений, но и прогнозировать для препаратов на их основе иммуномодулирующее действие, а также осуществлять целенаправленный поиск новых растений, влияющих на иммунную систему. Так, в препаратах на основе корневищ родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) тонирующая активность проявляется за счет фенилпропаноидов и простых фенолов, тогда как иммуномодулирующая и ноотропная активность обусловлена фенилпропаноидами, в частности, розавином. Большой интерес представляют вяжущие и антиоксидантные свойства родиолы розовой, обусловленные дубильными веществами и другими полифенолами. Высокое содержание розмариновой кислоты в траве Melissa лекарственной (*Melissa officinalis* L.) является серьезным аргументом для обоснования значимости данного сырья как источника анксиолитических, иммуномодулирующих и противовирусных средств, хотя формально это седативное растение. Логично вытекает значимость и цикориевой кислоты в плане иммуномодулирующего фактора препаратов эхинацеи пурпурной [*Echinacea purpurea* (L.) Moench.], хотя данный эффект проявляется и за счет полисахаридов. В ходе наших исследований установлено, что в плодах и семенах лимонника китайского (*Schizandra chinensis* Baill.) отечественного происхождения преобладает не схизандрин, как это считалось ранее, а гамма-схизандрин, для которого выявлена антиоксидантная и гепатопротекторная активность. В препаратах плодов расторопши пятнистой также сочетаются гепатопротекторные и антиоксидантные свойства, обусловленные флаволигнанами, в том числе силибином.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований на основе современной химической классификации сырья фармакопейных растений, а также физико-химических, спектральных и фармакологических свойств БАС обоснованы новые методологические подходы к стандартизации и технологии получения лекарственных растительных препаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения, содержащих фенольные соединения.

Литература

1. Загоскина Н.В. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. Под редакцией Загоскиной Н.В., Бурлаковой Е.Б. М.: Научный мир; 2010. 450 с.
2. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). 4-е изд., перераб. и доп. - Самара: ООО «Офорт», ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России; 2019. 1278 с.
3. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Ежков В.Н. Фенилпропаноиды лекарственных растений. Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ». 2005. 128 с.
4. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: Монография. Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. 290 с.
5. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: Учебник. М.: Медицина; 2002. 656 с.
6. Andersen M. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications. Ed. by Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham. Boca Raton; London; New York: CRC Press Taylor & Francis Group; 2006. 1197 p.
7. Muzychkina R.A. Natural Anthraquinones. Biological properties and physicochemical characteristics. Ed. by G.A. Tolstikov. Moscow: PHASIS, 1998. 864 p.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *ECHINOCYSTIS LOBATA* TORR. & A.GRAY МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Г.Р. Кутателадзе*

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России,

г. Барнаул, Россия

e-mail: goha-kut@mail.ru

Ключевые слова: аминокислоты, ТСХ, эхиноцистис лопастный, *Echinocystis lobata*, надземная часть.

Введение. Эхиноцистис лопастный (*Echinocystis lobata* Torr. & A.Gray) - однолетнее травянистое растение семейства Тыквенные (*Cucurbitaceae* Juss.) нашел применение в народной медицине при заболеваниях почек, предстательной железы, подагре и ревматизме (рис. 1) (Ielciu I. et al., 2017).



Рис. 1. Эхиноцистис лопастный (*Echinocystis lobata* Torr. & A.Gray)

Несмотря на наличие фармакологической активности, эхиноцистис не применяется в официальной медицине в силу недостаточной степени изученности. Следует отметить, что данное растение внесено в черный список растений Сибири как инвазивный вид, препятствующий возобновлению видов природной флоры, что указывает на возможность совместить заготовку растительного сырья от данного вида и ликвидировать неконтролируемые заросли (Виноградова Ю.К., 2016). Среди природных соединений определенным интерес вызывают аминокислоты как важнейшие элементы питания человека. Обладая широким спектром собственной фармакологической активности и способностью влиять на биодоступность других соединений, аминокислоты привлекают к себе все больше внимания в качестве лекарственных средств (Лысыков Ю.А., 2012). Кроме того, в растениях аминокислоты участвуют в биосинтезе некоторых вторичных метаболитов, например, алкалоидов, флавоноидов и сапонинов. В организме человека аминокислоты являются основой для синтеза белков и многих физиологически активных соединений небелковой природы, например, гормоны щитовидной железы, катехоламины (адреналин и норадреналин), серотонин и т.д. (Maeda H., Dudareva N., 2012).

Цель. Разделение и идентификация свободных аминокислот надземной части *Echinocystis lobata*.

Материалы и методы. Объектом исследования послужило растительное сырье – надземная часть *Echinocystis lobata*, собранная в период цветения (июнь) в 2020 году в Первомайском районе (окрестности пос. Токарево) и окрестностях г. Барнаула Алтайского края. Из растительного сырья получали водное извлечение (соотношение «сырье - экстрагент» - 1:10), охлаждали и фильтровали через бумажный фильтр. Полученное извлечение упаривали на водяной бане до сухого остатка, растворяли в 1 мл спирта этилового 40%. Хроматографирование проводили на пластинках «Sorbfil ПТСХ-П-А», наносили спиртовой раствор упаренного водного извлечения и 0,5% спиртовые растворы стандартных образцов (СО). Для разделения и идентификации свободных аминокислот использовали систему н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода очищенная – аммиака раствор 10% (40:10:20:1) (Шаршунова М., 1980). В качестве стандартных образцов использовали рабочие стандартные образцы следующих аминокислот (ООО «Сигма-Алдрич Рус»): глутамин, цистеин, аргинин, β-аланин, аминокислота, α-аланин, гистидин, валин, β-фенил-α-аланин, метионин. Детектировали аминокислоты по появлению розово-пурпурных пятен после обработки пластинки ацетоновым раствором нингидрина 0,25% с последующим нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100 – 105°C в течение 2-3 минут.

Результаты. Как следует из данных рисунка 2 и таблицы 1 в надземной части *Echinocystis lobata* по совпадению значений R_f исследуемого извлечения и СО аминокислот идентифицировано 7 соединений: глутамин, цистеин, аминокислота, гистидин, валин, β - фенил - α - аланин и метионин.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено что комплекс свободных аминокислот надземной части *Echinocystis lobata* состоит из глутамина, цистеина, аминокислоты, гистидина, валина, β-фенил-α-аланина и метионина. Три из обнаруженных аминокислот (валин, β-фенил-α-аланин, метионин) относят к группе незаменимых.

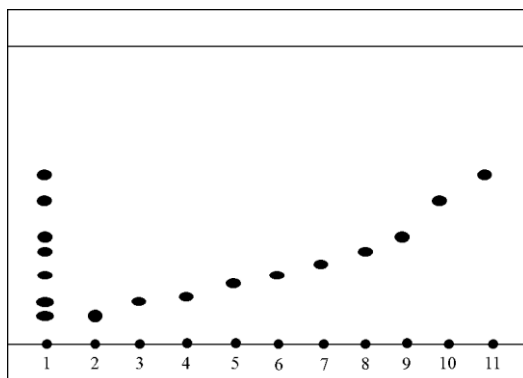


Рис. 2. Хроматограмма извлечения из надземной части *Echinocystis lobata* в системе н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода очищенная – аммиака раствор 10% (40:10:20:1) после проявления: 1 – извлечение, 2 – стандартный образец глутамина, 3 - стандартный образец цистеина, 4 - стандартный образец аргинина, 5 - стандартный образец β-аланина, 6 - стандартный образец аминокислоты, 7 - стандартный образец α-аланина, 8 - стандартный образец гистидина, 9 - стандартный образец валина, 10 - стандартный образец β-фенил-α-аланина, 11 - стандартный образец метионина

Таблица 1. Результаты хроматографического определения свободных аминокислот в надземной части *Echinocystis lobata* в системе н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода очищенная – аммиака раствор 10% (40:10:20:1)

Стандартные образцы аминокислот		R _f пятен извлечения
Наименование	R _f	
СО глутамина	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
СО цистеина	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01
СО аргинина	0,16 ± 0,01	-
СО β-аланина	0,2 ± 0,01	-
СО аминокислоты	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01
СО α-аланина	0,26 ± 0,01	-
СО гистидина	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,01
СО валина	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,01
СО β-фенил-α-аланина	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,01
СО D, L-метионина	0,55 ± 0,01	0,56 ± 0,01

Литература

1. Виноградова Ю.К. Черная Книга флоры Сибири. Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2016. 440 с.
2. Лысиков Ю.А. Аминокислоты в питании человека. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2012;2:88-105.
3. Шаршунова М. Шварц В., Михалец У. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М.: Мир. 1980. 288 с.
4. Ielciu I., Vlase L., Frederich M., Hanganu D., Ramona P., Cieckiewicz E., Olah N.-K., Gheldiu A.-M., Crişan G. Polyphenolic profile and biological activities of the leaves and aerial parts of *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et A.Gray (*Cucurbitaceae*). *Farmacia*. 2017;65(2):179-183.
5. Maeda H., Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2012;63:73–105. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105439.

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА K₁ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Ю.Н. Логинова*, В.М. Рыжов, В.А. Куркин

¹ ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара, Россия

e-mail: nice.khoro@mail.ru

Ключевые слова: Пастушья сумка обыкновенная, витамин K₁, менадион, филлохинон, *Capsella bursa-pastoris*.

Введение. Витамин K₁ (филлохинон) обуславливает кровоостанавливающее действие, характерное для некоторых видов лекарственных растений. На данный момент достаточно актуален вопрос разработки новых препаратов на основе сырья, содержащего витамин K. В связи с этим также актуальна разработка методик качественного и количественного определения филлохинона (Прощенко Е.В., Дворникова Л.Г., 2013; Кутателадзе Г.Р., 2019; Чистякова А.С., 2020). При этом следует отметить, что филлохинон является неустойчивым соединением и легко окисляется, что обуславливает сложности стандартизации растительных объектов.

Цель. Изучение возможности применения менадиона в определении содержания витамина K₁ в фармакопейном лекарственном растительном сырье.

Материалы и методы. Материалом исследования служило лекарственное растительное сырье пастушьей сумки обыкновенной, крапивы двудомной, тысячелистника обыкновенного, заготовленное в июне 2020 года на фармакопейном участке Ботанического сада Самарского университета в период массового цветения и плодоношения растений. Видовую специфичность подтверждали с помощью определителя растений Средней России (Губанов И.А. и др., 2003). Заготовку и сушки сырья проводили по требованиям нормативной документации. Для проведения исследования были получены извлечения, в качестве экстрагента использовался спирт этиловый 96%. Стандартный образец вещества сравнения (СО) менадион получали методом щелочного гидролиза 1% раствора викасола для инъекций в ампулах, приобретенного в аптечной сети г. Самара (серия:031119, производитель: ООО «Озон»). К 10 мл раствора викасола прибавляли 1 мл гексана и при постоянном перемешивании по каплям 5 % раствор натрия гидроксида. При этом менадион выделялся в виде желтоватого осадка и сразу же переходил в гексановый слой, что предупреждало его разрушение. Чистота образца менадиона подтверждалась методом ТСХ и определением температуры плавления. Определение филлохинона в образцах растительного сырья послужили тонкослойная хроматография и спектрофотометрия. ТСХ-анализ проводили с использованием пластинок «Sorbfil» марки ПТСХ-АФ-А-УФ. Хроматографическое разделение проводили в системе растворителей

хлороформ - этанол (16:1). Детекцию пятен проводили просмотром в УФ-лампах ($\lambda=254$ нм, 366 нм). Спектральные характеристики образцов снимали прямым способом с помощью спектрофотометра «СФ-2000», используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый 96 %. Выбор методов анализа обусловлен простотой, экспрессностью и высокой точностью результатов.

Результаты. Как известно, искомым компонент – филлохинон является неустойчивым соединением и легко окисляется. В этой связи в качестве стандартного образца нами был предложен его структурный аналог – менадион (витамин К₃, 2-метилнафтохинон-1,4). В ходе анализа хроматограмм исследуемых образцов растений, содержащих витамин К₁ при детектировании в УФ-свете с λ 366 нм было выявлено наличие пятен филлохинона с $R_f = 0,74$. Сравнение с рабочим стандартным образцом менадиона показывает отличие в подвижности филлохинона (0,74) и менадиона (0,64), в виду чего целесообразнее использовать R_S филлохинона относительно СО. С учетом погрешности исследования $\pm 0,01$ R_S филлохинона составляет 0,97. Анализ извлечений из растительных объектов показывает аналитически значимый результат разделения и детектирования филлохинона и менадиона в хроматографической системе растворителей хлороформ:этиловый спирт в соотношении 16:1.

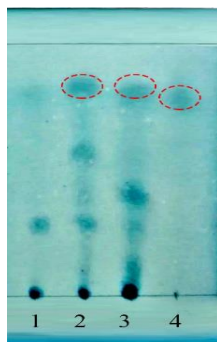


Рис. 1. Проявление менадиона и филлохинона на ТСХ-пластинке раствором фосфорно-молибденовой кислоты. 1 - извлечение из травы пастушьей сумки; 2 - извлечение из листьев крапивы двудомной; 3 - извлечение из травы тысячелистника обыкновенного; 4 – стандартный образец менадиона (6 мкл)

Проявление менадиона и филлохинона проводили раствором фосфорно-молибденовой кислоты с последующим нагреванием при 100°C. При этом искомые соединения детектируются по тёмно-синему окрашиванию (рис. 1). Дальнейшее исследование проводили методом спектрофотометрии. Спектральные характеристики СО менадиона приведены на рисунке 2 с учетом различной степени разведения раствора (рис. 2 А, Б). Несмотря на значительное отличие спектральных кривых поглощения извлечений из сравниваемых видов растений, у каждого из них имеется устойчивый аналитический максимум, соответствующий максимуму поглощения СО менадиона в области 325 нм (рис. 2). Наличие указанного максимума является аналитическим фактором качественного анализа образцов на предмет наличия в объекте витамина К₁.

Полученные данные спектральных кривых позволяют провести расчет содержания филлохинона в сравниваемых объектах в пересчете на СО менадиона. Результаты определения содержания филлохинона приведены на гистограмме (рис. 3). Полученные результаты определения содержания витамина К₁ коррелируют с литературными, справочными данными.

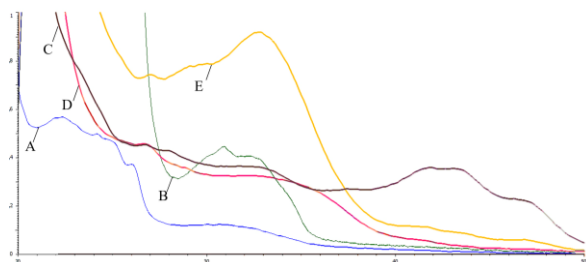


Рис. 2. Спектральные кривые поглощения извлечений. А – раствор СО менадиона (1:100) В – раствор СО менадиона (1:10); извлечения из лекарственного сырья на 96 % этиловом спирте: С – пастушьей сумки обыкновенной; D – крапивы двудомной; Е – тысячелистника обыкновенного

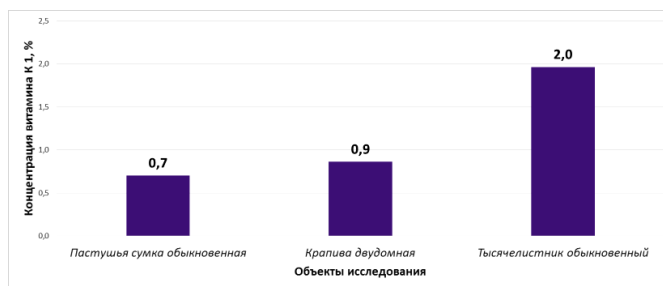


Рис. 3. Гистограмма содержания филлохинона в сравниваемых в пересчете на СО менадион при 325 нм

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования менадиона в качестве стандартного вещества сравнения при определении витамина К₁ в растительных объектах. Специфичность структуры позволяет проводить идентификацию витамина К₁ методом ТСХ, а также спектрофотометрии. В дальнейшем планируется проведение исследований по валидации методики стандартизации фармакопейных видов растений, содержащих витамин К₁.

Литература

1. Губанов И.А., Киселева К.В., Новиков В.С., Тихомиров В.Н. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 2 Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). - М.: Т-во научных изданий КМК. 2003. 665 с.
2. Кутателадзе Г.Р. Идентификация и количественное определение витамина К1 в щавеля кислого траве, заготовленной на территории Алтайского края. - В сборнике: Фундаментальная наука в современной медицине 2019. материалы сателлитной дистанционной научно-практической конференции студентов и молодых ученых. Минск, 2019:107-110.
3. Прошенко Е.В., Дворникова Л.Г. Идентификация и количественное определение витамина К1 в кукурузы столбиках с рыльцами в сборнике: актуальные проблемы фармакологии и фармации. - Ежегодный сборник научных и методических работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевтического факультета. Барнаул. 2013:99-105.
4. Чистякова А.С. Определение содержания витамина К в траве горца почечуйного заготовленного в Воронежской области. - В сборнике: Будущее науки-2020. Сборник научных статей 8-й Международной молодежной научной конференции. В 5-ти томах. – 2020:245-247.

АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРАВЫ MELILOTUS OFFICINALIS

С.И. Михайлова^{1,3*}, В.Ю. Андреева², Е.А. Трофимович¹

¹ Томский государственный университет, г. Томск, Россия

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

³ Томский филиал ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», г. Томск, Россия

e-mail:vilival@yandex.ru

Ключевые слова: лекарственные растения, *Melilotus officinalis*, аллелопатическая чувствительность.

Введение. Лекарственные растения являются важным источником вторичных метаболитов, обеспечивающих ряд биологических функций, в том числе аллелопатическую активность в отношении разных групп живых организмов (Кондратьев М.Н. и др., 2018). Высокий аллелопатический потенциал многих видов лекарственных растений обеспечивает им защиту от вредных организмов в природе и культуре. В тоже время лекарственное растительное сырье может использоваться для получения биопестицидов в органическом сельском хозяйстве для защиты растений от вредителей, болезней и сорняков (Fujii Y. et al., 2003; Кондратьев М.Н. и др., 2017; Yeasmin S. et al., 2018). К числу лекарственных растений, обладающих высокой токсичностью в отношении живых организмов, в том числе и растений, является донник лекарственный (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.), надземная часть которого содержит кумарины и их производные, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества, полисахариды, тритерпены и др. (Лесиовская Е., 2010; Войко О.О. et al., 2019). Считается, что основным веществом, обеспечивающим фитотоксический эффект экстрактов донника лекарственного, является кумарин и его производные (Wu C.X. et al., 2016).

Цель работы. Выявить влияние водных экстрактов из надземной части донника лекарственного на прорастание семян сельскохозяйственных культур и сорных растений.

Материалы и методы. Объектом исследований являлся донник лекарственный (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.), сем. *Fabaceae*), сорт «Омский скороспелый», собранный в фазу цветения в августе 2020 года в Сибирском ботаническом саду Томского государственного университета. В качестве объектов-тестеров использовали семена однодольных и двудольных сельскохозяйственных растений (пшеница, рожь озимая, просо посевное, кресс-салат, салат посевной, редис, лен-долгунец, огурец), а также широко распространенных и наиболее вредоносных сорных видов (овсюг и вьюнок полевой). Определение аллелопатической активности донника проводили методом биотестирования. В работе использовали классическую методику определения аллелопатической активности растений путем биотестирования проростков (Гродзинский А.М., 1991). В эксперименте изучено влияние водных экстрактов травы донника, полученных методом горячей экстракции. Семена испытываемых растений помещали на проращивание в чашки Петри по 25 штук в 4-х повторностях. Проращивание проводили на фильтровальной бумаге, смоченной 0,25–0,5 – 1% водными экстрактами травы донника. Контролем служили семена, проращиваемые на дистиллированной воде. Семена проращивали при температуре 22°C в течение 6-ти дней. Затем измеряли всхожесть семян и морфометрические показатели: длину проростков (мм), длину корня (мм), длину надземной части (мм).

Результаты. Даже в небольшой концентрации (0,25%) экстракт травы донника ингибирует прорастание семян исследованных растений и тормозит рост проростков. Под влиянием экстрактов донника в первую очередь угнетается рост корней, что проявляется в развитии аномальных проростков. В некоторых случаях мы наблюдали проростки растений с развитой надземной частью, но практически недоразвитыми (до 1 мм длиной) корнями. Установлено, что 1%-ные водные экстракты травы донника лекарственного, приготовленные методом горячей экстрагирования, вызывают сильный токсический эффект в отношении прорастания семян и роста проростков всех испытанных тест-растений. В результате проведенного

скрининга семян культивируемых и сорных растений, выявлены виды с повышенной аллелопатической чувствительностью (табл. 1).

Таблица 1. Влияние 1%-ного водного экстракта *Melilotus officinalis* на прорастание семян сельскохозяйственных культур и сорных растений

Вид	Влияние водного экстракта травы
• Просо посевное (<i>Panicum miliaceum</i> L.) сорт Кулундинское	– подавление прорастания семян, – полное ингибирование роста корня, – сильное ингибирование роста эпикотилия
• Пшеница озимая (<i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Новосибирская-3 • Рожь озимая (<i>Secale cereale</i> L.) сорт Тетра короткая • Овес пустой, овсюг (<i>Avena fatua</i> L.)	– сильное снижение прорастания семян, – сильное ингибирование роста корня и эпикотилия
• Кресс-салат (<i>Lepidium sativum</i> L.) сорт Курлед • Салат посевной (<i>Lactuca sativa</i> L.) сорт Лолло Росса • Редис (<i>Raphanus sativus</i> L.) сорт Маяк	– полное подавление прорастания семян
• Лен-долгунец (<i>Linum usitatissimum</i> L.) сорт Томич-2 • Огурец посевной (<i>Cucumis sativus</i> L.) сорт Закусочный • Вьюнок полевой (<i>Convolvulus arvensis</i> L.)	– сильное подавление прорастания семян – ингибирование роста корня и гипокотилия

Заключение. Методом биотестирования установлено, что водные экстракты надземной части *Melilotus officinalis* (сорт «Омский скороспелый») обладают высокой аллелопатической активностью, которая выражается в ингибировании прорастания семян однодольных и двудольных сельскохозяйственных культур, и сорных растений, а также появлением аномалий развития проростков. Полученные данные о высокой аллелопатической активности травы *Melilotus officinalis* необходимо учитывать при выращивании его в качестве сидерата и предшественника сельскохозяйственных растений. Высокий фитотоксический эффект донника в отношении прорастания сорных видов свидетельствует о его потенциальной биогербицидной активности.

Литература

1. Гродзинский А.М. Аллелопатия растений и почвоутомление /А.М. Гродзинский. – Киев: Наукова думка. 1991. 430 с.
2. Кондратьев М.Н., Ларинова Ю.С., Давыдова А.Н. Вторичные соединения лекарственных растений как потенциальная основа для создания биогербицидов. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2017;20(5):36–40.
3. Кондратьев М.Н., Скороходова А.Н., Ларинова Ю.С., Евдокимова Д.П. Аллелопатические свойства вторичных соединений лекарственных растений (обзор). *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2018;21(2):12–22.
4. Лесиовская Е. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства *Fabaceae* – *Apiaceae*. СПб; М: Товарищество научных изданий КМК. 2010. 601 с.
5. Boyko O.O., Brygadyrenko V.V. Nematocidal activity of aqueous solutions of plants of the families *Cupressaceae*, *Rosaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Cannabaceae* and *Apiaceae*. *Biosystems diversity*. 2019;27(3):227–232.
6. Fujii Y., Parvez S.S., Parvez M.M., Ohmae Y. and Iida O. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed biology and management*. 2003;3(4):233–241.
7. Wu C.X., Zhao G.Q., Liu D.L., Liu S.J., Gun X.X., Tang Q. Discovery and weed inhibition effects of coumarin as the predominant allelochemical of yellow sweetclover (*Melilotus officinalis*). *Int. J. Agric. Biol.* 2016;18(1):168–175.
8. Yeasmin S., Qasem J.R.S., Juraimi A.S., Anwar Md.P. Allelopathy of medicinal plants: current status and future prospects in weed management. *Agricultural sciences*. 2018;9(12):1569–1588. <https://doi.org/10.4236/as.2018.912110>.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ЭКСТРАЦИИ АРАЛОЗИДОВ ИЗ КОРНЕЙ АРАЛИИ МАНЬЧЖУРСКОЙ

И.Ю. Михайловская*, Е.В. Флисюк, А.Н. Шиков

¹ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет, г. Санкт-Петербург, Россия
e-mail: irina.mihajlovskaya@spcru.ru

Ключевые слова: аралия маньчжурская, *Aralia elata* var. *mandshurica*, природные глубокие эвтектические растворители, экстракция, адаптоген.

Введение. В 2013 году Dai Y. et al. опубликовали первую статью, в которой описали возможность применения природных глубоких эвтектических растворителей (ПГЭР) для экстракции растительного сырья. В состав ПГЭР входят различные органические и аминокислоты, сахара, производные холина, и др. Основными особенностями данных растворителей является то, что они обладают низкой летучестью и температурой плавления, широким диапазоном полярности и способностью к экстракции широкого спектра соединений, особенно мало растворимых в воде. Аралия высокая или маньчжурская (*Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J.Wen) – растение, распространенное на Дальнем Востоке Российской Федерации, а также используемое в медицине для лечения неврологических заболеваний, артериальной гипотензии и др. На данный момент из аралии маньчжурской было выделено более 150 метаболитов, основными из которых являются сапонины – аралозиды А, В, С (Shikov A.N. et al., 2016). Основными фармакологическими эффектами аралии являются адаптогенный (Breckhman I.I., Dardymov I.V., 1969), иммуностимулирующий (Miroshnichenko I.V. et al., 1985), противовирусный (Paramonova M.S. et al., 1994), гипогликемический (противодиабетический) (Liu X.H. et al., 2014).

Цель. Подобрать природные глубокие эвтектические растворители для извлечения различных групп биологически активных веществ из корней аралии маньчжурской.

Материалы и методы. Изучение свойств аралии маньчжурской и потенциально подходящих для экстрагирования аралозидов проводилось с помощью научной литературы, найденной в библиотечных источниках, онлайн-сервисах (E-library; Pubmed; Science direct; Google Scholar).

Результаты. Для того, чтобы понять, какие эвтектические растворители могут подходить для экстрагирования аралозидов из корней аралии, были проанализированы различные литературные источники. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Эффективность извлечения сапонинов с помощью природных глубоких эвтектических растворителей из различного лекарственного растительного сырья

ПГЭР с молярным соотношением ингредиентов	Лекарственное растительное сырье	Литературный источник
Холина хлорид – уксусная кислота (2:1) + 42% этанола	Кора зизифуса (<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.)	Ribeiro B.D. et al., 2013
Холина хлорид - уксусная кислота (2:1) + 19% воды	Отходы сизаля/агавы сизалевого (<i>Agave sisalana</i> Perrine)	
Холина хлорид - N,N'-диметилмочевина (1:1), L-пролин – 1- метилмочевина (1:1)	Корни и корневища женьшеня ложного (<i>Panax notoginseng</i> (Burkill) F.H.Chen)	Duan L. et al., 2016
яблочная кислота – хлорид холина (1:1) + 20% воды; глицерол - пролин – сахароза (1:1:1) + 20% воды	Листья гинкго билоба (<i>Ginkgo biloba</i> L.)	Liu X.H. et al., 2018
яблочная кислота – хлорид холина (1:1) + 20% воды; яблочная кислота – глюкоза (1:1) + 20% воды	Листья и стебли женьшеня настоящего (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)	
L-пролин – глицерин – сахароза (4:10:1)	Выжимка из семян камелии масличной (<i>Camellia oleifera</i> Abel.)	Tang Y. et al., 2020
Холина хлорид – малоновая кислота (1:1) + 54% воды	Корневища диоскореи nipпонской (<i>Dioscorea nipponica</i> Makino)	Yang G.Y. et al., 2021

Проанализировав источники, представленные в таблице 1, можно заметить, что для извлечения сапонинов наиболее часто используются ПГЭР, содержащие в своем составе холина хлорид и различные органические кислоты: малоновую, яблочную, уксусную. С точки зрения химического строения, аралозиды являются тритерпеновыми сапонинами, также как и панаксозиды, содержащиеся в женьшене, что подтверждает перспективность использования указанных выше ПГЭР.

Заключение. Таким образом, можно предположить, что для извлечения аралозидов из корней аралии маньчжурской необходимо использовать комбинацию холина хлорида и органических кислот (малоновая, яблочная) с добавлением воды для уменьшения вязкости растворителя.

Литература

1. Breckhman I.I., Dardymov I.V. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Ann Rev Pharmacol.* 1969;9:419-430.
2. Dai Y., Spronsen J.V., Witkamp G.J., Verpoorte R., Choi Y.H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta.* 2013;766:61–8. DOI:10.1016/j.aca.2012.12.019.
3. Duan L., Dou L.L., Guo L., Li P., Liu E.H. Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* 2016;4(4): 2405–2411. DOI:10.1021/acssuschemeng.6b00091.

4. Liu X., Ahlgren S., Korthout H. A. A. J., Salomé-Abarca L. F., Bayona L. M., Verpoort, R., Choi Y. H. Broad range chemical profiling of natural deep eutectic solvent extracts using a high performance thin layer chromatography-based method. *Journal of Chromatography A*. 2018;1532: 198–207. DOI:10.1016/j.chroma.2017.12.009.
5. Liu X.H., Li X.M., Han C.C., Fang X.F., Ma L. Effects of combined therapy with glipizide and Aralia root bark extract on glycemic control and lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;95(4):739–744. DOI:10.1002/jsfa.6829.
6. Miroshnichenko I.V., Yarilin A.A., Aknazarova R.K., Trofimchik S.M. Different effects of tonics on the immune response. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1985;19(2):85–87. DOI:10.1007/bf00771767.
7. Paramonova M.S., Gagarinova V.M., Rodina M.A., Guseva V.M., Burmistrova V.V., Osipova Z.A., Aksenov O.A. The biological activity of saporin in an influenzal infection. *Вопросы вирусологии*. 1994;39(3):131-134.
8. Ribeiro B.D., Coelho M.A.Z., Marrucho, I.M. Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents. *European Food Research and Technology*. 2013;237(6):965–975. DOI:10.1007/s00217-013-2068-9.
9. Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G. Aralia elata var. mandshurica (Rupr. & Maxim.) J.Wen: An overview of pharmacological studies. *Phytomedicine*. 2016;23(12):1409–1421. DOI:10.1016/j.phymed.2016.07.011.
10. Tang Y., He X., Sun J., Liu G., Li C., Li L., Chen X. Comprehensive evaluation on tailor-made deep eutectic solvents (DESs) in extracting tea saponins from seed pomace of *Camellia oleifera* Abel. *Food Chemistry*. 2020;128243. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128243.
11. Yang G.Y., Song G.N., Chang Y.Q., Wang L., Zheng Y.G., Zhang D., Guo L. Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Steroidal Saponins from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*. *Molecules*. 2021;26(7):2019. DOI:10.3390/molecules26072079.

ТЕРПЕНОИДЫ И ФЛАВОНОИДЫ *ARTEMISIA JUNCEA* – ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ОСНОВА ДЛЯ
СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Б.С. Охундедаев^{1*}, Р.Ф. Мухаматханова¹, И.Д.Шамьянов¹, С.Ф. Арипова¹,
Н.А. Aisa², Ш.Ш. Сагдуллаев¹

¹Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова АН РУз, г. Ташкент

²Xinjiang Key Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry, Xinjiang Technological Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, China

e-mail: boxundedayev@mail.ru

Ключевые слова: полынь ситниковидная, *Artemisia juncea* Kar. et Kir., монотерпеноиды, сесквитерпеновые лактоны, тритерпеноиды, флавоноиды.

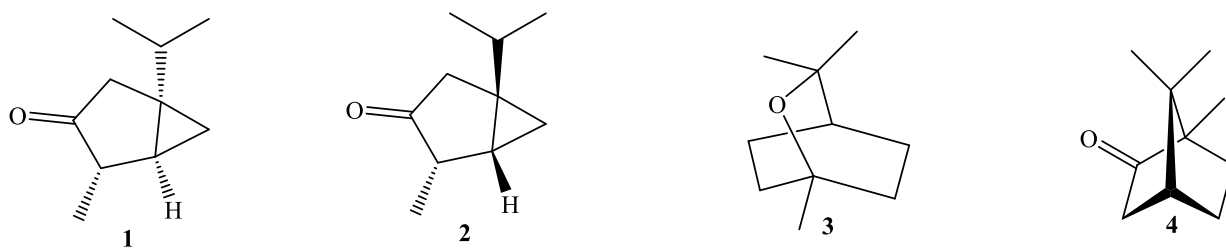
Введение. Полынь ситниковидная (*Artemisia juncea* Kar. et Kir.) – широко распространенный вид полыни во флоре Узбекистана, относящийся к секции *Junceum* подрода *Seriphidium* рода *Artemisia* (Адылова Т.А., 1993). В народной медицине настой травы используют при эпилепсии, лихорадках, болезнях почек, а также как противовоспалительное и глистогонное средство, а масляный настой травы принимают при астме, водянке, судорогах (Кароматов И.Дж., 2012). Использование растения в народной медицине всегда подогревало интерес к изучению его продуцируемых метаболитов, определения их структуры, с последующим выявлением биологической активности выделенных соединений.

Цель исследования. Фитохимическое изучение метаболитов надземной части *A. juncea* включающее выделение, установления строения и определение биологической активности выделенных метаболитов.

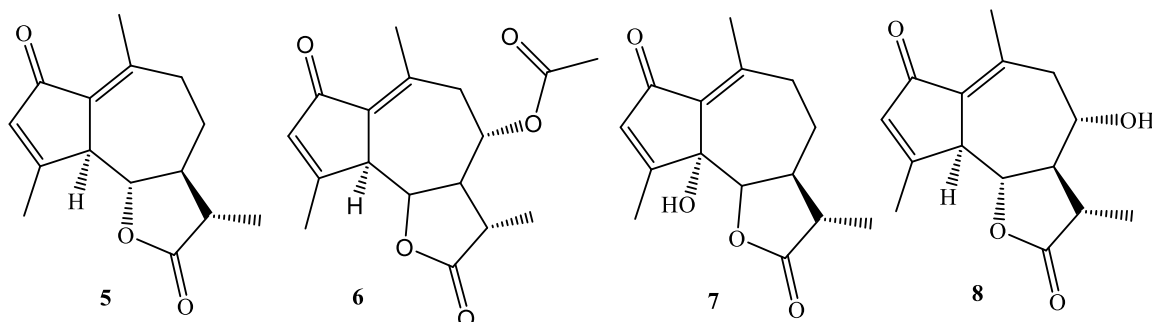
Материалы и методы. Надземная часть *A. juncea* собранная в период бутанизации в окрестностях поселка Чурух Бухарской области Узбекистана. Экстракционные, хроматографические и спектральные (УФ-, ИК-, масс-, ЯМР ¹H и ¹³C) методы.

Результаты. Проведенными нами фитохимическими исследованиями установлено, что надземная часть *A. juncea* продуцирует следующие метаболиты: монотерпеноиды (мажорные) – α- и β-туйоны (**1,2**), 1,8-цинеол (**3**), камфору (**4**); сесквитерпеновые лактоны – леукомизин (**5**), матрикарин (**6**), паришин С (**7**), аустрицин (**8**); тритерпеноиды - β-ситостерол (**9**), стигмастерол (**10**); флавоноиды – эупатилин (**11**), джасеосидин (**12**), цинарозид (**13**), 4',5'-дигидрокси-3',5',6'-триметокси-флавонон-7-О-β-D-глюкозид (**14**), юнцион (**15**); циклический полиол D-пинитол (**16**). Флавоноиды **14** и **15** являются новыми фенольными соединениями. Согласно нашим исследованиям, а также литературным данным выделенные соединения обладают широким спектром биологической активности: α-туйон оказывает высокое возбуждающее действие на центральную нервную систему, β-туйон обладает спазмолитическим эффектом. Установлено, что смесь α- и β-туйонов снижают жизнеспособность раковых клеток и проявляют сильные антипролиферативные, проапоптотические и антиангиогенные эффекты и способствуют регрессу неоплазии, а также ингибируют ангиогенные маркеры VEGF, Ang-4 и CD31 в опухоли (Togres A. et al., 2016; Teker T. et al., 2021). 1,8-Цинеол обладает противовоспалительными, обезболивающими и противоглистными свойствами. Выявлено, что монотерпеноиды **1-3** проявляют антибактериальные и противогрибковые свойства (Teker T.

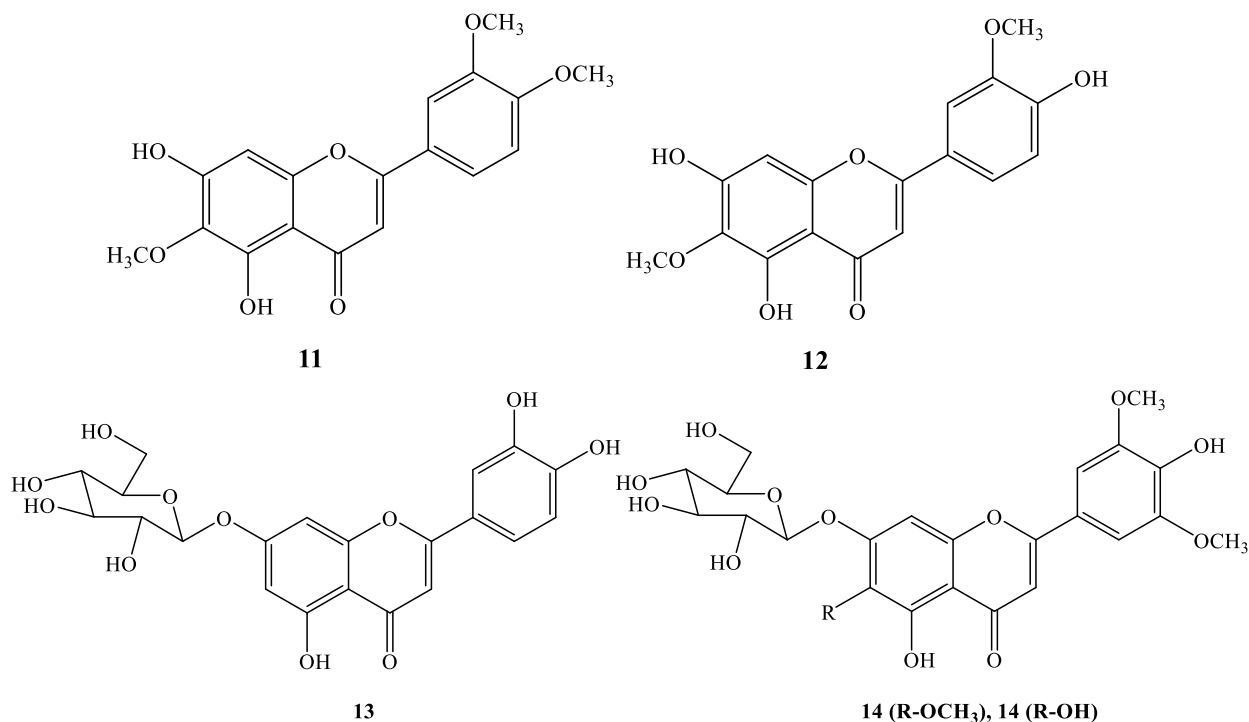
et al., 2021). Камфора – кардиотоническое, analeптическое средство, она также является хорошим антидепрессантом, так как обладает нейропротекторным действием (Salama A. et al., 2020).



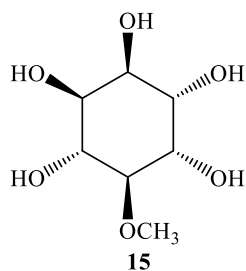
Выделенные сесквитерпеновые лактоны **5-8** обладают гиполипидемическим и антиатеросклеротическим действиями. На основе **5** создан антиатеросклеротический препарат «Олигвон», который по антиатеросклеротической активности превосходит ангинин (Япония), продектин (Венгрия), правастатин (США) (Сыров В.Н. и др., 2018).



β -Ситостерол (**9**) проявляет гипохолестеринемическое и гепатозащитное действие, играет структурную роль в составе клеточных мембран растений. Стероиды **9** и **10** служат исходными веществами для промышленного синтеза стероидных гормонов и гормональных препаратов. Флавоноид цинарозид (**13**) – гипотензивический препарат, который по своему действию превышает препарат леспенефрил (Франция) (Максумова Н.С., 1995). Соединения **11** и **12** обладают противоопухолевым и антиоксидантным действиями (Okhunedaev B.S. et al., 2019; Wu Z. et al., 2020), кроме того, **12** обладает антифунгальной, противовоспалительной, антимуtagenной и антидиабетической активностью. Новые флавоноиды **14** и **15** проявляют антиоксидантную и энзим ингибиторную активность (Okhunedaev B.S. et al., 2019).



Выделенный *D*-пинитол (**15**) обладает выраженными гипогликемическими и антидиабетическими свойствами (Misra L.N., Siddiqi S.A., 2004).



Заключение. Таким образом, проведенными фитохимическими исследованиями показано, что надземная часть *Artemisia juncea* является богатым и возобновляемым источником различных классов биологически активных метаболитов, что обуславливает широкое применение этого вида полыни в народной медицине при различных заболеваниях.

Литература

1. Адылова Т.А. Определитель растений Средней Азии, т. X, под ред. Т.А. Адылова, Т.И. Цукерваника, Фан, Ташкент/ 1993. С. 586.
2. Кароматов И.Дж. Простые лекарственные средства. Бухара: Дурдона. 2012. С. 416.
3. Torres A., Vargas Y., Uribe D., Carrasco C., Torres C., Rocha R., Oyarzu'n C., Marti'n R.S., Максумова Н.С. Автореф канд. фарм. наук. Ташкент: Институт химии растительных веществ, 1995. С. 22.
4. Сыров В.Н., Турсунова Н.В., Исламова Ж.И., Шамьянов И.Д., Хушбактова З.А. Гиполипидемическая и антисклеротическая активность сесквитерпеновых лактонов леукомизина, аустрицина и бадхизина. *Вестник ташкентской медицинской академии*. 2018; 2:57-60.
5. Misra L.N., Siddiqi S.A. Dhaincha (*Sesbania bispinosa*) leaves: A good source of antidiabetic (+)-pinitol. *Current Science*. 2004;87(11):1507.
6. Okhudedaev B.S., Bacher M., Mukhamatkhanova R.F., Sham'yanov I.D., Zengin G., Böhmendorfer S., Mamadalieva N.Z., Rosenau T. Flavone glucosides from *Artemisia juncea*. *Nat. Prod. Res.* 2019;33:2169-2171.
7. Quezada C. Pro-apoptotic and anti-angiogenic properties of the α/β -thujone fraction from *Thuja occidentalis* glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* 2016. DOI 10.1007/s11060-016-2076-2
8. Salama A., Mahmoud H.A., Kandeil M.A., Khalaf M.M. Neuroprotective role of camphor against ciprofloxacin induced depression in rats: modulation of Nrf-2 and TLR4. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2020;43(3):309-318.
9. Teker T., Sefer Ö., Gazdağlı A., Yörük E., Varol G., Albayrak G. α -Thujone exhibits an antifungal activity against *F. graminearum* by inducing oxidative stress, apoptosis, epigenetics alterations and reduced toxin synthesis. *Eur J Plant Pathol*. 2021;160:611–622.
10. Wu Z., Zou B., Zhang X., Peng X. Eupatilin regulates proliferation and cell cycle of cervical cancer by regulating hedgehog signalling pathway. *Cell Biochem Funct*. 2020:1–8. DOI: 10.1002/cbf.3493

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЦВЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ (*TAGETES PATULA* L.)

А.Е. Савельева*, В.А. Куркин, А.В. Куркина

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России,

г. Самара, Россия

e-mail:anevsavelieva@gmail.com

Ключевые слова: Бархатцы отклоненные; *Tagetes patula* L.; цветки; флавоноиды; стандартизация.

Введение. Цветки бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) представляют интерес в качестве нового вида лекарственного растительного сырья. Проведенные ранее исследования показали, что цветки бархатцев содержат каротиноиды, эфирное масло, дубильные вещества и фенольные соединения, в том числе флавоноиды, которые могут вносить существенный вклад в фармакологическое действие (Подгорная Ж.В., 2008; Ломкина Е.М. и др., 2016; Червонная Н.М. и др., 2018; Куркина А.В. и др., 2021).

Цель. Определение содержания флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных.

Материалы и методы. Материалом исследования являлись цветки бархатцев отклоненных (сорта «Мандарин», «Оранжевый чемпион», «Скарлет София», «Оранжевое пламя», «Красная парча», «Малыш гармония» и «Красный герой»), собранные в августе-сентябре 2018 года в Ботаническом саду Самарского университета в период массового цветения и плодоношения растения. Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: изократический режим, стальная колонка «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил: 1% раствор

уксусной кислоты в воде в соотношении 3:7, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 360 нм. Объемы инжестируемых проб: 4 мкл (патулитрин, патулетин и извлечение из цветков бархатцев отклоненных). Спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений оценивали на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena AG, Германия) в кюветках с толщиной слоя 10 мм. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) осуществляли с использованием хроматографических пластинок «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и системах растворителей: хлороформ – этанол – вода (25:18:2).

Для выделения флавоноидов использовали колоночную хроматографию с последующей перекристаллизацией (чистота веществ подтверждалась физико-химическими константами и УФ-спектроскопией). Для этих целей нами было получено извлечение из 150 г цветков бархатцев отклоненных сорта «Мандарин» с помощью 70 % этилового спирта в соотношении 1:5, которое упаривали под вакуумом, наносили на силикагель L 40/100 и высушивали. В качестве элюентов использовали хлороформ, а также смеси хлороформа и этилового спирта в соотношениях 99:1; 98:3; 97:5; 93:7; 90:10; 85:15; 80:20; 70:30 и 60:40. Элюаты делили на фракции, примерно одинакового объема (по 200 мл), затем упаривали под вакуумом.

Результаты. Из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта соотношении 60:40, выделили доминирующее вещество с величиной R_f около 0,4, а из фракций, где в качестве элюата выступала смесь хлороформа и этилового спирта в соотношении 93:7, выделили вещество с величиной R_f около 0,7. В результате хроматографических исследований вещества идентифицированы как патулитрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавона) и его агликон – патулетин (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавоно). Ранее нами установлено, что оптимальные условия экстракции флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных: экстрагент – 70% этиловый спирт, соотношение «сырьё-экстрагент» – 1:50, время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане в течение 45 мин, степень измельчения сырья – 3 мм (Куркина А.В. и др., 2021). Нами были проанализированы водно-спиртовые извлечения из цветков бархатцев отклоненных семи различных сортов. Методом ТСХ в присутствии растворов стандартных образцов подтверждено наличие патулетина и патулитрина в извлечениях из всех образцов изучаемых нами сортов. Нами были проведены спектрофотометрические исследования водно-спиртовых извлечений из цветков бархатцев отклоненных, а также патулитрина (рисунок 1). При изучении спектральных характеристик было выявлено, что именно патулитрин определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных.

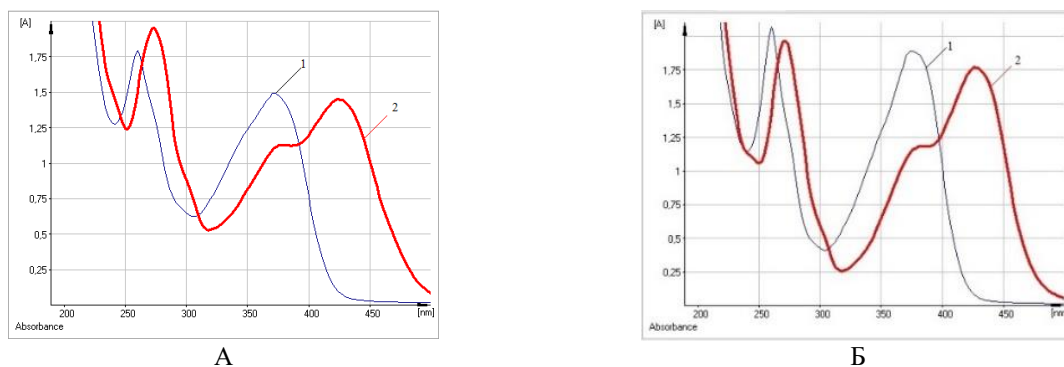


Рис. 1. Электронные спектры растворов: А – водно-спиртового извлечения цветков бархатцев отклоненных сорта «Мандарин», Б – патулитрина. Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида

Кривые спектров поглощения извлечений из цветков различных сортов бархатцев имеют два выраженных максимума поглощения при $\lambda=260$ нм и $\lambda=370$ нм (рисунок 1). Определено, что в УФ-спектре водно-спиртовых извлечений из цветков бархатцев отклоненных наблюдается bathochromic сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов, как и в случае патулитрина. При этом наблюдается четкая корреляция кривых поглощения водно-спиртового извлечения из цветков и патулитрина и в присутствии спиртового раствора алюминия хлорида. В УФ-спектрах раствора патулитрина обнаруживаются bathochromic сдвиги длинноволновой полосы в область 426-430 нм (рисунок 1). Дифференциальные кривые электронных спектров раствора водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных имеет максимум в области 428-434 нм, который практически соответствует максимуму поглощения спиртового раствора патулитрина. Следовательно, целесообразным является при проведении количественного анализа цветков бархатцев отклоненных осуществлять пересчет суммы флавоноидов в сырье на патулитрин. Результаты спектрофотометрического определения количественного содержания флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных различных сортов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание суммы флавоноидов в цветках различных сортов бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.)

№ п/п	Сорт	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на патулитрин и абсолютно сухое сырье, %
1.	<i>T. patula</i> L. «Мандарин»	11,71 ± 0,05
2.	<i>T. patula</i> L. «Оранжевое пламя»	9,39 ± 0,03
3.	<i>T. patula</i> L. «Красный герой»	8,25 ± 0,03
4.	<i>T. patula</i> L. «Оранжевый чемпион»	7,51 ± 0,03
5.	<i>T. patula</i> L. «Скарлет София»	7,21 ± 0,03
6.	<i>T. patula</i> L. «Красная парча»	6,21 ± 0,03
7.	<i>T. patula</i> L. «Малыш Гармония»	4,36 ± 0,02

Поскольку патулитрин имеет в длинноволновой области электронного спектра максимум поглощения при 360±2 нм, нами была выбрана данная длина волны для детекции анализируемого вещества при проведении ВЭЖХ-анализа. Определено, что при использовании системы ацетонитрил – вода в соотношении 3:7 возможно идентифицировать доминирующий компонент – патулитрин, а также патулетин (рис. 2).

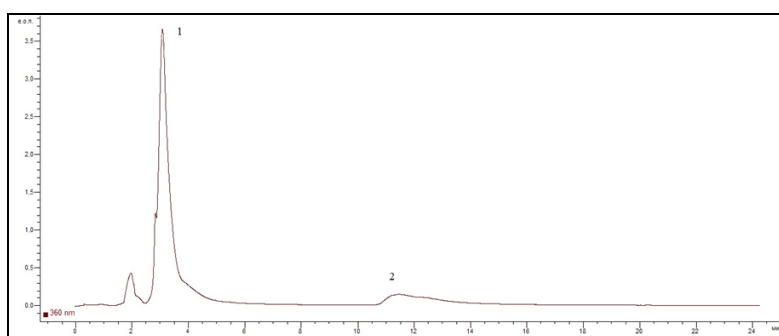


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из цветков бархатцев отклоненных. Обозначения: 1 – патулитрин; 2 – патулетин

Время удерживания пиков веществ на хроматограммах рабочих стандартных образцов, а также в извлечении из цветков бархатцев отклоненных представлены в таблице 2.

Таблица 2. Времена удерживания пиков флавоноидов цветков бархатцев отклоненных

Флавоноид	Время удерживания на хроматограмме, мин	
	Стандартный образец	Извлечение
Патулитрин	3,188	3,009
Патулетин	10,770	11,385

Добавление раствора патулитрина и патулетина в извлечение проявляется на хроматограмме увеличением интенсивности пика патулитрина и пика патулетина соответственно по сравнению с таковой флавоноидов в исходном испытуемом растворе.

Заключение. Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации цветков бархатцев отклоненных путем определения наличия в них диагностически значимых флавоноидов – патулитрина и патулетина с использованием методов ТСХ, ВЭЖХ и детектированием на УФ-детекторе при длине волны 360 нм. Согласно результатам проведенного эксперимента, исследуемые сорта бархатцев отклоненных значительно отличаются между собой по количественному содержанию флавоноидов. Определено, что содержание суммы флавоноидов в цветках исследуемых сортов бархатцев отклоненных варьирует от 4,36 ± 0,02% до 11,71 ± 0,05%.

Литература

1. Куркина А.В., Савельева А.Е., Куркин В.А. Количественное определение суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(2):46-50. Ломкина Е.М., Червонная Н.М., Оганесян Э.Т. Влияние экстракта бархатцев на заживление ран при сахарном диабете. *Фармация*. 2016;65(3):37-39.
2. Подгорная Ж.В. Исследование цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) с целью получения биологически активных соединений: дис. ... канд. фармацевт. наук. Пятигорск. 2008.
3. Червонная Н.М., Андреева О.А., Аджахметова С.Л., Оганесян Э.Т. О содержании фенольных соединений в соцветиях бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.). *Химия растительного сырья*. 2018;3:91-98.

РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТА ЛАПЧАТКИ ГУСИНОЙ

Е.Е. Савельева*, Н.А. Булгакова, Е.З. Лапкина, О.Ф. Веселова, К.Г. Алешенцев
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-
Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия
e-mail:saveleva_ee@mail.ru

Ключевые слова: лапчатка гусиная, *Potentilla anserina*, ранозаживляющая активность.

Введение. Актуальной проблемой медицины и фармации является поиск средств с противовоспалительной, ранозаживляющей, антимикробной активностью для лечения ран различной этиологии. Лекарственное растительное сырье и препараты на его основе являются перспективными объектами исследования, так как содержат в себе комплекс биологически активных веществ, обладающих указанной активностью (каротиноиды, токоферолы, ненасыщенные жирные кислоты, стерины, полисахариды, дубильные вещества, флавоноиды и пр.). Лапчатка гусиная широко распространена на территории России и проявляет антиоксидантные (Савельева Е.Е. и др., 2020), антимикробные (Tomczyk M. et al., 2008), противовоспалительные свойства (Wang Z. et al., 2020).

Цель. Исследование ранозаживляющей активности спиртового экстракта лапчатки гусиной на модели ожоговой раны у мышей.

Материалы и методы. Для исследования получали экстракт из надземной части лапчатки гусиной (*Potentilla anserina* L.), в соотношении 1:1 методом перколяции, экстрагент – 70% спирт этиловый. Сырье собирали летом во время цветения в Томской области, с. Коларово, высушивали воздушно-теневым способом. Из полученного жидкого экстракта удаляли экстрагент, полученный сухой остаток растворяли в воде непосредственно перед лечением в дозе 250 мг/кг. Ранозаживляющую активность определяли на модели ожоговой раны на 20 белых мышах-самцах массой 35±2 г, которых перед началом исследования разделили на 2 равные группы: 1-ая группа – контрольная (без лечения); 2-ая группа – экспериментальная (лечение ожоговой раны экстрактом лапчатки гусиной). У всех животных моделировали термический ожог кожи с помощью раскаленного стального трафарета под эфирным наркозом. Заживление ожогов происходило открытым способом. Животным 1-ой группы ежедневно на рану наносили 30 мкл физиологического раствора. Во 2-ой группе животным на рану наносили 30 мкл экстракта лапчатки гусиной (инстилляцией до полного впитывания с поверхности). На 4-ые сутки животных выводили из эксперимента, забирали участок кожного покрова, состоящий из зоны ожога и 5 мм окружающих неповрежденных тканей для гистологического исследования. Образцы кожи фиксировали в нейтральном 10% растворе формалина, затем заливали в парафин, получали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Результаты. В результате термического воздействия у животных обеих групп формировался ожог III степени, площадь которого составила 1-2% от поверхности тела. При микроскопическом исследовании кожи мышей экспериментальной группы наблюдалась более выраженная деструкция эпидермиса и дермы с образованием некротического детрита. Субэпидермально была видна выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация в исследуемой зоне. В дерме наблюдались выраженные признаки воспаления, выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация, расширенные полнокровные сосуды, выраженная вакуолизация и отек. Таким образом, полученные результаты показывают, что в терапии ожоговых ран местное применение экстракта лапчатки гусиной хотя и не приводит к выраженному противовоспалительному эффекту, однако выявленная лимфоцитарная инфильтрация дермы и другие гистологические параметры указывают на более активные процессы в тканях, что может впоследствии, привести к более ускоренному очищению раны и более быстрой регенерации.

Заключение. Применение спиртового экстракта лапчатки гусиной у мышей с ожоговой раной приводило к активации процессов в поврежденных тканях, что вероятно указывает на более быструю регенерацию. Для доказательства ранозаживляющей активности экстракта лапчатки гусиной необходимо продолжить исследование с выведением животных на 7-е и 21-е сутки от начала эксперимента.

Литература

1. Савельева Е.Е., Лапкина Е.З., Булгакова Н.А., Тютрина Е.С., Курбатский В.И. Исследование антирадикальной активности растений рода *Potentilla* L. *Химия растительного сырья*. 2020;(2):189-196.
2. Tomczyk M., Leszczynska K., Jakoniuk P. Antimicrobial activity of *Potentilla* species. *Fitoterapia*. 2008;79(7-8):592-594.
3. Wang Z., Zhang L., Zhao J., Wu J., Peng Z., Wang Y., Liu Y., Xu Q., Yang S., Khan I. A. Anti-inflammatory and Cytotoxic Lignans from *Potentilla anserina*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2020;30:678–682.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭКСТРАКТЕ ТРАВЫ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО

О.Л. Сайбель*, А.И. Радимич, Т.Д. Даргаева

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,
г. Москва, Россия
e-mail:saybel@vilarnii.ru

Ключевые слова: цикорий обыкновенный, *Cichorium intybus* L., фенольные соединения, цикориевая кислота.

Введение. В настоящее время поиск новых видов растений и создание на их основе оригинальных лекарственных средств является одним из приоритетных направлений фармацевтической науки. Среди представителей отечественной флоры особый интерес представляет многолетнее травянистое растение семейства Астровых (*Asteraceae*) цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.). Опыт применения этого растения в народной и традиционной медицине многих стран, а также опубликованные данные научной литературы свидетельствуют о гепатопротекторном, противовирусном, антиоксидантном и иммуномодулирующем действии лечебных средств на основе надземной части цикория обыкновенного. Имеющиеся данные по фармакологической активности, а также наличие достаточной сырьевой базы этого растения определяет потенциал его детального изучения (Guo-Yu Li, Jing-Kai Gu, 2014; Al-Snafi A.E., 2016; Kanj D. et al., 2019). В связи с этим, в ФГБНУ ВИЛАР разработан способ получения сухого экстракта из травы дикорастущего цикория обыкновенного. В опытах *in vivo* было подтверждено его иммуномодулирующее действие на гуморальное, клеточное и макрофагальное звенья иммунной реакции (Патент № 2710270).

Цель. Разработка методики количественного определения фенольных соединений в сухом экстракте травы цикория обыкновенного.

Материалы и методы. Объектом исследования служил сухой экстракт, полученный путём экстракции измельченной травы дикорастущего цикория обыкновенного спиртом этиловым 70 %, концентрирования водно-спиртового извлечения до водного остатка, очистки от липофильных соединений и сушкой при температуре 60°C. Для получения экстракта использовали сырьё, заготовленное в Рязанской области в 2019 году, с содержанием суммы фенольных соединений 2,6±0,12 %. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). Расчет содержания суммы фенольных соединений проводили в пересчете на цикориевую кислоту и абсолютно сухое вещество, используя удельный показатель поглощения 782 (Государственная фармакопея РФ XIV издания).

Результаты. Для обоснования выбора методики стандартизации травы цикория обыкновенного и экстракта на его основе были проведены исследования по определению группы биологически активных веществ, вносящих основной вклад в фармакологическое действие данного сырья. Для этого было проведено фракционирование суммарного экстракта с использованием растворителей различной полярности (этилацетат, бутанол). Оценка биологического действия полученных фракций показала, что наибольшей активностью обладает наиболее представительная по химическому составу этилацетатная фракция, основными веществами которой являются гидроксикоричные кислоты. Среди доминирующих компонентов фракции превалирует цикориевая кислота. В связи с этим, стандартизацию травы и экстракта цикория обыкновенного предложено проводить по сумме фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту, используя для этого метод прямой спектрофотометрии. Данная методика была нами разработана для сырья и адаптирована к условиям анализа экстракта. В качестве растворителя для экстракта выбран спирт этиловый 70 %. Оптическую плотность измеряли в максимуме поглощения при длине волны 329±2 нм (рис. 1).

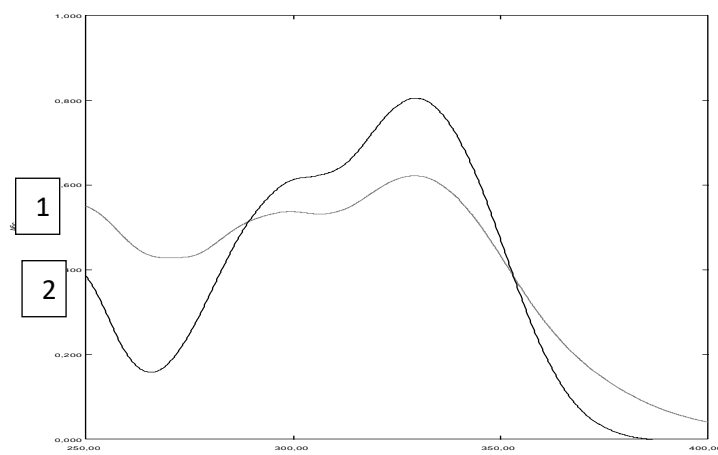


Рис. 1. УФ-спектр поглощения извлечения из сухого экстракта цикория обыкновенного (1) и цикориевой кислоты (2)

Проведенная валидация разработанной методики позволила охарактеризовать её положительно по основным валидационным характеристикам: линейность, правильность, сходимость, воспроизводимость.

Таблица 1. Валидационные характеристика методики количественного определения суммы фенольных соединений

Наименование показателя	Характеристика показателя
Линейность	Уравнение регрессии $y = 0,081x + 0,0124$ $R^2 = 0,9999$
Правильность	Среднее значение процента восстановления 100,2 %
Сходимость	$X_{ср} = 10,19$ %; $S = 0,1589$; $RSD = 1,56$ %, $\epsilon\% = 1,64$ %
Воспроизводимость	$X_{ср} = 10,16$ %; $S = 0,16$; $RSD = 1,57$ %

Заключение. В результате проведенных исследований разработана и валидирована методика количественного определения фенольных соединений в сухом экстракте травы цикория обыкновенного. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту и абсолютно сухое вещество составило $10,19 \pm 0,18$ %. Разработанная методика может быть включена в проект фармакопейной статьи и использована для оценки качества сухого экстракта травы цикория обыкновенного.

Литература

1. Государственная фармакопея РФ XIV издания. Федеральная электронная медицинская библиотека Министерства здравоохранения Российской Федерации. ФС.2.5.0000.15 «Эхинацеи пурпурной трава». 2018. [Электронный ресурс]. – режим доступа: <http://femb.ru/feml>.
2. Патент № 2710270 РФ, МПК А61К 36/28 (2006.01), А61Р 37/02 (2006.01), В01D 11/02 (2006.01). Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью и способ его получения: №2019125854: заявл. 16.08.2019: опубл. 25.12.2019 / Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Радимич А.И., Дул В.Н., Николаев С.М., Хобракова В.Б., Мизина П.Г., Сидельников Н.И.
3. Al-Snafi A.E. Medical importance of Cichorium intybus. IOSR Journal of Pharmacy. 2016;6(3):41-56.
4. Guo-Yu Li, Jing-Kai Gu. Hepatoprotective effect of Cichorium intybus L., a traditional Uighur medicine, against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. World J Gastroenterol. 2014;20(16):4753-4760. DOI: 10.3748/wjg.v20.i16.4753
5. Kanj D., Raafat K., El-Lakany A., Baydoun S., Aboul-Ela M. Phytochemical Compounds of Cichorium intybus by Exploring its Antioxidant and Antidiabetic Activities. Pharmacognosy Journal. 2019;11:248-257. DOI: 10.5530/pj.2019.11.39

ИССЛЕДОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПЛОДАХ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО

Н.С. Соколов*, К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России,

г. Самара, Россия

e-mail: nikich15@icloud.com

Ключевые слова: лабазник вязолистный, *Filipendula ulmaria*, плоды, флавоноиды, рутин.

Введение. В настоящей работе приводятся результаты фитохимического исследования извлечений из плодов лабазника вязолистного - *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. С помощью разработанной ранее методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного, исследовано содержание флавоноидов в пересчете на рутин в зависимости от года сбора сырья. Полученные результаты исследования позволяют судить о целесообразности дальнейшего изучения влияния условий внешней среды (состав почвы, климатические характеристики времени сбора сырья и пр.) на накопление биологически активных соединений в сырье лабазника для разработки рекомендаций по сбору лекарственного растительного сырья. Растения рода Лабазник (Сем. розоцветные – *Rosaceae*) произрастают на территории Европейской части России и Сибири и широко используются в народной медицине (Губанов И.А. и др., 2004; Маевский П.Ф., 2006; Киселева Т.Л., Смирнова Ю.А., 2009). Два близкородственных вида: лабазник вязолистный и лабазник шестилепестный являются наиболее распространенными на территории Самарской области. Из литературных источников известно, что надземная часть лабазника вязолистного содержит биологически активные соединения, среди которых фенольные вещества (простые фенольные соединения, флавоноиды, дубильные вещества), сапонины и фитостерины (Шилова И.В., Краснов Е.А., 2006; Шилова И.В. и др., 2010; Куркин В.А. и др., 2020). Из плодов лабазника вязолистного с помощью колоночной хроматографии были впервые выделены ряд биологически активных соединений, в том числе флавоноиды спирезид и кверцетин. Богатый химический состав, обуславливает антимикробное и противовоспалительное действие извлечений из сырья лабазника вязолистного (Куркин В.А. и др., 2020). Известно также гепатопротекторное, антиоксидантное, диуретическое и ноотропное действие надземной части растения рода лабазник (Шилова И.В., Краснов Е.А., 2006; Шилова И.В. и др., 2010; Шилова И.В. и др., 2013; Куркин В.А. и др., 2020). Однако в настоящее время на территории Российской Федерации не

зарегистрированы и не реализуются лекарственные препараты на основе сырья лабазника. Создание препаратов на основе лекарственного растительного сырья растений рода лабазник позволил бы расширить ассортимент отечественных лекарственных препаратов с различным фармакологическим эффектом.

Цель. Целью настоящего исследования являлось изучение накопления флавоноидов в плодах лабазника вязолистного в зависимости от года сбора сырья. Полученный результат позволит судить о целесообразности дальнейшего исследования влияния условий внешней среды на накопление биологически активных соединений.

Материалы и методы. Объектами исследования служили плоды лабазника вязолистного, собранные в июле, в период с 2016 по 2019 год в Самарской области, в поселке Алексеевка. Сушка сырья проводилась естественным путем, под навесами. Количественный анализ образцов сырья проводили по разработанной ранее методике методом дифференциальной спектрофотометрии с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ Спектр, РФ) при длине волны 412 нм в пересчете на рутин (Сазанова К.Н., Соколов Н.С., 2019).

Результаты. С использованием разработанной методики проанализирован ряд образцов плодов лабазника вязолистного (табл.).

Таблица 1. Содержание суммы флавоноидов в образцах плодов лабазника вязолистного

№ п/п	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на рутин
1.	Самарская область, п. Алексеевка (июль 2016 г.)	2,66±0,05
2.	Самарская область, п. Алексеевка (июль 2017 г.)	2,54±0,08
3.	Самарская область, п. Алексеевка (июль 2018 г.)	2,03±0,04
4.	Самарская область, п. Алексеевка (июль 2019 г.)	2,33±0,06

Таким образом, содержание суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного незначительно варьирует в зависимости от года заготовки сырья, и находится в пределах от (2,03±0,04)% до (2,66±0,05)%.

Заключение. Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать для плодов лабазника вязолистного нижний предел содержания суммы флавоноидов не менее 2,0%. Полученные результаты исследования позволяют судить о целесообразности дальнейшего изучения влияния условий внешней среды (состав почвы, климатические характеристики времени сбора сырья и пр.) на накопление биологически активных соединений в сырье лабазника для разработки рекомендаций по сбору лекарственного растительного сырья.

Литература

1. Губанов И.А., Киселёва К.В., Новиков В.С., Тихомиров В.Н. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 3: Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). Москва: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2004. С. 369.
2. Киселева Т.Л., Смирнова Ю.А. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов. 2009. 295 с.
3. Куркин В.А., Сазанова К.Н., Зайцева Е.Н., Антидепрессантная активность флавоноидов и густого экстракта плодов лабазника вязолистного. *Хим.-фарм. журн.* 2020;54(8):10-12.
4. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2006. 292 с.
5. Сазанова К.Н., Соколов Н.С. Вопросы стандартизации плодов лабазника вязолистного, произрастающего на территории Самарской области. Аспирантские чтения-2019. Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета. Самара. 2019:278-280.
6. Шилова И.В., Краснов Е.А. Антиоксидантная активность экстрактов надземной части лабазника вязолистного. *Хим.-фарм. журн.* 2006;40(12):22-24.
7. Шилова И.В., Геренг Е.А., Жаворонок Т.В. и др. Гепатопротекторные свойства экстракта лабазника вязолистного. *Вопр. биол. мед. и фарм. химии.* 2010;2:28-32.
8. Шилова И.В., Самылина И.А., Суслов Н.И. Разработка ноотропных средств на основе растений Сибири. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура». 2013. 268 с.

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА, ПРИМЕНЯЕМОГО ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ

П.К. Турдалиева*, А.А. Ибрагимов, Ф.Х. Расулов

Ферганский государственный университет, г. Фергана, Узбекистан

e-mail: parizod70@mail.ru

Ключевые слова: лекарственные растения, фитоэкстракт, железодефицитная анемия.

Введение. В настоящее время большой интерес в качестве растительного сырья для получения новых иммуностимулирующих лекарственных препаратов представляют эдистериодсодержащие растения.

Распространенность фитостероидов в растениях Узбекистана, их биологическая активность и фармакологическое использование изучены в ряде работ (Бобаев И.Д. и др., 2012). Известно, что в патогенезе многих заболеваний большую роль играет состояние иммунной системы. В связи с этим сегодня создаются новые иммуномодулирующие препараты из растительных источников (Хабибуллаев Б.Б. и др., 2015), не обладающие побочным действием, для расширения арсенала существующих средств.

Цель. Изучение иммуностимулирующей и гемостимулирующей активности лекарственного сбора при экспериментальной гемолитической анемии.

Материал и методы. Следовательно, нами были выбраны лекарственные растения, содержащие наибольшее количество микроэлементов кровяного характера. Для эксперимента были собраны растения в сентябре 2019 года на территории села Ярлан Ферганского района. В исследованиях использовали надземную часть лекарственных растений, собранную в фазе цветения и высушенную. Макро- и микроэлементный состав растения определяли нейтронно-активационным методом в научной лаборатории научно-исследовательского института ядерной физики Академии наук Республики Узбекистан (Игамбердиева П.К., Ибрагимов А.А., 2014). Для изучения иммуно- и гемостимулирующей активности лекарственного сбора в работе использованы белые беспородные мыши 2-3-месячного возраста массой 18-23 г. Животных содержали при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. В каждой экспериментальной группе использовали по 6 особей животных. Для моделирования вторичного иммунодефицита лабораторным животным внутрибрюшинно в течение трёх дней вводили сернокислый фенилгидразин в дозе 30 мг/кг веса. Для определения напряженности иммунитета мышей однократно иммунизировали эритроцитами барана (ЭБ) в дозе 2×10^8 в последний день введения фенилгидразина. На 5-й день после иммунизации определяли количество клеток центральных и периферических органов иммунитета и количество антителообразующих клеток (АОК) в селезёнке по методу N. Jerne., A. Nordin (Jerne N.K., Nordin A.A., 1963). Кроме оценки иммунного статуса определяли количество эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови. Препараты вводили внутрибрюшинно вместе с ЭБ и на 4-й день однократно. При лечении железодефицитной анемии особое внимание обращается на обеспечение организма достаточным количеством микроэлементов, в частности железом, медью, цинком, кобальтом, хромом и марганцем, необходимыми для образования металлоорганических комплексов, участвующих в работе кровяных органов (Hart E.V. et al., 1937). Наиболее часто применяемой в фитотерапии суточной дозой является доза фитоэкстракта, получаемая экстрагированием из измельченного сухого сырья травянистых лекарственных растений объемом 1 столовая ложка, что для сбора растений составляет 5 г. Эта доза и была взята за основу при расчете терапевтической дозы фитоэкстрактов из растений. В качестве экстрагента использовали очищенную воду. Препарат (водный) получали двукратной экстракцией высушенного и измельченного сырья растительного сбора. Предварительно было установлено, что количество экстрактивных веществ, извлекаемый при дву- и трехкратной экстракции, практически одинаково. В процессе проведения эксперимента были соблюдены требования Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986). После декаптации брали пробы крови и органов иммунной системы. Для статистической обработки и анализа полученных результатов исследования, а также построения графиков на полученных данных был использован пакет прикладных программ статистического анализа Excel-2013 (Microsoft), SygmaStat 3.5, Sygma Plot 12.5 (Systat.Ins.). Для каждой выборки вычисляли средние величины (M), среднее квадратичное отклонение, среднюю ошибку средней арифметической (m). Оценку нормальности распределений проводили с использованием коэффициентов асимметрии и эксцесса. С целью определения значимости (достоверности) P различной сопоставляемых средних величин применялся критерий t Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ с вычислением критерия F Фишера. Разницу средних величин считали достоверной при $p < 0,05$. Статистические взаимосвязи между показателями оценивались применением корреляционного, регрессивного анализа и методов многомерной статистики (Расулов Ф.Х. и др., 2015).

Результаты. На 5-е сутки после иммунизации в контрольной группе в селезёнке образуется $5417 \pm 277,7$ АОК. У животных, получивших фенилгидразин антителогенез в селезёнке достоверно снизился в 2,5 раза, что указывает на развитие вторичного иммунодефицитного состояния. При расчёте АОК и ядродержащих клеток селезёнки (ЯСКС) на 1 млн. спленоцитов снизилось в 1,6 и в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой соответственно. Введение анемичным животным фитоэкстракта в 2,5 раза повысило иммунный ответ к ЭБ ($p < 0,05$), а под воздействием иммуномодулина – 2,0 раза. При расчёте количества АОК на 1 млн. спленоцитов их число при введении иммуномодулина и фитоэкстракта достоверно повысилось в 1,4 раза. Общее число ЯСКС было равно $689 \pm 43,2 \times 10^6$, а под воздействием фенилгидразина данный показатель снизился 1,5 раза. В 3-й группе у мышей, получивших иммуномодулин, восстановился уровень спленоцитов. Стимулирующий эффект фитоэкстракта в отношении числа ЯСКС равен 1,6. Таким образом, при создании экспериментальной модели фенилгидразиновой анемии у мышей наблюдается развитие глубокого иммунодефицита, что проявляется угнетением выработки антител на тимусзависимый антиген ЭБ. Введение иммунодефицитным животным препарата растительного происхождения способствует восстановлению иммунных механизмов антителообразования у животных с фенилгидразиновой анемией. Далее был изучен эффект фитоэкстракта на общее число клеток в центральных и периферических органах иммунитета у животных фенилгидразиновой анемии. В

контрольной группе число клеток в тимусе регистрируется $14,6 \pm 1,25 \times 10^6$, а при фенилгидразиновой анемии их уровень достоверно снижается в 1,6 раза ($9,1 \pm 2,2 \times 10^6$). Если мышам с фенилгидразиновой анемией ввести иммуномодулин, то число тимоцитов достоверно повышается в 1,2 раза, а растительного происхождения – в 1,8 раза. Следовательно, тимические клетки оказались достаточно чувствительными к воздействию стимулирующего фитоэкстракта. Таким образом, изученный растительный препарат обладает способностью повышать число клеток в тимусе мышей с фенилгидразиновой анемией. Установлено, что у мышей с вторичным иммунодефицитным состоянием общее число клеток в лимфатических узлах снижается в 1,6 раза. Фитоэкстракт достоверно в 2,1 раза повышает число клеток в лимфатических узлах. Иммуномодулин повышает число клеток в лимфатических узлах в 1,8 раз. На основании полученных данных можно прийти к заключению, что фитоэкстракт обладает способностью повышать число клеток в центральных и периферических органах иммунитета у животных, получавших серноокислый фенилгидразин. В следующих этапах нашего исследования был изучен эффект растительных средств на состояние периферических органов иммунитета. При патологии кроветворной системы нарушения происходят не только в системе иммунитета, но и в кроветворной системе. Так, число эритроцитов периферической крови у мышей с патологией крови уменьшается на 1,4 раза, то есть формируется анемия (контроль $7,5 \pm 2,2 \times 10^9$ /мл, анемия $5,4 \pm 1,0 \times 10^9$ /мл). Введение анемичным животным фитоэкстракта и иммуномодулина повышает число эритроцитов крови в 1,8 раза и 1,4 раза соответственно. При фенилгидразиновой анемии развивается лейкопения. Так, если у животных контрольной группы количество лейкоцитов $6,5 \pm 1,1 \times 10^6$ /мл, то у мышей с анемией оно уменьшается в 1,3 раза. Инъекция анемичным животным фитоэкстракта и иммуномодулина повышает количество лейкоцитов в 3,0 и 1,5 раза соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о способности изученного растительного сбора корректировать нарушения в иммунном статусе и системе кроветворения у мышей с фенилгидразиновой анемией.

Заключение. 1. При создании экспериментальной модели фенилгидразиновой анемии у мышей наблюдается развитие глубокого иммунодефицита, что проявляется угнетением выработки антител на тимусзависимый антиген ЭБ;
2. Введение иммунодефицитным животным препарата растительного происхождения способствует восстановлению иммунных механизмов антителиобразования у животных с фенилгидразиновой анемией;
3. Препарат растительного происхождения обладает способностью повышать число клеток в центральных и периферических органах иммунитета у животных, получавших серноокислый фенилгидразин;
4. Препарат растительного происхождения достоверно (в 1,8-3,0 раза) повышает уровень эритроцитов и лейкоцитов в крови мышей с фенилгидразиновой анемией.

Литература

1. Бобаев И.Д., Алимова М.Т., Путиева Ж.М., Рамазонов Н.Ш. Влияние препарата «Экдисилен» на гуморальный и клеточный иммунитет. *Журнал теорет. и клин. медицины.* 2012;5:6-9.
2. Игамбердиева П.К., Ибрагимов А.А. Определение минеральных веществ лекарственных растений южной Ферганы и перспективы их применения при лечении железодефицитной анемии. *Журнал Доктор Ахборотномаси.* 2014;2.
3. Расулов Ф.Х., Игамбердиева П.К., Усманов Р.Д. Влияние растительного сбора на иммунный ответ и гемопоэз при гемолитической анемии. *Журнал теоретической и клинической медицины.* 2015;4:72-75.
4. Хабибуллаев Б.Б., Батырбеков А.А., Шахабутдинов З.С., Иммуно- и гемомодулирующие свойства растительных средств при остром токсическом гепатите. *Журнал теорет. и клин. медицины.* 2015;4:94-96.
5. Hart E.B., Elvehjem C.A., Kohler G. Does liver supply factors in addition to iron and copper for hemoglobin regeneration in nutritional anemia? *J. Exp. Med.* 1937;66(2):(145—150).
6. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science.* 1963;140:405-407.

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ НЕКОТОРЫХ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ ЯКУТИИ

Л.К. Федорова, Н.К. Чирикова*

Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия

e-mail: flk_84@mail.ru, hofnung@mail.ru

Ключевые слова: Якутия, лекарственные растения, химический состав, биологически активные соединения.
Введение. Республика Саха (Якутия) – самая большая административно-территориальная единица в мире. Якутию называют краем «вечной мерзлоты». Условия криолитозоны оказывают существенное влияние на формирование всех факторов среды: климата, почвы, форм рельефа, растительности и т.д. Растительность Якутии представлена в основном тайгой, которая занимает около 75% территории. Флора включает около 1984 видов высших сосудистых растений, из них более 230 видов являются лекарственными (157 родов и 55 семейств), что составляет 12 % всей флоры сосудистых растений Якутии. На сегодняшний день известно

более 50 видов пищевых растений. Совмещение в одном регионе различных абиотических факторов отразилось не только на характере растительности Якутии, но и на химическом составе местных растений. Установлено, что местные растения, приспособившиеся к экстремальным условиям произрастания, более богаты питательными и различными биологически активными соединениями, чем такие же растения, произрастающие в более мягких условиях юга. Следует отметить относительную экологическую чистоту по сравнению с другими регионами России. Фитотерапия в Якутии возникла давно и вполне самобытна, о чем свидетельствует наличие многих оригинальных способов лечения, хотя, она обогатилась и совершенствовалась под многовековым влиянием медицины других народов. У некоторых растений при их общем сходном характере использования отмечаются некоторые оригинальные области применения или они в качестве растений в народной медицине указываются впервые и не прошли ни химической, ни фармакологической проверки. Богатая флора Якутии, наличие на ее территории обширных зарослей лекарственных растений с высоким содержанием биологически активных соединений и их большой интродукционный потенциал (с 230 видов лекарственных растений интродукции подвергалось 190 видов) определяют тенденцию к широкому использованию растительных ресурсов в качестве лекарственного растительного сырья. При этом следует учесть данные многих авторов, что для каждой популяции людей более полезными являются продукты, произведенные из растительного, животного и минерального сырья, заготовленного в местах ее исконного обитания. Работы, посвященные изучению химического состава в растениях Якутии, хотя и носили поисковый характер, но представляют большой научный и практический интерес. Полученные данные учеными о видовом составе, распространении, экологии и ресурсах лекарственных растений Якутии, а также эмпирический опыт использования местных растений в якутской народной медицине убеждают нас в том, что региональная флора Якутии, несмотря на свое высокоширотное положение и крайне суровые условия, в которых она существует, может стать источником полноценного лекарственного сырья.

Материалы и методы. Растительный материал был собран и высушен согласно требованиям, описанным в ГФ XIII (ГФ 2015). Для определения качественного содержания основных групп биологически активных соединений применяли методы ГФ XIII издания (ГФ 2015). Для определения количественного содержания основных групп фенольных соединений применяли спектрофотометрические методики: флавоноиды – дифференциальный метод в присутствии алюминия хлорида (в пересчете на гиперозид) (Chirikova N.K. et al., 2010), катехины – ванилин-серно-кислотный метод (в пересчете на (+)-катехин) (Sun B. et al., 1998), процианины – метод Porter (в пересчете на процианидин B₁) (Cáceres-Mella A. et al., 2013), эллаготанины – метод Wilson-Hagermann (в пересчете на эллаговую кислоту) (Wilson T.C., Hagerman A.E., 1990). Исследования проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе *Миллихром А-02 (Эконова)*, снабженным автосемплером, УФ-детектором и колонкой с обращено-фазовым сорбентом *ProntoSIL-120-5-C18 AQ* (2 × 75 мм, Ø 5 мкм; *Metrohm AG*). Методика пробоподготовки и ВЭЖХ-анализа описана нами ранее (Olennikov D.N. et al., 2014).

Результаты. В результате изучения распределения лекарственных растений Якутии по семействам, установлено, что преобладают виды из семейства: *Asteraceae*, *Rosaceae* и *Lamiaceae*. Нами проведен качественный анализ на содержание биологически активных соединений в лекарственных растениях Якутии. Всего к качественному скринингу на содержание биологически активных соединений подвергались 155 растений из 35 семейств. Лекарственные растения Якутии больше всего накапливают фенольные соединения, наиболее богаты фенольными соединениями растения из семейства *Rosaceae*, *Lamiaceae*, *Polygonaceae*. В результате исследования выявлено, что эфирноносных растений 14%. Качественный анализ показал также наличие в растениях Якутии алкалоидов, тритерпеновых сапонинов, иридоидов, каротиноидов, сердечных гликозидов и аскорбиновой кислоты. Более полному скринингу были подвергнуты растения с семейства *Rosaceae*. В результате исследования для 29 видов, представителей 15 родов и 4 подсемейств, было определено содержание основных групп фенольных соединений, характерных для изучаемого семейства (флавоноидов, катехинов, процианидинов, гидролизуемых танинов). Содержание флавоноидов в надземной части исследованных видов варьировало от 10.28 (*Rubus arcticus*) до 46.24 мг/г (*Spiraea salicifolia*), катехинов – от 1.51 (*Comarum palustre*) до 183.53 мг/г (*Cotoneaster lucidus*), процианидинов – от 0.93 (*Rosa dahurica*) до 119.37 мг/г (*Cotoneaster lucidus*), гидролизуемых танинов – от 4.26 (*Rosa jacutica*) до 53.06 мг/г (*Chamaerhodos erecta*). Показатели содержания в различных подсемействах *Rosaceae* варьировали в широких пределах. Для представителей подсемейства *Rosoideae* были отмечены минимальные концентрации катехинов и процианидинов, однако присутствие гидролизуемых танинов было отмечено только в видах данного подсемейства. Виды *Pomoideae* (особенно виды *Cotoneaster* и *Crataegus*) характеризуются как (гипер)концентраторы катехинов и процианидинов. Промежуточные показатели содержания были отмечены для представителей подсемейств *Spiraeoideae* и *Prunoideae*. Присутствие эллаготанинов в семействе *Rosaceae* выявлено только в видах, входящих в подсемейство *Rosoideae*. Накопление отдельных групп эллаготанинов в подсемействе *Rosoideae* характеризуется родо-специфичностью; так, эллаготанины, содержащие остаток дегидродигалловой кислоты отмечены в родах *Chamaerhodos*, *Comarum*, *Fragaria* и *Geum*, сангвисорбоил-содержащие эллаготанины накапливаются в родах *Rubus* и *Sanguisorba*, а валонеильные эллаготанины – в родах *Filipendula* и *Rosa*.

Заключение. Учитывая сведения о химическом составе и биологической активности отдельных соединений, наиболее перспективными для дальнейшего изучения и внедрения в фармацевтическую практику имеют следующие виды: *Comarum palustre*, *Chamaerhodos erecta*, *Fragaria orientalis*, *Geum allepicum*, *Rosa acicularis*, *Rubus matsumuranus*, *Rubus saxatilis*.

Литература

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. Москва: МЗ РФ. XIII изд., 2015. 1470 с
2. Cáceres-Mella A., Peña-Neira Á., Narváez-Bastias J., Jara-Campos C., López-Solis R., Canals J.M. Comparison of analytical methods for measuring proanthocyanidins in wines and their relationship with perceived astringency. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2013;48:2588-2594.
3. Chirikova N.K., Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. Quantitative determination of flavonoid content in the aerial parts of Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi). *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010;36:915-922.
4. Olennikov D.N., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Kuz'mina S.S. Rapid method for simultaneous determination of major phenolics in *Potentilla anserina* L. (Rosaceae) herb by microcolumn RP-HPLC-UV. *Molecules.* 2014;19:224-248.
5. Sun B., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46:4267-4274.
6. Wilson T.C., Hagerman A.E. Quantitative determination of ellagic acid. *J. Agric. Food Chem.* 1990;38:1678-1683.

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЕ ВЕЩЕСТВ – АНТИОКСИДАНТОВ В ТРАВЕ ГОРЦА ПЕРЕЧНОГО И ГОРЦА МАЛОГО

А.С. Чистякова, А.С. Болгов, А.А. Гудкова*

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, г. Воронеж, Россия

e-mail:al.f84@mail.ru

Ключевые слова: горец перечный, горец малый, аскорбиновая кислота, фенольные соединения, антиоксиданты.

Введение. Современное общество подвергается влиянию различных неблагоприятных факторов (окружающей среды, стресса и т.д.), что способствует запуску механизмов свободно-радикального окисления, которые протекают в организме человека и способствуют возникновению разнообразных заболеваний (Pozdnyakova T.A., Bubenchikov R.A., 2019). При этом запускаются реакции, влекущие за собой целый каскад биохимических превращений, результатом которых, является образование свободных радикалов. Одним из способов борьбы с образованием свободных радикалов является использование средств, обладающих способностью тормозить образование перекисных соединений и нейтрализовать свободные радикалы (Мальцева Е.М. и др., 2017). К данным соединениям можно отнести органические кислоты (в их числе аскорбиновая кислота) и фенольные соединения (дубильные вещества, флавоноиды и др.) (Тринеева О.В. и др., 2020). Среди источников данных соединений необходимо выделить растения рода горец (*Persicaria* Mill). Среди всего видового разнообразия видов данного рода фармакопейным является только горец перечный (*Persicaria hydropiper* Delarbre). Наиболее близким видом к горцу перечному, который зачастую выступает примесным к нему, является горец малый (*Persicaria minor* Oriz).

Цель. Целью работы являлось сравнительное изучение содержания соединений, обладающих антиоксидантной активностью в траве горца перечного и горца малого, заготовленных в Воронежской области.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись образцы высушенной травы горца перечного *Persicaria hydropiper* Delarbre. и горца малого *Persicaria minor* Oriz, которые заготавливались в летний период во время их полного цветения на территории Воронежской области (пос. Рыбачье). Растительное сырье подвергалось высушиванию воздушно – теневым способом и хранилось в сухом, проветриваемом помещении. Качество фармакопейного вида (горца перечного) оценивалось в соответствие с ГФ РФ XIV ФС «Горца перечного трава», для горца малого травы также были установлены основные параметры ее доброкачественности (влажность и т.д.). Для изучения в работе были выбраны соединения, обладающие антиоксидантной активностью – аскорбиновая кислота, дубильные вещества, флавоноиды и сумма веществ – антиоксидантов. Содержание аскорбиновой кислоты и суммы органических кислот, в пересчете на яблочную, устанавливали согласно методикам, изложенной в ФС «Рябины обыкновенной плоды» ГФ РФ XIV изд. Оценку содержания суммы дубильных веществ в пересчете на танин проводили по методике ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ РФ XIV изд. Флавоноиды оценивали спектрофотометрически согласно ФС «Горца перечного трава» (Чистякова А.С., Гудкова А.А., 2020). Количественное определение суммы веществ, обладающих антиоксидантной активностью (АОА) проводили, используя оригинальную методику Т.В. Максимовой с соавт. (Патент РФ №2170930). Пересчет содержания суммы веществ антиоксидантов проводили на аскорбиновую кислоту (стандарт - 0,1% водный раствор аскорбиновой кислоты) для водного извлечения и на рутин (стандарт – 0,01% спиртовой раствор рутина) для спиртового. Для проведения

эксперимента из растительного сырья готовили водные (1:10) и спиртовые (1:50) извлечения путем кипячения объектов с экстрагентом на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут.

Результаты. Первым этапом исследования являлась количественная оценка основных биологически активных соединений (БАВ), присутствующих в траве изучаемых видов горцев, и способных отвечать за антиоксидантное действие (аскорбиновая кислота, органические кислоты, дубильные вещества и флавоноиды). В результате работы было установлено, что в траве горца перечного содержится большее количество БАВ, чем в траве горца малого. Было выявлено, что объекты исследования содержат малое количество аскорбиновой кислоты (около 0,1%). В траве горца перечного содержание суммы органических кислот в пересчете на яблочную составило 5,16%, что ненамного выше, чем в траве горца малого (4,47%). Количественное содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин в траве горца перечного (12,3%) на 30% выше, чем в траве горца малого. Сумма флавоноидов, в пересчете на рутин в большем количестве также характерно для горца перечного (2,46%).

Таблица 1. Содержание органических кислот и фенольных соединений в траве горца перечного и горца малого (% в пересчете на абсолютно сухое сырье, n=5)

Объект	Аскорбиновая кислота, %	Сумма органических кислот, в пересчете на яблочную, %	Сумма дубильных веществ в пересчете на танин, %	Сумма флавоноидов, в пересчете на рутин, %
Горец перечный	0,155 ± 0,004	5,16±0,20	12,30±0,12	2,46±0,10
Горец малый	0,100 ± 0,003	4,47±0,16	9,50±0,04	1,35±0,08

На следующем этапе работы была произведена оценка содержания суммы веществ – антиоксидантов в траве изучаемых видов горцев. Было выявлено, что количество веществ – антиоксидантов в водном извлечении из травы горца перечного и горца малого находится на одинаковом уровне (0,11 – 0,19 мг/мл извлечения). Спиртовое извлечение из травы изучаемых растений имеет более высокое содержание суммы веществ–антиоксидантов, при этом наибольшее их количество характерно для травы горца перечного (2,46 мг/мл извлечения).

Таблица 2. Содержание веществ–антиоксидантов в траве горца перечного и горца малого (мг/мл)

Объект	Водное извлечение (в пересчете на аскорбиновую кислоту)	Спиртовое извлечение (в пересчете на рутин)
Горец перечный	0,190±0,009	2,69±0,19
Горец малый	0,114±0,006	1,51±0,07

Полученные данные позволили установить наличие у изучаемых видов горцев наличие антиоксидантных свойств, что позволит в дальнейшем рассматривать данные растения в качестве перспективных видов для получения лекарственных растительных препаратов или продуктов функционального питания, обладающих антиоксидантными свойствами.

Заключение. В результате количественной оценки органических кислот и фенольных соединений, установлено, что максимальное их количество характерно для горца перечного травы. Изучение содержания суммы веществ, обладающих антиоксидантной активностью, показало, что наибольшее их количество наблюдается для спиртовых извлечений горца перечного травы, водные извлечения из травы горца перечного и малого практически не различаются по их содержанию.

Литература

1. Государственная фармакопея Российской Федерации: в 4 т. – 14-е изд. – Москва, 2018. – URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 14.06.2021).
2. Мальцева Е.М., Егорова Н.О., Егорова И.Н., Мухамадияров Р.А. Антиоксидантная и антирадикальная активность *in vitro* травы *Sanguisorba officinalis* L., собранной в различные фазы развития. *Медицина Кубани*. 2017;16(2):32-38.
3. Патент РФ №2170930 Рос. Федерация, МПК7 G01N33/50, G01N33/52 Способ определения антиокислительной активности. Т. В. Максимова; заявитель и патентообладатель Московск. мед. акад. им. И. М. Сеченова. – № 2000111126/14; заявл. 05.05.2000; опубл. 20.07.2001. 6 с.
4. Тринеева О.В., Сливкин А.И., Сафонова Е.Ф. Определение антиоксидантной активности извлечений из листьев крапивы двудомной различными методами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):59-66.
5. Чистякова А.С., Гудкова А.А. Биологически активные вещества и минеральный состав травы горца малого. *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов*. Пятигорск. 2020;75:105 – 109.
6. Pozdnyakova T.A., Bubenchikov R.A. The study of antioxidant activity of the herb *Astragalus glycyphyllus* L. *Aspirantskiy Vestnik Povolzh'ya*. 2019;19(1-2):27-32.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТОЦИАНОВ В ЦВЕТКАХ ФАЦЕЛИИ ПИЖМОЛИСТНОЙ (*PHACELIA TANACETIFOLIA* BENTH.)

П.А. Шейхмагомедова*

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России,
г. Пятигорск, Россия
e-mail: patya16101998@yandex.ru

Ключевые слова: фацелия пижмолистная, *Phacelia tanacetifolia* Benth., водолистниковые, цветки, антоцианы.

Введение. На сегодняшний день научной медициной недостаточно широко используются многие лекарственные растения, так как являются малоизученными (Леонова В.Н. и др., 2019). При этом всё чаще потребитель отдаст предпочтение именно лекарственным препаратам на основе лекарственного растительного сырья, которые оказывают более мягкое, но не менее эффективное действие на организм (Бутенко Л.И., Подгорная Ж.В., 2016). Фитопрепараты представляют собой многокомпонентные комплексы биологически активных веществ, благодаря чему обладают большим спектром терапевтического действия по сравнению с препаратами синтетического происхождения (Бутенко Л.И., Подгорная Ж.В., 2016). Антоцианы – это водорастворимые растительные пигменты, отвечающие за голубую, пурпурную и красную окраски различных вегетативных частей растений. Антоцианы относятся к большой группе природных соединений, таких как флавоноиды. Яркая окраска цветков и плодов играет большую роль в привлечении насекомых-опылителей и в распространении плодов. Растения, содержащие большое количество антоцианов, обладают повышенной стойкостью к загрязнению воздуха кислыми газами промышленных предприятий (Тохсырова З.М. и др., 2016). Качественный состав антоцианов зачастую стабилен и специфичен для конкретного вида растения, однако, имеет зависимость от особенностей и условий произрастания растения (Макаревич А.М. и др., 2009). Антоцианы обладают антиканцерогенным действием, уменьшают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, улучшают остроту зрения, а также проявляют антиоксидантную активность. Это мощные антиоксиданты, обладающие большей эффективностью, чем α -токоферол и аскорбиновая кислота. Кроме того, они характеризуются противовоспалительными, антимикробными, гепатопротекторными свойствами (Куркин В.А., Рязанова Т.К., 2012; Леонова В.Н. и др., 2019). Не следует оставлять без внимания растения иноземной флоры, которые могут выращиваться в климатических условиях России и служить источниками биологически активных веществ. Фацелия пижмолистная – это малоизученное, но перспективное для изучения растение. Родиной фацелии пижмолистной является юго-запад США, встречается на территории Калифорнийской долины и пустыни Калифорнии, а также Нижней Калифорнии. В «Illustrated Flora of the Pacific States: Washington, Oregon, California» автора Leroy Abrams (1951) дана подробная характеристика морфологических особенностей фацелии пижмолистной. Растение культивируется в России: в Западной Сибири и на Кавказе. В народной медицине лекари Западной Сибири используют мёд на основе фацелии. К основным свойствам данного продукта относят: жаропонижающее, антибактериальное, заживляющее при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Его также используют для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, для повышения иммунитета, в качестве общеукрепляющего и тонизирующего средства. Метод УВЭЖХ (ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии) позволил выявить в составе фацелиевого мёда следующие химические вещества: 6 соединений, содержащих азот, включая ароматические кислоты (тирозин, фенилаланин), производные пурина (аденин, ксантин), нуклеозид уридин (Natalia Stanek et al., 2019). Помимо того, данное растение широко используется как сидерат. Фацелия превратит в рыхлую и плодородную даже самую плотную и бедную почву. Посевы растения позволяют сохранять влагу в почве, предотвращают ее от пересыхания и выветривания, не допускают уплотнения верхнего слоя земли, подавляют рост сорняков. Выбранное растение представляет научный интерес. Ранее в проведенных исследованиях было установлено содержание в траве фацелии флавоноидов, фенолкарбоновых кислот и кислоты аскорбиновой (Шейхмагомедова П.А., Попова О.И., 2019; Шейхмагомедова П.А., Попова О.И., 2020). Данная статья посвящена изучению количественного содержания антоцианов в цветках фацелии.

Цель. Целью работы является количественное определение суммы антоцианов в цветках фацелии пижмолистной как источника биологически активных веществ.

Материалы и методы. Для проведения исследования были использованы цветки фацелии пижмолистной, выращиваемой на территории Ставропольского края. Образцы сырья были заготовлены в 2019 году, на экспериментальном участке ФГБНУ «Северо-кавказский научный аграрный центр», г. Михайловск. Сырьё сушили естественным путем под навесом без прямого попадания солнечного света. Использовали мерную стеклянную посуду и химические реактивы квалификации «х.ч». Для исследования количественного содержания антоцианов в цветках фацелии пижмолистной опирались на методику количественного определения суммы антоцианов в цветках василька синего, включённую в ГФ РФ XIV изд. (Андреева В.Ю. и др., 2013). Извлечение получали путём экстрагирования точной навески сырья кислотой хлористоводородной 1% в колбе со шлифом на водяной бане при температуре 40-45 в течение 15 минут. Полученное извлечение фильтровали, а вату с сырьём помещали в колбу и таким же образом получали

второе извлечение. Полученные извлечения объединяли, фильтровали в колбу на 250 мл, и содержимое колбы доводили до метки кислотой хлористоводородной 1%.

Результаты. Оптическую плотность полученного фильтрата измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) при длине волны 510 нм. Раствором сравнения выступал раствор 1% кислоты хлористоводородной. Содержание суммы антоцианов проводили в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид в абсолютно сухом сырье по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 250 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

a – навеска сырья, г;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения цианидин-3,5-дигликозида при длине волны 510 нм, равный 453;

W – влажность сырья, %.

По результатам измерения оптической плотности были получены данные, представленные в таблице 1. Была проведена статистическая обработка данных, найдены абсолютная и относительная погрешности.

Таблица 1. Результаты количественного определения содержания суммы антоцианов в цветках фацелии пижмолистной

Масса навески, г	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	Влажность сырья, %		Оптическая плотность	Содержание антоцианов, %	
0,3024	453	8,4		0,25	0,4981	
0,3018				0,28	0,5589	
0,2997				0,27	0,5428	
0,3216				0,28	0,5245	
0,3156				0,27	0,5379	
0,3042				0,26	0,5149	
Метрологические характеристики анализа						
$X_{\text{ср}}, \%$	S^2	S	P, %	t	$\pm X$	E, %
0,5295	0,00038932	0,01973124	95	4,3	0,017	0,032

Исходя из табличных данных, количественное содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид в цветках фацелии пижмолистной составило 0,5295%.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования по количественному определению антоцианов установлено, что их количество в цветках фацелии пижмолистной составляет $0,5295 \pm 0,017\%$. Поскольку антоцианы являются растительными пигментами, можно предположить, что пурпурно-синяя окраска цветков фацелии пижмолистной связана с содержанием антоциана – пеонидина, предшественником которого является цианидин.

Литература

1. Андреева В.Ю., Калинин Г.И., Коломиец Н.Э., Исайкина Н.В. Методика определения антоцианов в плодах аронии черноплодной. *Фармация*. 2013; №3:19-21.
2. Бутенко Л.И., Подгорная Ж.В. Исследования антоцианового комплекса ягод, прошедших криообработку. *Успехи современного естествознания*. 2016; 11(1):14-17
3. Куркин В.А., Рязанова Т.К. Новые подходы к стандартизации плодов черники обыкновенной. *Химия растительного сырья*. 2012; 46:167-173.
4. Леонова В.Н., Попов И.В., Попова О.И., Зайцев В.П. Количественное определение суммы фенольных соединений в плодах *Rhus typhina*(L.). *Химия растительного сырья*. 2019; 1:225-232.
5. Макаревич А.М., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Решетников Н.В. Функции и свойства антоцианов растительного сырья. Труды Белорусского государственного университета. Серия: «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». 2009; 4(2):147-157.
6. Тохсырова З.М., Попов И.В., Попова О.И. Определение подлинности листьев и побегов розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis* L.) методом ТСХ. Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. Ижевск. 2016: 74-76.
7. Шейхмагомедова П.А., Попова О.И. Фитохимическое исследование фацелии пижмолистной. Материалы 67-й Всероссийской научной конференции молодых ученых и студентов с международным участием. Махачкала: ИПЦ ДГМУ. 2019:575–578.
8. Шейхмагомедова П.А., Попова О.И. Исследование водного извлечения фацелии пижмолистной (*Phacelia tanacetifolia* Benth.). Беликовские чтения: материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции. 2020:307-314.

9. ФС.2.5.0064.18 Василька синего цветки. Государственная Фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]: в 4 т.- 14изд.- М.: МЗ РФ, 2018.-Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
10. Natalia Stanek, Dariusz Teper, Pawet Kafarski, Izabela Jasicka-Misiak. Authentication of phacelia honeys (*Phacelia tanacetifolia*) based on a combination of HPLC and HPTLC analyses as well as spectrophotometric measurements. *LWT - Food Science and Technology*. 2019;107:199-207.

ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫЕ ПИРАНОКУМАРИНЫ: ОТ ВЫДЕЛЕНИЯ ДО ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Э.Э. Шульц^{1*}, Ж. Ганбаатар², В.В. Тараскин³, Б.М. Урбагарова³, Л.Д. Раднаева³

¹Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, Россия

²Институт химии и химической технологии академии наук Монголии, г. Улан-Батор, Монголия

³Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ, Россия

e-mail:schultz@nioch.nsc.ru

Ключевые слова: пиранокумарины, птериксин, келлактоны, противоопухолевая активность. **Введение.** Ангулярные пиранокумарины широко представлены в растениях семейства зонтичные (*Umbelliferae*, или сельдерейные - *Ariaceae*). Так, установлено, что такие виды горчичников как *Peucedanum praeruptorum* и *Peucedanum japonicum*, высоко востребованы в современной медицинской практике для лечения опухолевых заболеваний (модуляторы Р-гликопротеина (Mizuno A. et al., 1994; Shen X. et al., 2012), диабета (защита от повреждения β-клеток поджелудочной железы, вызванным окислительным стрессом) (Lee S.O. et al., 2004), ожирения (Okabe T. et al., 2011), а также в качестве антимикробных, антибактериальных (Rani P., Khullar N., 2004) и противовирусных (Rajtar B. et al., 2012) агентов благодаря наличию в них пиранокумаринов.

Результаты. Нами получены данные по составу кумаринов растений *Peucedanum terebinthaceum* Fischer et Turcz. и *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk., произрастающих на территории Бурятии и Северной Монголии. Предложены методики выделения и разделения индивидуальных кумаринов указанных растений. Экстракцией корней *P. terebinthaceum* выделены фурукумарины дельтоин, пеucedанин и пиранокумарины декурсин, (+)-птериксин. Выход последнего достигает 0.98%. Последовательная экстракцией корней *S. divaricata* растворителями возрастающей полярности выделили фуранокумарины бергаптен, изоимператорин, оксипеucedанин гидрат, мармезин, линейный пиранокумарин (+)-декусинол и ангулярный пиранокумарин (-)-прерупторин. Строение пиранокумаринов (+)-птериксина (из *P. Terebinthaceum*) и (-)-прерупторина В (из *S. divaricata*) подтверждается результатом их гидролиза в щелочной среде до (+)-*цис*- и (-)-*транс*-келлактонов или (-)-*цис*- и (+)-*транс*-келлактонов, спектральными данными и РСА. Предложены условия получения (+)-*цис*-келлактона.

Заключение. Получены данные о противоопухолевой активности указанных нативных кумаринов. (+)-Птериксин рассмотрен в качестве источника (+)-*цис*-келлактона, на основе которого синтезирован ряд противовирусных (анти-ВИЧ) агентов.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-53-44003).

Литература

1. Lee S.O., Choi S.Z., Lee, J.H. Antidiabetic coumarin and cyclitol compounds from *Peucedanum japonicum*. *Arch. Pharm. Res.* 2004;27:1207-1210.
2. Mizuno A., Okada Y., Nishino H., Okuyama T. Inhibitory effect of coumarins isolated from Bai-Hu Okabe T., Toda T., Nukitangsan N., Inafuku M., Iwasaki H., Oku H. *Peucedanum japonicum* Thunb inhibits high-fat diet induced obesity in mice. *Phytotherapy Res.* 2011;25:870-877.
3. Qian-Hu on two stage carcinogenesis. *J. Trad. Med.* 1994;11:220.
4. Shen X., Chen G., Zhu G. 3'-O, 4'-O-aromatic acyl substituted 7, 8-pyranocoumarins: a new class of P-glycoprotein modulators. *J. Pharmacy Pharmacol.* 2012;64:90-100.
5. Rajtar B., Skalicka-Woźniak K., Polz-Dacewicz M., Główniak K. The influence of extracts from *Peucedanum salinum* on the replication of adenovirus type 5. *Arch. Med. Sci.* 2012;8:43.
6. Rani P., Khullar N. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. *Phytotherapy Res.* 2004;18:670-673.

FRAXINELLONE FROM *SILENE CLAVIFORMIS*

U.Yu. Yusupova*, R. Okmanov

Institute of the Chemistry of Plant Substances AS RUz, Tashkent, Uzbekistan

e-mail:yusupovauyu@gmail.com

Key words: *Silene claviformis*, X-ray, fraxinellone (FRA), anticancer.

Introduction. Nowadays the problem of increasing the general nonspecific resistance of the organism to stressful factors is relevant problem due to the frequent work of a human in extremely adverse climatic and industrial conditions, deteriorating environmental conditions, poor nutrition and many other destabilizing factors. An estimated 5–6% of the terrestrial plant species accumulate detectable levels of ecdysteroids, among which *Ajuga*, *Serratula* and *Silene* containing high amounts of these compounds, are good sources of ecdysteroids (Dinan L.A., 1995). From the point of view, of the search for ecdysteroid-containing plants among the representatives of the domestic flora, plants of the genus *Silene* (Smolevka, family *Caryophyllaceae*) seem promising. This genus, with about 400 representatives in the world flora, is represented by 153 in the CIS and 84 species in Central Asia (Bondarenko O.N., 1971). FRA was first isolated in 1923, its chemical defined in 1965 (Pailer M. et al., 1965) and its configuration established the following years (Coggon P., McPhail A.T., 1965; Coggon P., McPhail A.T., 1975). From a structural viewpoint, FRA is a tetrahydro-benzofuranone derivative substituted with methyl and furan groups which lie on the same side of the fused ring system (Gu H.M. et al., 2011). The appellation «degraded limonoid» indicates that the product comes from the biological degradation of an original tetranotriterpenoid skeleton which has only preserved the C,D-ring portion of the original fused 4-rings molecules. It would derive from a precursor (with a 4,4,8-trimethyl-17-furanylsteroid skeleton) structurally related to the tetra/pentacyclic limonoids obacunone, kihadanin A-D and limonin which degrade to produce compounds like calodendrolide and fraxinellone (figure 1). These different compounds, found in the root barks of *D. dasycarpus* (Bai Y.Y. et al., 2014; Guo X.X. et al., 2018), belong to a larger group of furan-containing limonoids that include also toosendanin, nomiline, dumsin, azadiradione, cedrelone and many others (Roy A., Saraf S., 2006; Heasley B., 2011; Tundis R. et al., 2014). The compound has revealed also antibacterial and insecticidal activities, and more recently anti-inflammatory and anticancer activities. The potent antifibrotic action of FRA has led to the investigation of FRA as an anticancer agent, to inactivate cancer-associated fibroblasts and thus to induce a remodeling of the tumor microenvironment. An elegant demonstration of this activity has been brought recently (Pei Y. et al., 2019). Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of functionally polarized tumor-associated macrophages (Takahashi H. et al., 2017). It is therefore totally appropriate to use a drug like FRA to deactivate cancer-associated fibroblasts and thus to limit the immunosuppressive tumor microenvironment. Caryophyllaceae species are known for their rich content in bioactive metabolites, such as flavonoids (Atta E.M. et al., 2013), triterpene saponins (Jia Z. et al., 1998), phytoecdysteroids and oligosaccharides (Coggon P., McPhail A.T., 1965). The *Silene* genus (Caryophyllaceae) comprises more than 700 species widely distributed in temperate zones of the world (Dyubankova N. et al., 2010).

Aim. The aim of this study was to investigate the secondary metabolites of *Silene claviformis* Litv. (Caryophyllaceae) and study the biological activity.

Materials and methods. *Silene claviformis* was collected in June of 2015 from Tashkent region of mountains and the plant materials were identified by Dr. Nigmatullayev A.M. at the Institute of the Chemistry of Plant Substances (ICPS), Uzbekistan. A voucher specimen (No. 2515) has been deposited in the herbarium Department of Herbal Plants in the ICPS, Tashkent, Uzbekistan. The fraxinellone was isolated from *Silene claviformis* using chromatographic methods. Silica gel KSK 100/160 μm have been used for column chromatography. Thin-layer chromatography made on Silufol UV-254 and Merck plates, Fluka Analytical Germany, by spraying with alcohol solution of vanillin and heating for 1-2 minutes for 90-100°C, UV lamp light at 254 nm and 365 nm. Their structure was confirmed by X-Ray.

Results. Column chromatography investigation of *Silene claviformis* plant allowed the identification, and the fraxinellone was reported for the first time from this genus. In the title compound, $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_3$ [systematic name: (3R*,3aR*)-3-(3-furanyl)-3a,7-dimethyl-3a,4,5,6-tetrahydro-2-benzofuran-1(3H)-one], the pendant methyl and furan groups attached to the stereogenic centres lie to the same side of the fused ring system. Crystal data $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_3$ Mr = 232.27 Orthorhombic, P2(1)2(1)2(1); a = 5.9483 (5) Å, b = 12.6927 (10) Å, c = 15.9483 (10) Å⁰, Structure of this compound shown in figure 1.

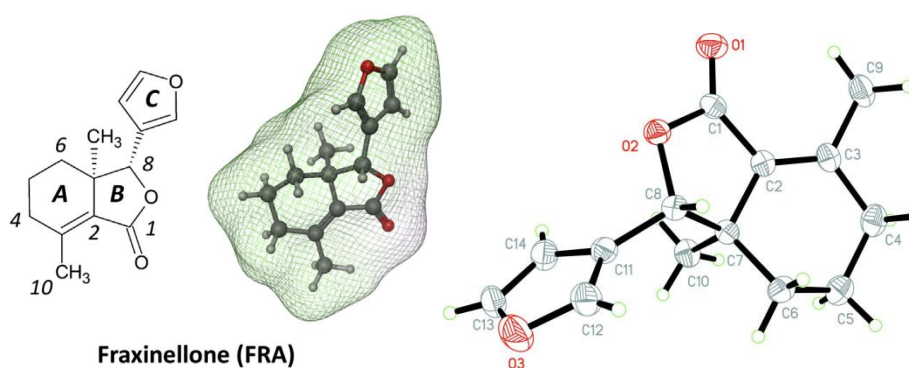


Fig. 1. Structure of fraxinellone

Conclusion. Our studies have shown that fraxinellone was reported for the first time from *Silene* genus. It also inhibited activation of STAT3 by the JAK1, JAK2, and Src pathways. Moreover, fraxinellone inhibited cell proliferation and angiogenesis through suppression of PD-L1. Taken together, fraxinellone inhibits PD-L1 expression by downregulating the STAT3 and HIF-1 α signaling pathways, thereby inhibiting proliferation and angiogenesis in cancer cells. This mechanism could provide new perspectives for the development of fraxinellone as an anticancer drug.

References

1. Atta E.M., Nassar A.A., Hasan N.M., Hasan A.R.. New flavonoid glycoside and pharmacological activities of *Pteranthus dichotomus*. *J. Nat. Prod.* 2013;7:69-79.
2. Bai Y.Y., Tang W.Z., Wang X.J. Chemical constituents from root bark of *Dictamnus dasycarpus*. *Zhongyaocai: Journal of Chinese medicinal materials.* 2014;37:263–265.
3. Bondarenko O.N. Genus *Silene* L. Smolevka. In the book: Key to plants of Central Asia, Tashkent. 1971:253-277.
4. Dinan L.A. strategy for the identification of ecdysteroid receptor agonists and antagonists from plants. *Eur. J. Entomol.* 1995;92:71–283.
5. Dyubankova N., Lescrinier E., Ende W. Metabolism of galactosyl-oligosaccharides in *Stellaria media*-Discovery of stellariose synthase, a novel type of galactosyltransferase. *Phytochemistry.* 2010;71:1095-1103.
6. Coggon P., McPhail A.T. The structure and absolute configuration of fraxinellone, a biogenetically intriguing terpenoid from *Dictamnus albus* L. *Chem. Comm.* 1969:828.
7. Coggon P., McPhail A.T. Structure and absolute configuration of fraxinellone: X-ray analysis of 9 β -bromofraxinellone. *J. Chem. Soc. B.* 1975:1521–1524
8. Golea L., Benkhaled M., Lavaud C., Long Ch., Haba H. Phytochemical components and biological activities of *Silene arenarioides*. *J. Nat. Prod. Res.* 2017;31(23):2801-2805.
9. Gu H.M., Xu H., Zhong Z.Z., Zhu H.L., Li Q.S. Fraxinellone. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* 2011;67:1472.
10. Guo X.X., Zhao L.N., Wang J., Liu S., Bi Q.R., Wang Z., Tan N.H. Chemical constituents from root barks of *Dictamnus dasycarpus* and their cytotoxic activities. *Zhongguo. Zhong. Yao. Za. Zhi.* 2018;43:4869–4877.
11. Heasley B. Synthesis of Limonoid natural products. *Eur. J. Org. Chem.* 2011:19–46.
12. Jia Z., Koike K., Nikaido T. Major triterpenoid saponins from *Saponaria officinalis*. *J Nat. Prod.* 1998; 61, 1368-1373.
13. Roy A., Saraf S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* 2006;29:191–201.
14. Pailer M., Schaden G., Spiteller G. Die Konstitution des Fraxinellons. *Monatsh. Chem.* 1965;96:1324–1346
15. Pei Y., Chen L., Huang Y., Wang J., Feng J., Xu M., Chen Y., Song Q., Jiang G., Gu X., Zhang Q., Gao X., Chen J. Sequential targeting TGF- β Signaling and KRAS mutation increases therapeutic efficacy in pancreatic Cancer. *Small.* 2019;15:e1900631.
16. Takahashi H., Sakakura K., Kudo T., Toyoda M., Kaira K., Oyama T., Chikamatsu K. Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget.* 2017;8:8633–8647.
17. Tundis R., Loizzo M.R., Menichini F. An overview on chemical aspects and potential health benefits of limonoids and their derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014;54:225–250.

Рациональное природопользование

ФИТОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Е.В. Вихарева^{1*}, А.А. Селянинов², Е.А. Тюмина³

¹Пермская государственная фармацевтическая академия, г. Пермь, Россия

²Пермский национальный исследовательский политехнический университет г. Пермь, Россия

³Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Пермь, Россия

e-mail:ajm@perm.ru

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота, парацетамол, биодеструкция, актинобактерии рода *Rhodococcus*, продукты бактериальной деструкции, фитостимулирующие свойства.

Введение. Широкое использование лекарственных средств и несовершенство способов утилизации фармацевтических отходов приводит к неизбежному попаданию их в окружающую среду (aus der Beek T. et al., 2016).

Цель. поиск эффективных биотехнологических способов переработки фармотходов для получения на их основе новых биологически активных соединений, в том числе фитостимулирующего действия. В качестве объектов исследования использованы повсеместно детектируемые в окружающей среде представители нестероидных противовоспалительных лекарственных средств – парацетамол и ацетилсалициловая кислота. Изучены процессы метаболизации этих веществ, осуществляемые с участием актинобактерий рода *Rhodococcus*. Показано, что в результате бактериальной трансформации парацетамола и ацетилсалициловой кислоты образуются новые нетоксичные продукты, обладающие ростостимулирующим действием на фитокультуры (Коротаев М.Ю. и др., 2016а).

Материалы и методы. Основные метаболические пути бактериального разложения лекарственных средств и химический состав образующихся продуктов исследованы с использованием методов элементного анализа, спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C , ИК спектроскопии, гель –хроматографии, ВЭЖХ/МС; фитостимулирующие эффекты – с помощью методов гравиметрии, фотометрии, ТСХ и ВЭЖХ. Для сравнительного анализа интенсивности прироста биомассы лекарственных растений и прогноза накопления в них биологически активных веществ применено кинетическое моделирование.

Результаты. Продукты, полученные в результате биодеструкции парацетамола, представляют собой аморфный порошок черного цвета, состоящий из смеси веществ полимерной природы, содержащих в своей структуре аминфенольные, феноксазиновые, индольные и бензофурановые фрагменты (Коротаев М.Ю. и др., 2016б). Водорастворимые соединения, образующиеся из данных продуктов, проявляют фиторегулирующее действие, обусловленное их антиоксидантными свойствами и влиянием на функциональную активность пероксидазы (Коротаев М.Ю. и др., 2017). Показано стимулирующее действие продуктов биодеструкции парацетамола на лекарственные и сельскохозяйственные растения (календулу лекарственную, мяту перечную, крапиву двудомную, подорожник большой и ланцетный, лен обыкновенный и др.). Фитостимулирующие эффекты проявляются в виде увеличения биомассы и количественного содержания биологически активных веществ в растениях. Прирост данных показателей значительно выше при обработке растений продуктами биодеструкции парацетамола по сравнению с результатами после обработки растений известным стимулятором роста «Циркон» (рис. 1). Продукты бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты представляют собой водорастворимые соединения и проявляют фитостимулирующее действие в отношении лекарственных растений (зверобоя продырявленного в частности), обусловленное присутствием в их составе фумаровой кислоты (Хренков А.Н. и др., 2005). Разработаны лабораторные регламенты на получение продуктов биодеструкции парацетамола и ацетилсалициловой кислоты с использованием актинобактерий рода *Rhodococcus*.

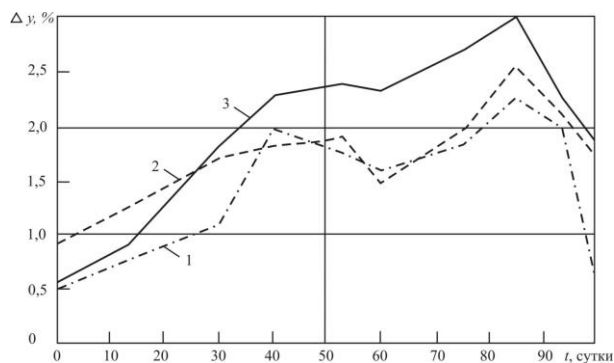


Рис. 1. Динамика изменения содержания флавоноидов в цветках календулы лекарственной (Δu , %) в зависимости от времени сбора: 1 – контроль; 2 – растения обработаны стимулятором роста «Циркон»; 3 – растения обработаны продуктами биодеструкции парацетамола

Заключение. Продукты бактериальной деструкции парацетамола и ацетилсалициловой кислоты, полученные из фармацевтических отходов биотехнологическим способом, являются перспективными фитостимуляторами и индукторами накопления биологически активных веществ в лекарственных и сельскохозяйственных растениях.

Исследование выполнено в рамках госзадания АААА-А19-119112290008-4, а также при финансовой поддержке Правительства Пермского края.

Литература

1. Коротаев М.Ю., Вихарева Е.В., Рудакова И.П., Рычкова М.И. / Исследование токсичности и класса опасности продуктов биодеструкции парацетамола для окружающей природной среды // Человек и лекарство: сб. материалов XXIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» – М.: ЗАО РИЦ «Человек и лекарство». 2016а. С. 241.

2. Коротаев М.Ю., Полякова Е.Б., Вихарева Е.В., Рычкова М.И. / Химическая структура осадка, образующегося в процессе биотрансформации парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77. *Биофармацевтический журнал*. 2016;8(1):13–19.
3. Коротаев М.Ю., Вихарева Е.В., Белоногова В.Д., Ившина И. Б. Фиторегулирующее действие продуктов бактериальной деструкции парацетамола. *Вестник Пермского университета. Серия Биология*. 2017;1:60–69.
4. Хренков А.Н., Вихарева Е.В., Карпенко Ю.Н., Рычкова М.И., Селянинов А.А. Фиторегулирующее действие продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты. *Биофармацевтический журнал*. 2021;13(2):23 – 27.
5. aus der Beek T., Weber F.-A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Hein A., Küsterz A. Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2016;35(4):823–835.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БИОСТИМУЛЯТОРОВ НА АГРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ

CALENDULA OFFICINALIS L.

А.Л. Ковалева^{1*}, Н.С. Зиннер^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

²Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

e-mail:iophosse@gmail.com

Ключевые слова: биостимуляторы, экстракты *Abies sibirica* Ledeb, лекарственное растениеводство, *Calendula officinalis*

Введение. В виду сравнительно недавнего начала промышленного культивирования, лекарственные растения, в большинстве своем, сохраняют относительно низкую энергию прорастания и всхожесть: всходы не дружные, редкие, семена не высокого качества. Специфика применения лекарственного сырья подразумевает поиск экологических способов, как защиты растений, так и стимуляции роста и прорастания семян. Применение химических средств защиты по отношению к лекарственным растениям вызывает много опасений. Большой интерес в установлении резистентности растений к неблагоприятным факторам внешней среды представляет стимулирование природных защитных механизмов растений с помощью природных регуляторов. Хвойные породы, в том числе *Abies sibirica* (пихта сибирская), известны как большой резервуар биологически активных веществ, в частности терпеноидов (Chappel J., 1995; Keeling C.I., Bohlmann J., 2007). На данный момент пути применения биостимуляторов отмечаются перспективными, и их изучение продолжается (Jardin P., 2015).

Цель. Целью данного исследования было изучение влияния биостимуляторов природного происхождения, в частности экстрактов *Abies sibirica*, на некоторые агробиологические характеристики *Calendula officinalis*.

Материалы и методы. При изучении семян определяли лабораторную всхожесть семян и энергию прорастания. Использовали общепринятые методики (ГОСТ Р 51096-97). Эти характеристики определялись путем проращивания 100 шт. семян в четырехкратной повторности. Для предварительной обработки семян использовали экстракты: Клеточный сок пихты, Агро-САС (*Abies sibirica*) в концентрациях 0,1; 0,5%, которые приготавливались путем разбавления концентрата с водой. При проращивании семян в качестве ложа использовалась фильтровальная бумага в два слоя, увлажненная деминерализированной водой. В первый раз энергию прорастания производили через 3 дня, далее – учет всхожести семян, убирая все нормально и не нормально проросшие семена. Определение грунтовой всхожести и энергии прорастания проводили на светло-серых лесных автоморфных почвах. Всего было расположено 5 вариантов, на каждом из которых 4 повторности по 100 штук семян. Высев в открытый грунт был выполнен сплошным рядовым способом, систематическим методом с шириной междурядий в 15 см, глубина заделки составляла от 1 до 1.5 см. Вегетационные опыты в полевых условиях проводили по общепринятым методикам (Доспехов Б.А., 1979). Семенную продуктивность особей определяли на 20–25 особях по общепринятым методикам (Вайнагий И.В., 1974; Николаева М.Г., 1999). Морфологические исследования велись за двадцатью модельными растениями. Морфометрический анализ проводили на взрослых особях, предварительно промаркированных, в фазу максимального развития растений. Определяли длину надземной части, число простых листьев, размер листьев (длину вдоль листовой жилки и ширину в самом широком месте листа) длину корня.

Результаты. В ходе определения влияния предпосевного замачивания семян календулы лекарственной в растворе препарата Агро-САС в концентрации 0,5%, установлено ингибирующее действие исследуемого препарата на всхожесть и энергию прорастания, снизив энергию прорастания в почти в 3 раза, а всхожесть в 2 раза. Для дальнейшего исследования были взяты другие концентрации: 0,1% и добавлен Клеточный сок пихты (рис. 1).

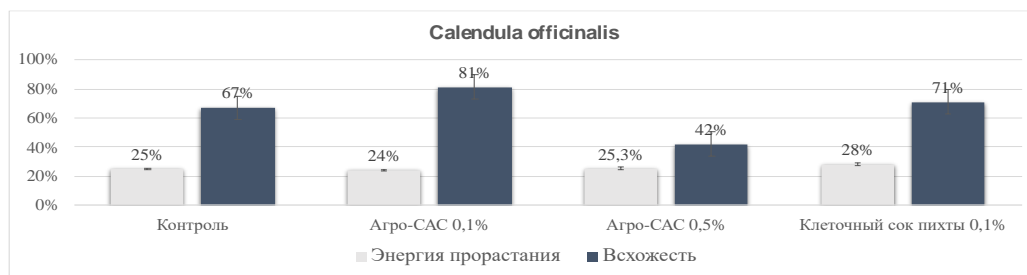


Рис. 1. Влияние препарата Агро-САС 0,1% и клеточного сока пихты сибирской 0,1% на всхожесть и энергию прорастания семян *Calendula officinalis* (в %)

В ходе эксперимента было установлено, что препарат Агро-САС в концентрации 0,1% эффективен для календулы лекарственной – всхожесть возросла с 67 до 81,3%. Клеточный сок пихты сибирской также повысил всхожесть календулы лекарственной, но менее эффективно – всхожесть возросла с 67 до 71%. При определении морфологических показателей *Calendula officinalis* отмечена положительная динамика влияния препарата Агро-САС в концентрации 0,5%: длина проростка календулы, семена которого были обработаны этим препаратом, в среднем превышала контроль на 11 см (табл. 1).

Таблица 1. Морфологические показатели *Calendula officinalis*

Вариант опыта	Длина проростка, см (надземная часть)	Число простых листьев, шт	Размер листьев		Длина корня, см
			Длина, см	Ширина, см	
Агро-САС 0,1 %	29,6±3,0*	7,2±2,0	7,1±0,2	1,2±0,1	12,0±3,3
Агро-САС 0,5 %	38,2±4,2*	8,6±3,2*	10,1±1,1	1,2±0,1	14,4±2,0*
Клеточный сок 0,1 %	20,0±3,0	6,0±1,2	5,2±0,2*	1,2±0,1	11,0±2,3
Клеточный сок 0,5 %	25,2±2,0	7,0±1,0	6,0±0,2	1,2±0,1	12,0±1,4
Контроль	27,4±1,4*	6,0±2,0	6,0±0,4	1,0±0,2	11,1±2,4

Примечание* - различия статистически значимы при $p \leq 0,05$

Так же замечено увеличение таких параметров, как число простых листьев (2,6 шт.), размер листьев (длина – 4 см) и длина корня (3,3 см), следовательно, кроме всего прочего, препарат положительно влияет на накопление зеленой массы растения. Анализ данных по семенной продуктивности включал определение процента выполненных семян на побег, ПСП (общее количество семян на побег), РСП (количество выполненных семян на побег) (рис. 2).

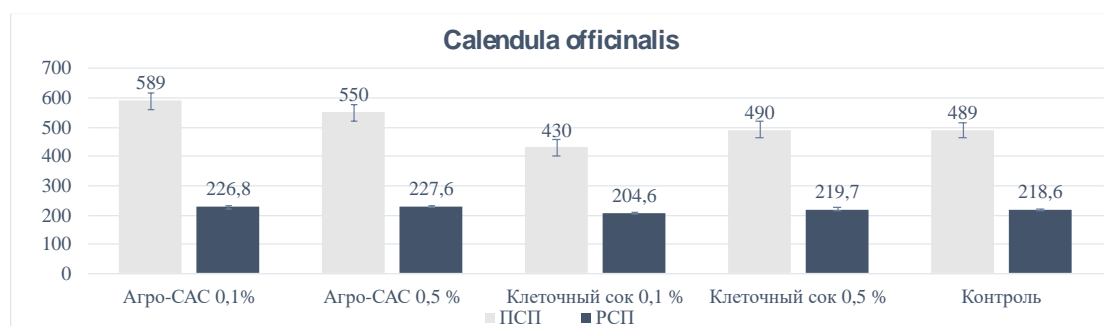


Рис. 2. Семенная продуктивность календулы лекарственной

Из полученных данных можно сделать вывод, что препарат Агро-САС в концентрации 0,1 и 0,5% стимулирует потенциальную семенную продуктивность у *Calendula officinalis*, сравнении с контролем. Так, ПСП во варианте с Агро-САС 0,1% превышает контроль на 100 шт. семечек, а во варианте с Агро-САС 0,5% - на 61 семечку.

Заключение. Исследуемые препараты продемонстрировали эффективность в стимуляции роста надземной части растений (листьев), в увеличении семенной продуктивности растений, а также в стимуляции прорастания семян и могут быть рассмотрены как эффективные естественные биостимуляторы растений для сельскохозяйственной практики, не оказывающих негативного влияния на окружающую среду.

Литература

1. Вайнагий И.В. О методике изучения семенной продуктивности растений. *Ботанический журнал*. 1974;59(6):826-831.
2. ГОСТ Р 51096-97. Семена лекарственных и ароматических культур. Сортовые и посевные качества. М., 1997. 27 с.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта: (С основами статистической обработки исследований). – М.: Колос, 1979. 416 с.
4. Николаева М.Г. Биология семян / М.Г. Никоваева, И. В. Лязгунова, Л. М. Поздова. Спб.: Изд-во НИИ химии СПбГУ, 1999. 232 с.
5. Chappell J. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol*. 1995;107:1–6.
6. Du Jardin P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
7. Gershenzon J., Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol*. 2007;3:408–414. DOI: 10.1038/nchembio.2007.5
8. Keeling C.I., Bohlmann J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol*. 2006;170:657–675. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01716.x>

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ

HEDYSARUM ALPINUM

Д.Г. Курашев^{1*}, Н.С. Зиннер², А.Л. Ковалева¹

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия
e-mail:danil_kurashev@mail.ru

Ключевые слова: биостимуляторы, Агро-САС, ГБК, лекарственное растениеводство, *Hedysarum alpinum* L.

Введение. В последние годы значительно возросло количество исследований, посвященных изучению биостимуляторов - инновационных препаратов, предназначенных для применения в растениеводстве с целью увеличения продуктивности культурных растений (роста и развития) и улучшения качества урожая. Биостимуляторы могут проявлять фунгицидные свойства, а также активировать защитные реакции у растений, что обуславливает снижение распространенности и степени развития болезней. Биохимические аспекты применения биостимуляторов связаны с изменением гормонального статуса и метаболических процессов у растений (Яхин И.А. и др., 2003). Испытывались следующие биостимуляторы: Агро-САС 0,1% и Гиббереллиновая кислота (ГБК) 0,5%. Агро-САС - бальзамическая паста с клеточным соком пихты. Содержит хвойные тритерпеновые смоляные и жирные кислоты, фенольные соединения, принимающие участие в дыхании растений. Представляет собой природный регулятор роста растений, повышающий устойчивость культур к болезням и неблагоприятным условиям окружающей среды. ГБК является мощным гормоном роста растений природного происхождения. Гиббереллины влияют на морфогенез растений, концентрируются в быстро растущих органах: созревающих семенах и плодах, гипокотиле, проростках, семядольных и разворачивающихся настоящих листьях (Полевой В.В., 1982).

Цель. Целью работы являлась оценка эффективности биостимуляторов при проращивании в условиях лаборатории, с одновременной оценкой их влияния на активность митотических делений *Hedysarum alpinum* L.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований выбран *Hedysarum alpinum* L. (копеечник альпийский), семена которого были обработаны препаратами Агро-САС и ГБК путем замачивания: в концентрациях 0,5 и 0,1%, контроль обрабатывался водой. Экспозиция для стимулятора АГРО-САС была 2 часа, замачивание в ГБК проводили в течение 12 часов, затем семена тщательно промывали проточной водой. Для определения энергии прорастания и всхожести семян согласно методике (ГОСТ Р 51096-97), отбирали 3 пробы по 100 семян, проращивание проводилось в чашках Петри между слоями увлажненной фильтровальной бумаги. На 3 сутки подсчитывали число проросших семян (энергия прорастания в % от числа заложенных для опыта), на 7 сутки в этой же пробе подсчитывали вновь проросшие семена, суммировали их с проросшими на 3 сутки и в (%) определяли всхожесть. Для изучения митотической активности корневых меристем, проводили по методике Н.И. Дегтяревой (1979) на проростках в возрасте 3-х – 6-х и 9-ти суток. Для этой цели использовали давленные препараты кончика корня (Цицин Н.В., 1980). Проростки фиксировались раствором Кларка (этиловый спирт 96° – 3 части, ледяная уксусная кислота – 1 часть) на 1 сутки. Затем материал дважды промывался в 70% спирте. Перед экспериментом проростки протравливали в квасцах (4% железоаммонийные) до 20 мин. В качестве красителя использовался ацетоорсеин, в который помещались корешки и нагревались 2–3 раза до кипения. Объекты рассматривали

под микроскопом Carl Zeiss Primo Star при большом увеличении, определяли число клеток, находящихся в митозе и общее число клеток в поле зрения. Митотический индекс выражали в промилле (‰) отношением среднего числа митозов к среднему числу клеток в одном срезе, умноженном на 1000. В каждом варианте использовали по 10 корешков, просмотр вели в пяти полях зрения, в среднем по 100 клеток. Учитывали все стадии митотического деления. **Результаты.** В результате исследования лабораторной всхожести в контроле, энергия прорастания и лабораторная всхожесть семян копеечника альпийского составили 92%. Применение препаратов ГБК и Агро-САС показало различную чувствительность семян на обработку. Показатели энергии прорастания и лабораторной всхожести с использованием ГБК – 94%, а для Агро-САС – 90%. В обоих случаях разница оказалась в 2 % (табл. 1). Полученные данные всхожести, не представляют собой существенно различающиеся данные, однако отмечено стимулирующее влияние на энергию прорастания семян.

Таблица 1. Лабораторная всхожесть семян копеечника альпийского

Вариант	Энергия прорастания на 3 день, %	Лабораторная всхожесть, %
Контроль	32	92
Агро-САС 0,5%	38	90
ГБК 0,1%	66	94

В исследованиях, проведенных на копеечнике при применении Агро-САС и ГБК получено повышение посевных качеств семян данных культур. В ГБК энергия прорастания и лабораторная всхожесть достоверно возрастали по сравнению с контролем. В Агро-САС всхожесть оказалась незначительно ниже, чем в контроле, но энергия прорастания все же выше на 6%. Обработка семян лекарственных культур в низких концентрациях приводит к увеличению энергии прорастания и всхожести семян. В варианте с контролем энергия прорастания были ниже биостимуляторов. Энергия прорастания семян копеечника в вариантах с ГБК по абсолютным значениям превосходили характеристики контроля на 34%, и выше чем у Агро-САС на 28%. Оценку клеточных делений рассматривали по среднему значению митотического индекса (МИ) через 48-72 часа (табл. 2). Апикальная меристема корня считается неоднородной массой клеток, которые отличаются друг от друга объемами и длительностью клеточного деления. Вследствие этого важно было установить синхронность клеточных делений, которую определяли по наращиванию предельного МИ относительно средних значений.

Таблица 2. Расчеты Митотического индекса, ‰

Вариант	Среднее число митозов	Среднее число клеток	Митотический индекс
Агро-САС 0,5% 3 день	72	380	189,47
Контроль 3 день	50	275	193,80
ГБК 0,1% 3 день	45	248	205,13
Агро-САС 0,5% 6 день	48	234	181,82
Контроль 6 день	59	287	191,84
ГБК 0,1% 6 день	54	266	205,57
Агро-САС 0,5% 9 день	50	258	181,45
Контроль 9 день	47	245	136,00
ГБК 0,1% 9 день	34	250	203,01

Были выявлены различия среднего значения МИ контрольного и опытных вариантов, поэтому оценка синхронности проводилась путем сравнения относительного увеличения митотического индекса в каждом варианте опыта с контролем. Конечные результаты позволили выявить степень синхронизированности митозов и дать характеристику различиям в степени воздействия контроля и биостимуляторов роста по данной культуре. Исследование активности клеток апикальной меристемы корней копеечника выявило, то, что среднее количество клеточных делений в контрольных образцах составляла 174,88 ‰ (таблица 3). Самые низкие результаты были выявлены на 9 дней.

Таблица 3. Митотическая активность клеток апикальной меристемы корней копеечника альпийского, ‰

Вариант	Время прорастания			Среднее значение
	3 день	6 день	9 день	
Агро-САС	181,82‰	189,47‰	181,45‰	184,25‰
ГБК	205,57‰	205,13‰	203,01‰	204,57‰
Контроль	191,84‰	193,8‰	139‰	174,88‰

При действии регуляторов роста общая динамика процесса оставалась прежней, но абсолютные значения МИ были выше у ГБК и более стабильны у Агро-САС на протяжении всего времени измерений. Использование ГБК спровоцировало подъем интенсивности клеточных делений в среднем на 30% в отличие от контроля. Агро-САС спровоцировал незначительные изменения митотической динамики: количество клеточных делений повысилось приблизительно на 10%.

Заключение. Установлено, что использование биостимуляторов роста оказывает положительное влияние на ранние ростовые процессы проростков копеечника альпийского. Изменяется скорость клеточных делений корневых меристем, что приводит к быстрому росту зародышевых корней. Митозостимулирующее действие, в большей степени показано с использованием ГБК, в меньшей степени с АГРО-САС на энергию прорастания семян. Проведенные подсчеты индекса митотического деления согласуются с полученными данными энергии прорастания семян, самые высокие показатели митотического индекса отмечены для стимулятора ГБК. Обнаружено однозначное стимулирующее действие используемых веществ, при отсутствии различий в показателях всхожести семян.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0721-2020-0019).

Литература

1. ГОСТ Р 51096-97. Семена лекарственных и ароматических культур. Сортовые и посевные качества. М., 1997. 27 с.
2. Дегтярева Н.И. Практикум по генетике / Н.И. Дегтярева. – М., 1979.
3. Полевой В.В. Фитогормоны / В.В. Полевой. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. - 249 с.
4. Цицин Н.В. Методические указания по семеноведению интродуцентов / отв. ред. академик Н.В. Цицин. – М.: Наука, 1980. – 64 с.
5. Яхин И.А., Яхин О.И., Лубянов А.А. Разработка и механизмы действия препаративных форм антистрессовых биорегуляторов на основе биологически активных веществ растительного происхождения / Сб. тр. V Съезда Общества физиологов растений России. – Пенза, 2003. – 364 с.

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ШАЛФЕЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО (*SALVIA OFFICINALIS L.*) И ЕЁ ХАРАКТЕРИСТИКА

Н.С. Пивоварова*, Т.С. Шебитченко

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»

Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: nadezhda.kuzmina@pharminnotech.com

Ключевые слова: стерилизация эксплантов, ростовая активность, каллус, питательная среда.

Введение. Выращивание биомассы растительных клеток как метод получения сырья существует довольно долгое время. Растительные клетки, культивируемые *in vitro*, выступают в роли источника ценных вторичных метаболитов таких как фенолы, алкалоиды, фитостероиды, гликозиды и др. Основное направление исследований в этой области заключается в подборе оптимальных составов питательных сред и условий культивирования. Поэтому очень важно создать такие условия, при которых в штаммах будет наблюдаться накопление ценных биологически активных веществ (БАВ). Прежде чем использовать биомассу в качестве лекарственного сырья, необходимо получить по возможности более полную характеристику роста штамма. Это даст возможность правильно оценить и прогнозировать рациональные сроки и условия для выращивания культуры клеток. Культивирование предполагает использование сложных многокомпонентных питательных сред, содержащих определенный набор макро-, микроэлементов, витаминов, стимуляторов роста. Однако не существует универсальных протоколов для получения штаммов – суперпродуцентов (Каухова И.Е., 2019). Для каждого вида растений необходимо искать индивидуальный подход, с учётом состава питательных сред, параметров культивирования и т.д. Шалфей лекарственный обладает широким спектром фармакологического действия. Антисептическое, противовоспалительное, болеутоляющее и другие свойства давно применяются как в народной, так и в научной медицине. В связи с ограниченным ареалом произрастания шалфея лекарственного, а также с ухудшением экологической обстановки в регионах произрастания использование фитобиотехнологического метода получения сырья является актуальным (Вовк Д.А., 2020).

Цель. Получение и характеристика жизнеспособного каллусного штамма шалфея лекарственного (*Salvia officinalis L.*).

Материалы и методы. В качестве эксплантов использованы листья интактного растения, культивируемого в питомнике СПХФУ (пос. Лемболово, Ленинградская область). Сбор растительного материала производился с соблюдением принципов биологической этики. Предварительная стерилизация эксплантов проводилась гипохлоритом натрия 6%-ным (20 минут) и спиртом этиловым 70%. В условиях ламинарного бокса листовую пластинку отсекали скальпелем и помещали на питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (MS) с половинным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами 2,4 – Д (6 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Культивирование осуществлялось в темноте, температура 27-28°C, влажность

60 – 70% (Каухова И.Е., 2019). Микроскопия клеток проводилась с помощью микроскопа Bresser LCD (50х-2000х) с применением техники «давленный» препарат и использованием витальных красителей: Эванс синий и нейтральный красный (Вовк Д.А., 2020). Высокоэффективная тонкослойная хроматография выполнена на приборе "САМАГ". с использованием системы растворителей БУВ (бутанол, уксусная кислота, вода) в соотношении 4:1:5. Элюирование продолжалось до тех пор, пока фронт растворителя не достигал 85 мм от линии старта. Изображение получали с помощью САМАГ TLC Visualize 2 в видимом свете и двух длинах волн 254 и 366 нм. Полученные хроматограммы обрабатывали в графическом редакторе для нанесения размерной градуировки. Затем, полученные пятна соотносили с нанесенной градуировкой и находили фактор удерживания Rf (Хохлова Е.А., 2016).

Результаты. После двух недель культивирования на поверхности эксплантов наблюдалось образование первичного каллуса. Визуально он представлял собой тонкий слой интенсивно делящихся недифференцированных клеток светло-жёлтого цвета. Далее первичный каллус перенесён на свежую питательную среду по прописи MS с полным содержанием микро - и макросолей и фитогормонами: НУК (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). В течение культивирования нарастала биомасса полученного каллуса, он становился более рыхлыми приобретал более темный оттенок, также начинала темнеть питательная среда (Вовк Д.А., 2020). После первого пассажа при пересадке часть биомассы взята для микроскопического анализа. Обнаруженные клетки можно разделить на два типа. Первый тип – клетки меристематического типа, которые имеют относительно небольшие размеры, крупные ядра, их вакуолизация слабо выражена. Второй тип - клетки паренхимного типа, которые имеют более крупные размеры и овальную, вытянутую форму. Микроскопия показала, что более 95% всех визуализированных клеток живые. В следующих пассажах существенных изменений морфотипа культуры отмечено не было. В одиннадцатом пассаже проведено исследование ростовой активности штамма. Известно, что каллусные клетки в процессе роста проходят ряд фаз развития: лаг-фазу, экспоненциальную, стационарную, фазу гибели или деградации (Загоскина Н.В., 2009). При этом наблюдается физиологическая асинхронность клеточной популяции. При помощи таких показателей, как индекс роста, удельная скорость и время удвоения биомассы можно охарактеризовать рост каллусных культур (табл. 1).

Таблица 1. Аналитические параметры роста каллусной культуры шалфея лекарственного одиннадцатый пассаж (приведены среднearифметические значения результатов трех определений, имеющих отклонение не более 5%)

Фаза роста	Сутки роста	Удельная скорость роста (сут ⁻¹)	Время удвоения биомассы (сут.)	Индекс роста
латентная	2	0,09	7,62	0,18
ускорения роста	4	0,21	3,28	0,85
	7	0,20	3,44	1,41
экспоненциального роста	11	0,28	2,47	3,09
	14	0,42	1,66	5,85
	18	0,42	1,66	7,53
замедленного роста	22	0,35	1,99	7,67
стационарная	27	0,29	2,43	7,71
	30	0,26	2,69	7,73

Анализируя полученные результаты стоит отметить, что максимальная удельная скорость роста 0,42 сут⁻¹ наблюдается на 14-18 сутки роста, при этом показатель время удвоения биомассы наименьший и соответствует значению 1,66 суток. За один цикл культивирования количество биомассы увеличивается в 7,73 раза. В дальнейшем оценка характерных показателей позволит оптимизировать состав при модификации питательной среды. Из высушенной биомассы клеток и листьев шалфея лекарственного получены водно-спиртовые вытяжки (70% этанол), необходимые для проведения качественного анализа методом ВЭТСХ. Анализ выполнен на кафедре фармакогнозии СПбФУ. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 1.

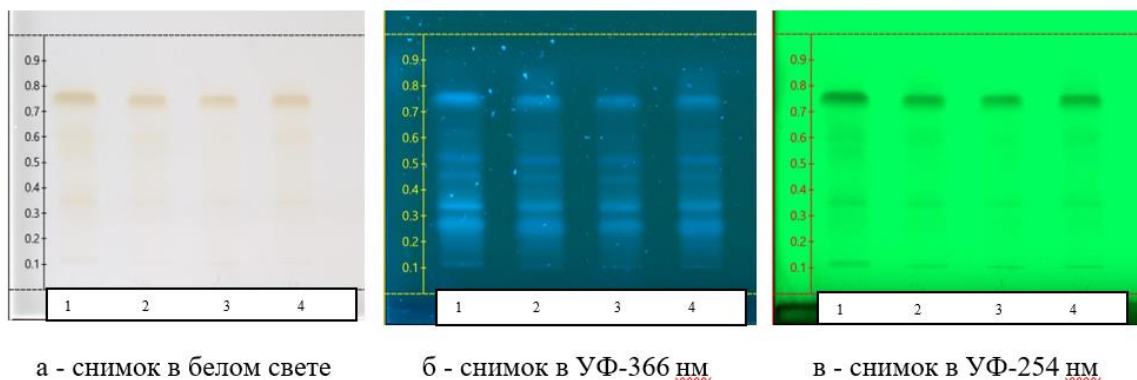


Рис. 1. Хроматограммы водно-спиртовых вытяжек листьев (1, 2) и биомассы (3, 4) шалфея лекарственного

На хроматограммах были обнаружены вещества с факторами удерживания $R_f = 0,73; 0,6; 0,57; 0,52, 0,45; 0,4; 0,35; 0,27; 0,19$. По данным литературных источников, эти соединения относятся к флавоноидам, фенолкислотам, танидам, аминокислотам, и соответствуют гидроксикоричной кислоте и гиперозиду, рутину, кверцетину, а также галловой и феруловой кислоте. Таким образом, результаты показывают, что качественный состав биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений. Исследования по установлению структуры выявленных соединений, является перспективным направлением для дальнейшего изучения.

Заключение. Благодаря проведённому исследованию получен жизнеспособный стабильный штамм растительных клеток шалфея лекарственного. Анализ результатов показывает, что для получения первичного каллуса необходимы следующие условия: среда по прописи MS с половинным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами 2,4 – Д (6 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Для следующих пассажей рекомендовано использование питательной среды по прописи MS с полным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами НУК (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Культивирование в темноте, температура 27-28°C, влажность 60–70%. Микроскопия показала, что основную массу полученного гетерогенного каллуса составляют клетки меристематического и паренхимного типа. Качественный состав БАВ биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений.

Литература

1. Вовк Д.А. Получение каллусной культуры шалфея лекарственного и изучение её ростовой активности. *Молодая фармация - потенциал будущего: сб. статей 2020*. 487 – 490. Загоскина Н.В. Биотехнология: теория и практика. М: Издательство Оникс, 2009. с.79-85. Каухова И.Е. Лекарственные средства растительного происхождения. Технология, составы, стандартизация: монография / коллектив авторов; под общ. ред. И.Е. Кауховой, В.А. Вайнштейна. – Москва: КНОРУС, 2019. 396 с.
2. Хохлова Е.А. Контроль качества растительных препаратов промышленного и аптечного производства с использованием системы ВЭТСХ. *Фармацевтическая отрасль*. 2016;6 (59):82–87.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПОЧЕК ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR L.*)

Н.А. Рябов^{1*}, В.М. Рыжов¹, В.А. Куркин¹, Л.В. Тарасенко¹, Т.М. Жавкина²

¹ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Самара, Россия

²Самарский государственный университет, г. Самара, Россия

e-mail:ryabov.nikolay.2014@mail.ru

Ключевые слова: Дуб черешчатый; *Quercus robur L.*; почки; люминесцентный анализ.

Введение. В статье приводятся результаты люминесцентного анализа анатомо-гистологического строения почек дуба черешчатого (*Quercus robur L.*). Почки *Quercus robur L.* являются перспективным источником фенольных соединений (флавоноидов, дубильных веществ, стероидов) (Рябов Н.А. 2018; Рябов Н.А., Куркин В.А., 2020). Для внедрения почек дуба в фармацевтическую практику необходима разработка нормативной документации, регламентирующей их качество. В настоящее время получение лекарственных препаратов на основе сырья растительного происхождения в современной медицине и фармации является значимой задачей. Одним из перспективных объектов является древесное растение семейства буковые (*Fagaceae*) дуб черешчатый (*Quercus robur L.*) (Никитина А.А., Панкова И.А., 1982; Губанов И.А., 2003). Данное растение обитает в зоне широколиственных и смешанных лесов Европейской части стран СНГ (Губанов И.А., 2003; Кароматов И.Д., Махмудова Г.Ф.К., 2016). Согласно данным фармакопей РФ, Европы, Британии, почки дуба черешчатого в России и за рубежом не являются ЛРС, используемым в медицине. Люминесцентный анализ позволяет выявлять индивидуальные и специфические особенности сырья, подтверждать наличие и

локализацию некоторых групп веществ, как внутри отдельного вида, так и внутри семейства и родовой группы изучаемых растений. Полученные данные позволят разработать раздел «Микроскопия» в проект ФС на ЛРС «Дуба черешчатого почки».

Цель. Проведение люминесцентного анализа почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.).

Материалы и методы. Материалом исследования являлись почки дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). При сборе сырья почек дуба срезались молодые побеги длиной до 10 см., заготовленные весной в марте 2020 года в г. Самара. Люминесценцию тканей почек исследовали на люминесцентном микроскопе марки «Альтами» ЛЮМ-2 (Россия) с использованием голубого и желтого светофильтров 32 мм. Спектральный диапазон возбуждения люминесценции: голубой светофильтр – 420-550 нм; желтый светофильтр – 330-400 нм. Предварительно нами были получены снимки люминесценции стандартных образцов (СО): Катехина, Рутина, Кверцетина, Галловой кислоты, Лютеолина (рисунок 1). на увеличениях в 100х и 400х. Для катехина наблюдается зеленое свечение при 420 нм и ярко голубое свечение при 360 нм. У рутина наблюдается зеленое свечение при 420 нм и ярко красное свечение при 360 нм. Характерным для рутина является особенность свечения: при 360 нм наблюдаются вкрапления голубого света, что говорит о наличие в СО вещества никотифлорина (3-О-рутинозид кемпферола). Для кверцетина характерно желтовато-оранжевое свечение при 420 нм и оранжево-красное свечение при 360 нм. У Лютеолина при 420 нм наблюдается ярко-зеленая люминесценция и желто-оранжевое свечение при 360 нм. Галловая кислота при 420 нм светится ярко-зеленым светом, при 360 нм ярко-голубым светом (рис. 1).

Результаты. Люминесцентному анализу подвергались апикальные (верхушечные) почки побегов дуба. Почки дуба черешчатого овальной формы, конусовидные на верхушке. В длину достигают 6 мм, в ширину – до 4 мм. Цвет почек – бурый или серовато-бурый. Почки дуба в слоении плотно-сомкнутые, на поперечном сечении округлой формы с незначительными ребрами. Визуально почки не опушены и не имеют смолистых выделений. Проведение люминесцентного анализа образцов почек позволило выявить ряд особенностей, имеющих диагностическое значение.

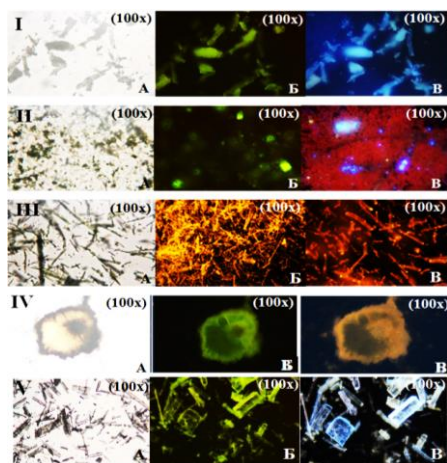


Рис. 1. Сравнительная люминесценция стандартных образцов. I – Катехин; II – Рутин; III – Кверцетин; IV – Лютеолин; V – Галловая кислота. Обозначения: А – без облучения УФ-светом; Б – Облучение УФ-светом при длине волны 420 нм; В – Облучение УФ-светом при длине волны 360 нм.

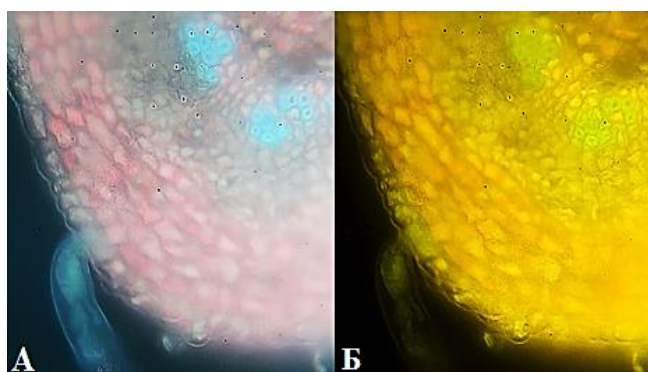


Рис. 2. Поперечные срезы базальной части почек дуба (100х).

Обозначения: А – При облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; Б – При облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

Люминесценция сердцевины почек, паренхимы ксилемы схожа и имеет буро-красный оттенок, вероятно, это связано с содержанием в протопласте клеток веществ фенольной природы (флавоноидов кверцетина, рутина) (рисунок 2). Анализ ксилемной части при увеличении в 100 х показал, что при 420 нм видно зеленоватое свечение, что также характерно для веществ катехина, галловой кислоты и лютеолина. При 360 нм также видна люминесценция, характерная для этих веществ (рис. 2). Флоэма почек представлена в виде групп из 8-12 клеток, люминесцирующих при 360 нм ярко-голубым светом (рис. 2). Во флоэмной части сконцентрированы вещества с ярко-красной люминесценцией, наблюдаемой при 420 нм в увеличении x100. Можно предположить, что данное свечение может возникать в виду наличия в тканях веществ флавоноидной природы, в частности, – рутина, что более вероятно, по причине расположения тканей ближе к поверхности среза. Флоэмная часть побега при 420 нм люминесцирует ярко-зеленым светом. Наблюдается сходство в свечениях катехина и галловой кислоты (рисунок 1-I,V; рисунок 2). Поверхностный слой, расположенный рядом с клетками, напоминающими феллоген, светится в виде полос красно-оранжевого цвета на протяжении всей поверхности среза. Люминесценция продольных срезов кроющих чашуй почек имеет схожее свечение: продольные срезы при 420 нм люминесцируют ярким желто-зеленым светом с часто встречающимися одиночными оранжевыми клетками; продольные срезы при

360 нм люминесцируют ярко-голубым светом, что говорит о наличии в анализируемых тканях клеток веществ фенольной природы (катехин, галловая кислота) (рис. 3). Паренхима оснований кроющих чашуй отличается и наблюдается люминесценция ярко-красного цвета при 420 нм (рис. 3).

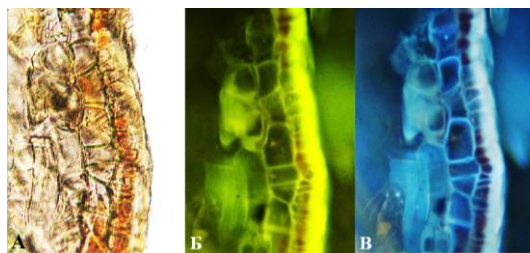


Рис. 3. Продольные срезы кроющих чашуй почек дуба (400х). Обозначения: А – Без облучения УФ-светом; Б – Облучение УФ-светом при длине волны 420 нм; В – Облучение УФ-светом при длине волны 360 нм.

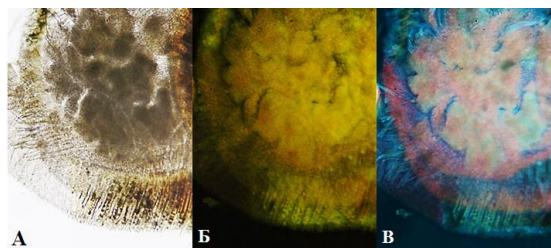


Рис. 4. Фрагменты соцветий поперечных срезов почек дуба (медиальная часть). Обозначения: А – Без облучения УФ-светом; Б – Облучение УФ-светом при длине волны 420 нм; В – Облучение УФ-светом при длине волны 360 нм.

При анализе фрагментов соцветий и расположенных по окружности зачатков цветков на поперечных срезах при 420 нм в увеличении $\times 100$ в медиальной части почек дуба наблюдается характерное свечение: вероятнее всего, что красным светом люминесцирует вещества фенольной природы: кверцетин, данное свечение однородно и наблюдается на протяжении всей поверхности среза (рис. 4). При 360 нм в увеличении $\times 100$ видно ярко выраженное свечение голубого цвета по периферии среза, что также характерно для веществ фенольной природы: галловой кислоты и катехина, и красно-оранжевого цвета в тканях фрагментов соцветий, что характерно для кверцетина и рутина (рис. 4).

Верхний эпидермис почек содержит кроющие волоски, стенки их клеток сильно утолщены. Эпидермальные клетки с поверхности кроющих чешуй вытянутые угловатые, клетки с внутренней (верхний эпидермис) стороны значительно длиннее, чем с нижней (наружной) стороны (рис. 5). При анализе люминесценции кроющих волосков, расположенных на поверхности почек при 420 нм в увеличении $\times 40$ наблюдается однородное свечение желто-зеленого цвета, при 360 нм – однородное свечение ярко-голубого цвета (рис. 5).

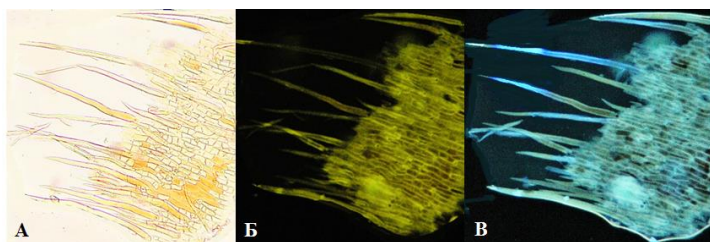


Рис. 5. Продольные срезы верхнего эпидермиса почек дуба (100х). Обозначения: А – Без облучения УФ-светом; Б – Облучение УФ-светом при длине волны 420 нм; В – Облучение УФ-светом при длине волны 360 нм.

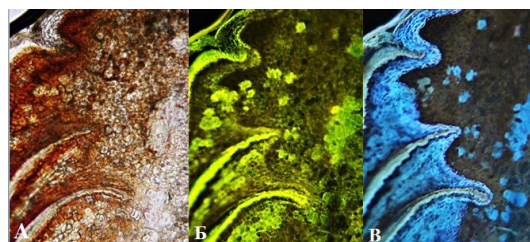


Рис. 6. Продольные срезы оснований кроющих чашуй почек дуба (100х). Обозначения: А – Без облучения УФ-светом; Б – Облучение УФ-светом при длине волны 420 нм; В – Облучение УФ-светом при длине волны 360 нм.

На продольном срезе почек дуба при увеличении $\times 100$ у основания кроющих чашуй на протяжении всего среза присутствует обкладка из нескольких слоев клеток, люминесцирующих ярко-желтым светом, и при 360 нм – ярко-голубым светом. Подобной люминесценцией обладают клетки паренхимы всего продольного среза, которые представлены в виде одиночных клеток, и клеток, сформированных в большие группы из 10-30 клеток (рис. 6).

Заключение. Таким образом, был проведен люминесцентный анализ почек дуба черешчатого, в результате которого были выявлены следующие особенности тканей: ярко-красная люминесценция паренхимы и киселемной части за счет содержащихся в протопласте и клеточной стенке фенольных соединений, вероятно, группы Флавонолов – рутина и кверцетина; свечение киселемной части почек на поперечных сечениях, а также лубяных волокон флоэмы обусловлена присутствием в клеточной стенке, помимо полимера лигнина простых фенольных соединений (галловая кислота); в основании кроющих чешуй присутствует клеточная обкладка, люминесцирующая ярко-голубым светом при 360 нм и желто-зеленым светом при 420 нм, что является характерным для свечения веществ катехина и галловой кислоты; соцветия почек люминесцируют красно-оранжевым светом при 360 нм. Полученные данные в дальнейшем позволят разработать раздел «Микроскопические признаки» проекта фармакопейной статьи на перспективный вид

лекарственного растительного сырья «Почки дуба черешчатого» и включения его, в дальнейшем, в Государственную Фармакопею Российской Федерации.

Г.

Литература

1. Губанов И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том – 2: Покрывосеменные (двудольные: раздельнолепестные). М.: Т-во научных изданий КМК, ин-т технологических исследований, 2003. 34 с.
2. Кароматов И.Д., Махмудова Г.Ф.К. Дуб обыкновенный - применение в лечебной практике. *Биология и интегративная медицина*. 2016;3:41-47.
3. Никитина А.А., Панкова И.А., Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений. 1982. 225 с.
4. Рябов Н.А. Изучение стеринных и тритерпеновых соединений коры дуба черешчатого / Н. А. Рябов // Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты: сборник материалов, Самара, 11 апреля 2018 года. – Самара: Общество с ограниченной ответственностью "Офорт", 2018. 342-343.
5. Рябов Н.А. Спектральное и хроматографическое исследование настоек из почек дуба черешчатого *Quercus robur* L / Н.А. Рябов, В.А. Куркин // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: Материалы 72-й научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Витебск, 12–13 мая 2020 года / Витебский государственный ордена "Дружбы народов" медицинский университет. Витебск: Витебский государственный медицинский университет, 2020. 794-796.
6. British Pharmacopoeia 2009. Vol. III. British Pharmacopoeia Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations // Oak Bark. 2009. 7203 p.
7. European Pharmacopoeia - 8th. «01/2008:1887 corrected 6.0». 2013. URL: <http://pharmeuropa.edqm.eu>.

СЫРЬЕВЫЕ ЗАПАСЫ ТРАВЫ ПОЛЫНИ ЗЕЛЕННОЙ (*ARTEMISIA VIRIDIS* WILLD.) В НЕКОТОРЫХ ОБЛАСТЯХ КЫРГЫЗСТАНА

Ч.Т. Табылдиева*, К.С. Чолпонбаев, Н.А. Рогова, К.Т. Шалпыков
Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева,
г. Бишкек, Республика Кыргызстан
e-mail: tabyldieva-cholpon@mail.ru

Ключевые слова: полынь зеленая, флавоноиды, сырье, запасы.

Введение. Ресурсоведение лекарственных растений – большой и достаточно важный раздел научно-практической деятельности различных специалистов. Ресурсоведческие исследования осуществляются во всем мире, но их направленность и характер определенным образом различаются в разных странах. Эти различия связаны с особенностями экономики страны, демографическими характеристиками, богатством растительных ресурсов, доступностью, освоенностью и величиной территории (Рогова Н.А., Яковлева Н.В., 2012). Одним из малоизученных растений, используемых в народной медицине, является полынь зеленая (мамыр). В надземной части полыни зеленой обнаружены: эфирное масло, фенолы, кетоны, флавоноиды, алкалоиды и кумарины (Айзенмана С. И др., 2014; Лазьков Г.А., Султанова Б.А., 2014; Негробов В.В., 2015). Сведений о глубоком изучении ее свойств в литературных источниках пока не найдено. На данный момент также нет данных о природных запасах полыни зеленой в Кыргызстане. В настоящее время нами проводятся исследования лекарственного сырья полыни зеленой и разработка лекарственного препарата на ее основе. В связи с этим определение запасов лекарственного сырья данного вида является актуальным.

Цель. В данный момент не имеется актуальных данных ни о запасах, ни об объемах заготовки полыни зеленой. Поэтому, изучение ее надземной и подземной массы, и разработка препаратов на ее основе является актуальной.

Материалы и методы. В июле 2019 г. нами проведено предварительное определение запасов лекарственного сырья (надземной массы) полыни зеленой в некоторых районах Чуйской (Суусамырская долина) и Нарынской (Ат Башинский район, Сонкульская котловина) областей Кыргызстана. За основу определения запасов сырья были положены методики ресурсных исследований М.К. Крыловой и А.И. Шретер (1986). Работы проводились в середине июля и начале августа 2019 г. в период цветения полыни зеленой. Результаты. В таблице 1 приводятся результаты определения запасов сырья полыни зеленой.

Таблица 1. Запасы воздушно-сухого сырья травы полыни зеленой на территории Чуйской и Нарынской областях

№ п/п	Местность	Общая площадь (га)	Продуктивность (кг/га)	Биологический запас (т)	Эксплуатационный запас (т)
1	Суусамырская долина	305	140	35,3	23,64
2	Ат-Башинский район	63	9	0,57	0,38
3	Сонкульская котловина	4200	24	100,8	65,5
	Итого:	4568	57,6	136,67	89,52

Заключение. Как видно из таблицы, наибольший биологический запас сырья полыни зеленой сосредоточен в Сонкульской котловине – 100,8 т. Это объясняется тем, что при небольшой урожайности полынь зеленая занимает площадь 4200 га. Наименьший биологический запас в Ат-Башинском районе – 0,57 т. Это, по-видимому, объясняется влиянием высокогорья и происходит из-за незначительного образования надземной массы (генеративных побегов) полыни зеленой. Наивысшая продуктивность полыни зеленой (до 140 кг/га) отмечена в Суусамырской долине в степных фитоценозах. В зависимости от природно-климатических условий, наличия выпаса скота и хозяйственной деятельности человека ежегодно может развиваться различное количество генеративных побегов и, следовательно, изменяться урожайность сырья полыни зеленой. Это может привести к изменению биологического и эксплуатационного запасов.

Литература

1. Рогова Н.А., Яковлева Н.В. Устойчивое использование лекарственных растений Кыргызстана: учебное пособие. Бишкек, 2012. 134 с.
2. Лазьков Г.А., Султанова Б.А. Кадастр флоры Кыргызстана. Сосудистые растения. Бишкек, 2014. 125 с.
3. Айзенмана С., Заурова Д., Шалпыкова К.Т., Струве Л. Лекарственные растения Средней Азии: Узбекистан и Кыргызстан. Бишкек, 2014. С. 78–79.
4. Флора Киргизской ССР. Том XI, Изд. «Илим», Фрунзе, 1965. С. 171–172.
5. Негроров В.В. Ресурсоведение лекарственных растений. Учебно-методическое пособие подготовлено на кафедре ботаники и микологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета. Воронеж, 2015. С. 57.
6. Крылова М.К., Шретер А.И. Методические указания по изучению запасов дикорастущих лекарственных растений. М.: ВИЛР, 1986

ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА ПОСЕВНЫЕ КАЧЕСТВА СЕМЯН RHODIOLA ROSEA L.

А.В. Щукина^{1*}, Н.С. Зиннер^{г.}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

^гФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия
e-mail: anastassyachshukina@mail.ru

Ключевые слова: лекарственные растения; биологические стимуляторы роста; всхожесть; посевные качества семян.

Введение. *Rhodiola rosea* L – многолетнее травянистое растение семейства толстянковых (Crassulaceae). Данная культура является ценным лекарственным растением, которая более 400 лет применяется в медицине. В корневищах *Rhodiola rosea* L содержится множество биологически активных компонентов: фенилпропаноиды – розавин, розарин, розин; фенольные соединения – салидрозид, тирозол; флавоноиды – родионин, родиолин, родиозин, ацетилродальгин; фенольные кислоты, монотерпены, танины, глюкозиды и фенольные масла. Исследования возможности введения в культуру ценного лекарственного растения в Сибири, очень актуальны в связи с тем, что *Rhodiola rosea* L относится к редким, исчезающим видам. В проведенном исследовании выбрана группа биологических регуляторов роста для оценки влияния на посевные качества семян *Rhodiola rosea* L. В настоящее время более предпочтительными регуляторами роста являются препараты, полученные из природных источников, которые разлагаются и нигде не накапливаются – растительные биостимуляторы.

Цель. Данное исследование проведено с целью изучения возможности повышения посевных качеств семенного материала *Rhodiola rosea* L. Опыты проводились как в лабораторных, так и в полевых условиях, согласно методикам полевого опыта Доспехова Б.А. (1978), в Сибирском ботаническом саду Томского государственного университета. Проведена оценка всхожести и энергии прорастания, определен митотический индекс (MI,%). Выявлено более выраженное влияние препарата Агро-САС по сравнению с клеточным соком на *Rhodiola rosea* L относительно контрольного варианта.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе Сибирского ботанического сада Томского государственного университета. Семенной материал *Rhodiola rosea* L, используемый в исследовании, взят с полупроизводственных плантаций Сибирского ботанического сада ТГУ. Объектами исследования являлись биологические стимуляторы роста: эталонный стимулятор – гиббереллиновая кислота (0,1%), а также углекислотные экстракты – клеточный сок и препарат Агро-САС. Бальзамическая паста с клеточным соком пихты «Агро-САС» получена методом органической и углекислотной экстракции хвойной лапки пихты сибирской. Является биологическим стимулятором роста растений, улучшающим иммунную систему растений. Клеточный сок пихты является субстанцией на основе водной фракции углекислотного экстракта пихты сибирской. Это биологический активатор роста укрепляющего и стимулирующего действия, контролирующей природные процессы в растениях, запускающий естественные защитные реакции. (Курганов А.К., Рошин В.И., 2009). При изучении всхожести и энергии прорастания мы использовали общепринятые методики согласно ГОСТ 12038-84. Замачивание семенного материала *Rhodiola rosea* L в гиббереллиновой кислоте (0,1%) производилось в течении 24 часов, с последующим промыванием семян в дистиллированной воде. Замачивание в углекислотных экстрактах производилось в течении 2 часов, с последующим промыванием семян в дистиллированной воде. Семенной материал из контрольного варианта замачивался в течении 2 часов в дистиллированной воде. Энергию прорастания и всхожесть фиксировалась на 3-й и 7-й день соответственно. Опыты, проведенные в лабораторных условиях, осуществлялись с использованием термостата. Показателем уровня митотической активности тканей является митотический индекс, который показывает отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу проанализированных клеток. Индекс свидетельствует о нормальном протекании митоза, об угнетении процесса деления клеток или об усилении митотической активности тканей. На основании этого делается заключение о митотоксическом или митозстимулирующем действии изучаемого фактора. Влияние препаратов было оценено с помощью индекса митотического деления (MI, %) по методике Н.И. Дягеревой (1979) на проростках 3 и 6 дней. В указанные дни проростки *Rhodiola rosea* L замачивали в растворе Кларка на 12 часов, затем их фиксировали в 70% этиловом спирте до востребования. Далее проростки промывали в дистиллированной воде, затем протравливали в 4% растворе железоммонийных квасцов в течении 10 минут, следом окрашивали ацетоорсеином и отчленили корневые меристемы под бинокуляром. Учет митотической активности производили на микроскопе Carl Zeiss Axio Lab A1.

Результаты. В целом, полевая всхожесть и энергия прорастания были закономерно ниже лабораторной, однако удалось установить достаточно высокое стимулирующее влияние препарата Агро-САС, в то время как влияние остальных стимуляторов не отличалось значительно от контроля (табл. 1.).

Таблица 1. Влияние углекислотных экстрактов на посевные качества семян

Культура	Агро-САС, всхожесть/энергия прорастания, %		Клеточный сок всхожесть/энергия прорастания, %		ГБК, 0,1% всхожесть/энергия прорастания, %		Контроль всхожесть/энергия прорастания, %	
	Л.У	П.У	Л.У	П.У	Л.У	П.У	Л.У	П.У
<i>Rhodiola rosea</i>	73/13	60/5	57/20	32/4	86/26	70/7	55/13	48/5

Примечание: Л.У - лабораторные условия; П.У. – условия полевого эксперимента; Энергия прорастания определялась на 6-й день после посева

Максимальная всхожесть (86 % в лабораторных условиях и 70% в полевых условиях) семян *Rhodiola rosea* L зафиксирована при обработке эталонным биостимулятором- гиббереллиновой кислотой. Препарат Агро-САС повысил посевные качества семенного материала на 18% в лабораторных условиях и на 12% в полевых условиях относительно контрольных вариантов опыта. Клеточный сок, как стимулятор показал себя недостаточно эффективным (57%) и сравним по результативности с контролем. Анализ результатов по исследованию влияния препаратов Агро-САС, клеточного сока и гиббереллиновой кислоты на показатели MI корней *Rhodiola rosea* L представлены в таблице 2.

Таблица 2. Митотическая активность клеток апикальной меристем корней *Rhodiola rosea*, (MI, %)

Вариант эксперимента	<i>Rhodiola rosea</i>	
	3 дня	6 дней
Агро-САС	6,4±0,03*	4, 1±0,12
Клеточный сок	6,2±0,06	5,2±0,08
ГБК,0,1%	7,0*±0,03	4,9±0,02
Контроль	5,1±0,13	4,7±0,05

* - $p < 0.01$ по отношению к контролю

В результате анализа предварительных данных по влиянию исследуемых препаратов на индекс митотического деления меристематических клеток апикальной меристемы корней *Rhodiola rosea*, было отмечено различное влияние углекислотных экстрактов на исследуемые показатели. Показатель МІ демонстрирует интенсивность деления по наличию клеток в фазе роста, чем выше значение этого показателя, тем интенсивнее идут ростовые процессы в меристематических тканях (таблица 2). Нами обнаружено достоверное отличие в показателе МІ для проростков, обработанных ГБК и препаратом Агро-САС по сравнению с контролем для всех исследуемых видов растений. Также отмечено снижение митотической активности к 6-ому дню прорастания семян. В целом, полученные данные по митотическому индексу согласуются с показателями лабораторной всхожести семян. Можно говорить о нормальном протекании процесса митоза (хромосомных aberrаций нами обнаружено не было), также не установлено митотоксического действия исследуемых препаратов (рис. 1).



Клетка *Rhodiola rosea* в метафазе клеточного цикла



Клетка *Rhodiola rosea* в анафазе клеточного цикла

Рис. 1. Клетки меристемы проросткового корешка *Rhodiola rosea*

Заключение. Результаты исследования показали, что препарат Агро-САС является более перспективным стимулятором роста для дальнейших исследований, по сравнению с клеточным соком. Всхожесть при использовании препарата Агро-САС увеличилась на 18% относительно контрольного варианта, в то время как всхожесть при использовании клеточного сока на 2% повысилась в лабораторных условиях и понизилась на 16 % в полевых условиях, по сравнению с контрольным вариантом. Гиббереллиновая кислота обладает наиболее ярковыраженным митозстимулирующим действием, однако препарат Агро-САС так же повысил МІ на 1,3%, в сравнении с контрольным вариантом.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0721-2020-0019).

Литература

1. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести (с Изменениями N 1, 2)/ М.: ИПК Издательство стандартов, 2004.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1978. 416с.
3. Дягерова Н.И. Лабораторный и полевой практикум по генетике. К.: Выща школа, 1979. 286с.
4. Зиннер Н.С., Некратова Н.А., Ковалева А.Л., Щукина А.В. Влияние биопрепаратов на прорастание семян *Scutellaria baicalensis* Georgi. Ботанические сады как центры изучения и сохранения фиторазнообразия: труды Международной научной конференции, посвященной 140-летию Сибирского ботанического сада Томского государственного университета, Томск, 28–30 сентября 2020 г. Томск, 2020. 78-80.
5. Курганов А.К., Рощин В.И. Углекислотный метод экстракции пихты сибирской. Материалы IV всероссийской научной конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». Барнаул: Издательство Алтайского государственного университета, 2009. Ч. 2. 306 с

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

Фундаментальные и прикладные аспекты исследований фармакодинамики и фармакокинетики новых лекарственных кандидатов

НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ И ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДИБОРНОЛА-ГЭК У КРЫС ПОСЛЕ ТОТАЛЬНОЙ ТРАНЗИТОРНОЙ ИШЕМИИ

А.М. Анищенко^{1,2*}, Г.А. Чернышева¹, В.И. Смольякова¹, О.И. Алиев¹, А.В. Сидехменова¹, М.Б. Плотников¹, А.В. Кучин³, И.Ю. Чукичева³

¹НИИФиРМ им.Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, РАН, г. Томск, Россия

²ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

³Институт химии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

e-mail: nuska-80@mail.ru

Ключевые слова: тотальная транзиторная ишемия головного мозга, неврологический дефицит, вязкость крови, агрегация и деформируемость эритроцитов.

Введение. Изменения реологических свойств крови могут быть вызваны такими патологическими состояниями, как нарушения мозгового (Tikhomirova I.A. et al., 2011) и коронарного (Leschke M., 2008) кровообращения, артериальная гипертензия (Тихомирова И.А., 2009). В свою очередь гемореологические расстройства, приводят к ухудшению кровоснабжения чувствительных к дефициту кислорода органов, могут значительно осложнить протекание этих заболеваний. Вещества из группы пространственно затрудненных фенолов обладают выраженными антирадикальными свойствами и способны проявлять нейро- и кардиопротекторную активность при недостаточности кровообращения (ишемия головного мозга, инфаркт миокарда) (Sidle J.P., Buser A., 2011). Вместе с тем, низкая водорастворимость пространственно затрудненных фенолов и в связи с этим отсутствие лекарственных форм для парентерального введения ограничивает их применение в острой стадии инсульта и коронарного синдрома. Данная проблема может быть решена путем синтеза гибридных макромолекулярных соединений на основе гидрофильных полимеров и пространственно затрудненных фенолов с высокой антиоксидантной активностью (Власов П.С. и др., 2012). Одним из таких соединений является *O*-(((4-гидрокси-3,5-ди(1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гепт-экс-2-ил)бензил)окси)этил)-*O*-(2-гидроксиэтил)-(1→4)- α -D-глюкан Д-ГЭК) – продукт химической модификации 2-гидроксиэтилированного крахмала (*O*-(2-гидроксиэтил)-(1→4)- α -D-глюкан) (ГЭК) с молекулярной массой 200 кДа фрагментами 2,6-диизоборнил-4-метилфенола (4-гидрокси-3,5-ди(1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гепт-экс-2-ил)бензил) (Д), при этом содержание ковалентно связанного фрагмента 2,6-диизоборнил-4-метилфенола в указанном продукте составляет от 4,9 до 6,7 мас.%.

Цель. Изучение нейропротекторной и гемореологической активности гидроксиэтилкрахмала, функционализированного фрагментами 2,6-диизоборнилфенола на модели тотальной транзиторной ишемии головного мозга (ТТИГМ).

Материалы и методы. Эксперименты были выполнены на 45 крысах-самцах сток Вистар массой 210–240 г, возраст – 8 недель, полученных из отдела биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Для исследования выживаемости, степени неврологического дефицита и реологической активности Д-ГЭК была использована модель ТТИГМ (Чернышева Г.А. и др., 2014). Животные были разделены на 3 группы. Первая группа – ложнооперированные животные: у крыс проводили оперативное вмешательство с доступом к магистральным сосудам головного мозга без перевязки сосудов. Вторая группа – контроль: у животных воспроизводили ТТИГМ. Третья группа – опытная группа: животным сразу после ТТИГМ и за 2 ч до окончания исследования вводили в хвостовую вену раствор Д-ГЭК в дозе 80 мг/кг в объеме 0,2 мл на 100 г массы животного. Контрольным животным по той же схеме вводили изотонический раствор натрия хлорида в объеме 0,2 мл на 100 г массы животного. Выживаемость животных и неврологический дефицит оценивали через 24 часа после моделирования ТТИГМ. Неврологический дефицит у животных определяли с использованием McGraw's Stroke-index (McGraw С.Р., 1977). В пробах крови определяли следующие реологические показатели: вязкость крови (при скоростях сдвига от 15 до 450 с⁻¹) – на ротационном вискозиметре Brookfield DV-II+Pro с системой конус/плита при температуре 36 °С, агрегацию и деформируемость эритроцитов – на Rheoscan-AnD 300. Анализ данных проводили с использованием программы «Statistica 8.0».

Результаты. В группе ложнооперированных животных выживаемость была 100%. В группе контроля к 24 ч после ТТИГМ выжило 50% крыс. Внутривенное введение Д-ГЭК приводило к достоверному увеличению числа выживших животных по сравнению с контрольной группой до 78%. В группе ложнооперированных животных к 1-м суткам после оперативного вмешательства неврологических нарушений выявлено не было. К концу 1-х суток после ТТИГМ выжившие крысы контрольной группы имели неврологические расстройства тяжелой степени (64%) и средней степени (36%). В группе животных, леченных Д-ГЭК, тяжелая, средняя и легкая степень неврологического дефицита выявлена у 20%, 50% и 10% выживших крыс соответственно; у 20% крыс неврологических расстройств не выявлено. В группе ложнооперированных животных значения вязкости крови в диапазоне скоростей сдвига 15–450 с⁻¹ составили 3,41±0,01–4,48±0,01 мПа·с (табл. 1).

Таблица 1. Влияние Д-ГЭК (80 мг/кг внутривенно двукратно) на вязкость крови (мПа·с) у крыс через 24 часа после ТТИГМ

Группы	Скорость сдвига, с ⁻¹					
	15	30	45	150	300	450
ЛО, n=6	4,84±0,04	4,52±0,05	4,30±0,05	3,75±0,05	3,54±0,04	3,41±0,05
ТТИГМ, n=5	5,23±0,15*	4,85±0,09*	4,61±0,08*	3,99±0,07*	3,74±0,07*	3,62±0,07*
Д-ГЭК, n=5	5,09±0,31	4,72±0,21	4,40±0,15	3,71±0,08 ⁺	3,44±0,06 ⁺	3,32±0,06 ⁺

Примечание. * – достоверные различия с группой ложнооперированных животных (p<0,05); ⁺ – достоверные различия с контрольной группой (p<0,05).

У ложнооперированных животных период полуагрегации эритроцитов, агрегационный индекс в стационарных условиях и величина критического напряжения сдвига в потоке составили 21,5±2,5; 22,6±1,3 и 118,3±4,6 соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Влияние Д-ГЭК (80 мг/кг внутривенно двукратно) на спонтанную агрегацию эритроцитов в покое (T_{1/2}, с; AI, %) и в потоке (Cs, мПа) у крыс через 24 часа после ТТИГМ

Группа	T _{1/2} , с	AI, %	Cs, мПа
ЛО, n=6	21,53±2,54	22,6±1,3	118,3±4,6
ТТИГМ, n=9	7,37±0,80*	37,3±2,3*	148,4±10,2*
Д-ГЭК, n=9	11,39±0,84* ⁺	30,1±1,2* ⁺	117,7±7,1 ⁺

Примечание. * – достоверные различия с группой ложнооперированных животных (p<0,05); ⁺ – достоверные различия с контрольной группой (p<0,05).

Моделирование у крыс ТТИГМ приводило к выраженному сдвигу гемореологических показателей. Отмечено достоверное усиление агрегационной активности эритроцитов в стационарных условиях, которое выражалось в снижении полупериода агрегации эритроцитов на 65% и увеличении агрегационного индекса на 39%, а также усиление агрегации эритроцитов в сдвиговом потоке, о чем свидетельствует повышение по сравнению величины критического напряжения сдвига на 27% (таблица 2). Изменение данных показателей вызывало закономерный рост вязкости крови во всем диапазоне скоростей сдвига на 6–8% по сравнению с показателями у ложнооперированных животных (таблица 1). Следовательно, моделирование ТТИГМ у крыс вызывало нарушения гемореологического статуса с формированием синдрома повышенной вязкости крови. Под влиянием Д-ГЭК наблюдалось достоверное по сравнению с контрольной группой увеличение полупериода агрегации эритроцитов на 55% и снижение агрегационного индекса на 19%, что свидетельствует о снижении спонтанной агрегации эритроцитов в отсутствии сдвиговых воздействий. В этой группе наблюдалось достоверное снижение величины критического напряжения сдвига в потоке по сравнению с контрольными животными на 21% (таблица 2). У животных в условиях модели ТТИГМ, получавших Д-ГЭК, вязкость крови в диапазоне скоростей сдвига 150, 300 и 450 с⁻¹ была достоверно ниже, чем в контроле на 7, 8, и 8% соответственно (таблица 1). **Заключение.** Таким образом, двукратное внутривенное введение Д-ГЭК в дозе 80 мг/кг крысам с ТТИГМ способно уменьшать проявления синдрома повышенной вязкости крови за счет снижения вязкости крови в диапазоне высоких скоростей сдвига и ограничения агрегационной активности эритроцитов, как в стационарных условиях, так и в сдвиговом потоке.

Литература

1. Власов П.С., Сергеева О.Ю., Домнина Н.С., Чукичева И.Ю., Буравлёв Е.В., Кучин А.В. Макромолекулярные антиоксиданты на основе полисахаридов и производных 2,6-диизоборнил-4-метилфенола. *Химия природных соединений*. 2012;4:481–484.
2. Тихомирова И.А. Оценка гемореологического статуса и состояния микроциркуляции здоровых лиц и пациентов с артериальной гипертензией *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2009;8(3):37–42.
3. Чернышева Г.А., Смольякова В.И., Осипенко А.Н. Плотников М.Б. Оценка выживаемости и неврологического дефицита крыс на новой модели тотальной транзиторной ишемии головного мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014;158(8):159–161.
4. Leschke M. Rheology and coronary heart disease. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2008;133(8):270–273. DOI:10.1055/s-0028-1100960.
5. McGraw C.P. Experimental cerebral infarction effects of pentobarbital in Mongolian gerbils. *Archives of neurology*. 1977;34(6):334–336. DOI:10.1001/archneur.1977.00500180028006.
6. Sigle J.P., Buser A. Hyperviscosity syndrome. *Blood*. 2011;117(5):1446–1448. DOI:10.1182/blood-2010-04-279869.
7. Tikhomirova I.A., Oslyakova A.O., Mikhailova S.G. Microcirculation and blood rheology in patients with cerebrovascular disorders. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2011;49:295–395. DOI:10.3233/CH-2011-1480.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ И ТЕРАТОГЕННОСТИ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*CICHORIUM INTYBUS* L.) ТРАВЫ ЭКСТРАКТА СУХОГО

А.Н. Бабенко*, Л.В. Крепкова, М.В. Боровкова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,
г. Москва, Россия

e-mail: alexandra.mogileva@gmail.com

Ключевые слова: цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) травы экстракт сухой, крысы, антенатальный период развития.

Введение. Цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) – многолетнее травянистое растение семейства Астровые (*Asteraceae*) является перспективным объектом для изучения и создания на его основе лекарственных препаратов. В научной литературе хорошо изучены и описаны химический состав и фармакологические свойства биологически активных веществ, полученных из корня культивируемого цикория. Экспериментально доказана их противовоспалительная, желчегонная, диуретическая, антибактериальная, гипогликемическая активность и безопасность. Экспериментальное изучение надземной части дикорастущего и культивируемого цикория обыкновенного с последующей разработкой новых лекарственных средств на их основе представляет большой научный и практический интерес (Janda K. et al., 2021). В ФГБНУ ВИЛАР был получен экстракт сухой из травы дикорастущего цикория обыкновенного, основными биологически активными веществами которого являлись гидроксикоричные кислоты: цикориевая, хлорогеновая, кафтаровая, изохлорогеновая А, кофейная; оксикумарины: эскулетин и цикориин; флавоноиды: изокверцетин, астрагалин и рутин. Стандартизацию сухого экстракта травы цикория обыкновенного (ЦОТЭС) проводили по содержанию фенольных соединений, в пересчете на цикориевую кислоту, количество которой в экстракте содержалось не менее 2%. В ВИЛАР совместно с Институтом общей и экспериментальной биологии СО РАН установлено иммуномодулирующее, антиоксидантное, гепатопротекторное, гипотриглицеридемическое действие экстракта (Сайбель О.Л., 2016; Сайбель О.Л., 2017).

Цель. Изучение влияния цикория обыкновенного травы экстракта сухого на потомство экспериментальных животных в ante- и постнатальном периодах развития для оценки возможности его применения во время беременности.

Материалы и методы. Изучение потенциальных эмбриотоксических и тератогенных свойств цикория обыкновенного травы экстракта сухого проведено на 84 половозрелых клинически здоровых крысах-самках *Wistar* с первоначальной массой тела 180-200 г., согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Животные были получены из питомника ФГБНУ ВИЛАР и содержались в контролируемых и стандартных условиях вивария. Эксперименты на животных проводили с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Strasbourg, 1986). План эксперимента был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией института. ЦОТЭС вводили в желудок крысам-самкам с 6-го по 19-й дни беременности в дозах 100, 500, 1000 мг/кг, минимальная из которых, в 10 раз превышала суточную терапевтическую. Контрольные животные получали воду в эквивалентных объемах. На протяжении всего периода беременности еженедельно учитывали прирост массы тела крыс. Оценка состояния потомства в конце антенатального периода проводили на 20-й день беременности. Определяли пред- и постимплантационную гибель,

проводили внешний осмотр плодов, измеряли их размер и массу тела, оценивали состояние их внутренних органов и костной системы. Состояние потомства в постнатальном периоде жизни исследовали с 1-го до 31-й дни жизни, учитывали прирост массы тела и выживаемость. Оценивали скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания в тестах: переворачивание на плоскости, «отрицательный геотаксис», «избегание обрыва» (на 7-8 дни жизни), «открытое поле» (30 день). Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики с применением t - критерия Стьюдента. Достоверность различий с контролем считали при $P < 0,05$. Статистические данные обрабатывали с помощью лицензионной программы Statistica version 13.

Результаты. Введение ЦОТЭС в испытанных дозах в желудок крысам-самкам с 6-го по 19-й дни беременности не нарушало прирост их массы тела, который к 20 дню у крыс, получавших экстракт, соответственно составил 32,3%, 35,9% и 36,2 %, по сравнению с 33,8 % в контроле (табл. 1).

Таблица 1. Динамика массы тела беременных крыс (в % к исходной)

Группа животных	Кол-во крыс в группе	Периоды наблюдения, недели		
		1	2	3
I. Контроль, вода	22	113,0±1,6	124,5±2,2	146,8±3,2
II. ЦОТЭС, 100 мг/кг	21	112,7±1,4	126,9±2,3	145,0±3,1
III. ЦОТЭС, 500 мг/кг	20	112,1±2,0	128,8±2,7	148,0±4,1
IV. ЦОТЭС, 1000 мг/кг	20	114,5±0,7	128,2±1,6	147,1±3,5

Внутрижелудочное введение ЦОТЭС беременным самкам во всех испытанных дозах не вызывало увеличения пред- и постимплантационной гибели эмбрионов и не влияло на массу тела и краниокаудальный размер 20-дневных плодов по сравнению с контролем (таблица 2).

Таблица 2. Результаты исследования эмбрионального материала после введения ЦОТЭС в желудок крысам с 6-го по 19-й дни беременности

Исследуемые показатели	Группы животных				
	I. Контроль, вода	II. ЦОТЭС 100 мг/кг	III. ЦОТЭС 500 мг/кг	IV. ЦОТЭС 1000 мг/кг	
Количество пометов	13	9	11	10	
Смертность, %	предимплантационная	6,1±5,0	6,5±5,4	7,1±5,2	7,0±4,6
	постимплантационная	3,6±1,2	3,7±1,7	4,2±2,0	3,7±1,8
Масса тела плодов, г	2,3±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,5±0,1	
Краниокаудальный размер плодов, мм	30,9±0,3	30,8±0,4	30,9±0,3	31,0±0,4	

При визуальном осмотре эмбрионов не выявлено внешних аномалий развития, что свидетельствует об отсутствии тератогенного действия у исследуемого экстракта. Анализ состояния внутренних органов 20-дневных плодов по методу Вильсона показал, что при введении ЦОТЭС в дозах 100, 500 и 1000 мг/кг отмечались однотипные аномалии (кровоизлияния в брюшную, в грудную полости, под кожу), процент проявления которых соответственно составил: 4,9%, 5,3%, 5,7% и находился на уровне спонтанного в контроле – 5,3%. Изучение костной системы эмбрионов по методу Доусона установило, что исследуемый экстракт во всех испытанных дозах не влиял на процесс оссификации скелета плодов. Общее количество плодов с нарушениями развития костной системы опытных групп (8,9%, 8,1%, 7,9% соответственно) не превышало контрольного показателя – 7,6%. При исследовании влияния ЦОТЭС на постнатальное развитие потомства было установлено, что в испытанных дозах он не изменял продолжительность беременности крыс и количество новорожденных крысят в помете. Выживаемость крысят во всех исследуемых группах в течение 21 дня наблюдения составила 100%. Динамика массы тела подопытных крысят в эти же сроки исследования также статистически значимо не отличалась от контрольных показателей. Введение ЦОТЭС крысам-самкам с 6 по 19 дни беременности в дозах 100, 500 и 1000 мг/кг вызывало задержку некоторых показателей физического развития полученного потомства, по сравнению с контролем. Открытие глаз у всех животных контрольной группы, у 65,7% крысят II-ой, 50% III-ей и 56,9% IV - ой групп наблюдали в среднем на 15-16 сутки, у остальных крысят опытных групп глаза открылись на 18-20 сутки постнатального периода развития. У этих же крысят на 3-ей неделе жизни наблюдали редкий шерстный покров, который в контрольной группе отмечали лишь у 4% потомства. К 6 неделе постнатального периода развития крысят II –IV групп полностью обрастали шерстью. Исследование формирования у потомства сенсорно-двигательных рефлексов показало, что у крысят, подвергавшихся в период внутриутробного развития действию ЦОТЭС в дозах в 50 и 100 раз превышающих суточную терапевтическую, наблюдали замедление времени выполнения рефлексов «отрицательный геотаксис» (500 мг/кг – 20,2±2,3* сек., 1000 мг/кг – 20,8±1,9* сек., и «избегание обрыва» (500 мг/кг – 10,5±1,5* сек., 1000 мг/кг – 15,2±2,1* сек.) по сравнению с контролем (13,1±1,1 сек. и 6,8±0,8 сек. соответственно) ($P < 0,05$).

Заключение. При введении исследуемого экстракта в испытанных дозах крысам-самкам во время беременности установлено отсутствие его влияния на динамику массы тела беременных крыс и внутриутробную гибель эмбрионов. ЦОТЭС не оказывал повреждающего действия на состояние внутренних органов и процесс окостенения хрящевых закладок костей 20-дневных плодов. ЦОТЭС при введении в течение беременности (с 6 по 19 дни) крысам-самкам в дозах 100, 500, 1000 мг/кг вызывал задержку физического развития у полученного потомства (открытие глаз, покрытие шерстью) в ранние сроки постнатального развития, а в 50- и 100-кратных терапевтических дозах (500 и 1000 мг/кг), удлинял время выполнения рефлексов «отрицательный геотаксис» и «избегание обрыва». К 31 дню наблюдения показатели эмоционально-двигательных реакций и способности к тонкой координации движений в тесте «открытое поле» у крысят всех опытных групп соответствовали контролю. Согласно результатам проведенного исследования, лекарственные препараты, созданные на основе цикория обыкновенного травы экстракта сухого, не следует назначать в период беременности.

Литература

1. Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Пупыкина К.А. Изучение фенольных соединений травы цикория обыкновенного (*Cichorium intubus* L.). *Башкирский химический журнал*. 2016; 23(1):53-58.
2. Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Пупыкина К.А., Петрова И.В., Фархутдинов Р.Р. Оценка антиоксидантной активности травы цикория обыкновенного (*Cichorium intubus* L.). *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2017;2(114):85-88.
3. Janda K., Gutowska I., Geszke-Moritz M., Jakubczyk K. The Common Cichory (*Cichorium intybus* L.) as a Source of Extracts with Health-Promoting Properties-A Review. *Molecules*. 2021;26(6):1814. DOI: 10.3390/molecules26061814.

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ СУБТИЛИЗИНОВ НА ВАЗОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ ВОРОТНОЙ ВЕНЫ КРЫСЫ

Г.И. Байкалов^{1,2*}, К.И. Ершов², Р.А. Князев², К.И. Бахарева¹, П.Г. Мадонов^{1,2}

¹ФГБНУ НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, Россия

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия

e-mail: gbaikalov@yandex.ru

Ключевые слова: иммобилизованные субтилизины, вазомоторная активность, воротная вена.

Введение. Фармакологическое воздействие иммобилизованных субтилизинов (ИмСубт) заключается в прямом гидролитическом растворении тромбов. На этом эффекте основана новая технология тромболитической терапии. Однако, исследований по возможному влиянию субтилизинов на гладкомышечную активность сосудов не проводилось. Наиболее удачным подходом для изучения возможного механизма влияния протеолитических ферментов на вазомоторную активность является использование изолированного сосуда в условиях отсутствия системных нервных и гуморальных регуляторных механизмов. В качестве объекта исследования была выбрана воротная вена крысы, поскольку, ее стенка содержит как фазные, так и тонические гладкие мышцы, которые формируют базальный тонус полого органа. Это позволяет рассматривать воротную вену в качестве адекватной модели всех кровеносных сосудов малого калибра с пейсмейкерной активностью, и кровеносных сосудов с выраженной ёмкостной функцией. Амплитуда сокращений, частота сокращений и тонус адекватно отображают вазомоторную активность. Эти параметры позволяют судить о функциональном состоянии гладкомышечного слоя стенки сосуда. Амплитуда, частота, тонус выбраны нами для характеристики действия ИмСубт на фазную и тоническую моторику изолированного сосуда (Omura K. et al., 2005; Chiwoogo W., Ojewole J., 2010; Vuksanovic V. et al., 2010; Reho J.J. et al., 2013; Иванов И.С. и др., 2013; Ерофеев Н.П. и др., 2016; Мадонов П.Г. и др., 2016). **Цель.** Изучить параметры вазомоторной активности при перфузии изолированного сосуда иммобилизованными субтилизинами в разных дозировках.

Материалы и методы. Исследование выполнено на изолированных сегментах воротной вены самцов белых крыс линии Вистар массой тела 200 ± 20 г. Под глубоким эфирным наркозом вскрывали брюшную полость животного и выделяли участок воротной вены. На выделенный участок вены накладывались две лигатуры на расстоянии 10 мм друг от друга, после чего, данный фрагмент вырезался и помещался в заполненную раствором Кребса - Хензелейта рабочую камеру объемом 30 мл. Изолированную вену на протяжении эксперимента омывали раствором Кребса-Хензелейта. Аэрация проводилась воздушной смесью (95% O₂ / 5% CO₂). После крепления фрагмент воротной вены выдерживали в растворе Кребса-Хензелейта в течение 30-40 минут до получения стабильных сокращений. Регистрация частоты сокращений (ЧС) и амплитуды сокращений (АС) проводилась в изометрических условиях при нагрузке от 300 до 500 мг с помощью аппаратного комплекса ВР BSLULT-W MP35, оснащённого программой «BSL PRO 3.7.3». Запись сократительной активности вены в течение всего эксперимента проводилась непрерывно. Установившийся по окончании 30-минутного стабилизационного периода паттерн фазных сокращений и тоническое напряжение принимали за исходный (фоновый) уровень. Значения исходного уровня активности принимались за 100%. Влияние ИмСубт на моторику воротной вены оценивали в

концентрациях 170 ЕД/мл, 340 ЕД/мл, 510 ЕД/мл и 1020 ЕД/мл. Анализ показателей моторной активности проводили в программе «ACQ Knowledge 3.8.2.» (Biopac Systems Inc.). Статистическая обработка: соответствие выборок нормальному распределению оценивали с помощью критериев Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка. Количественные значения вычислены в виде средней арифметической \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Сравнение с использованием t-критерия Стьюдента для связанных выборок. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. ИмСубт в концентрации 170 ЕД/мл в течение 30 минут увеличивали АС на 24%, при этом ЧС снизилась на 23%. ИмСубт в концентрации 340 ЕД/мл увеличивали АС на 35% и снижали ЧС на 19%. В дозе 510 ЕД/мл выявлено увеличение АС на 28% и снижение ЧС на 19%. ИмСубт в дозе 1020 ЕД/мл в течение 30 минут приводили к увеличению АС на 40%, а также к снижению ЧС на 18%. При перфузии ИмСубт во всех концентрациях наблюдалось снижение общего тонического напряжения изолированного сосуда на 9-13%.

Заключение. Проведённые исследования показали, что ИмСубт оказывают прямое сосудодвигательное воздействие. Очевидно, что ИмСубт обладают положительной пейсмекерной активностью. Установленная динамика АС и ЧС под влиянием ИмСубт позволяет предположить наличие в сосудистой стенке специфических к нему рецепторных структур.

Литература

1. Ерофеев Н.П., Захарова Л.Б., Кудрявцева Т.А., Парийская Е.Н., Петленко С.В. Инотропный эффект экстракта предстательной железы на сократительную активность гладкомышечных клеток воротной вены крысы. *Клиническая патофизиология*. 2016;(2):103–108.
2. Иванов И.С., Сидехменова А.В., Носарев А.В., Тюкавкина Н.А., Плотников М.Б. Влияние дигидрокверцетина на тонус изолированных вен крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013;155(1):71-72. DOI: 10.1007/s10517-013-2080-x.
3. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кихтенко Н.В. Химические и фармакологические свойства субтилизинов. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2016;36(3): 13–22.
4. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кихтенко Н.В. Таргетная фармакодинамика субтилизинов. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2016;36(4):15-23.
5. Мадонов П.Г., Момот А.П., Мамаев А.Н., Ройтман Е.В., Мишенина С.В. Неплазминовый фибринолиз субтилизинами. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2019;79(3):24–32. DOI: 10.25555/THR.2019.3.0886.
6. Шаманаев А.Ю., Сидехменова А.В., Новикова Е.А., Носарев А.В., Плотников М.Б. Влияние композиции дигидрокверцетина и арабиногалактана на сокращение гладкомышечных клеток воротной вены крысы. *Сибирский медицинский журнал*. 2014;29(3):102–104.
7. Chiwororo W., Ojewole J. Dual effect of quercetin on rat isolated portal vein smooth muscle contractility. *Cardiovascular Journal of Africa*. 2010;21(3):132–136.
8. Omura K., Hitosugi M., Zhu X., Ikeda M., Maeda H., Tokudome S. A newly derived protein from *Bacillus subtilis natto* with both antithrombotic and fibrinolytic effects. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2005;99(3):247-251. DOI: 10.1254/jphs.FP0050408.
9. Reho J.J., Zheng X., Fisher S.A. Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2013;306(2):163–172.
10. Vuksanovic V., Gal V., Platisa M., Gojkovic-Bukarica L. Spontaneous contractions of isolated rat portal vein under temperature perturbations. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 2010;48:887–894.

АНТИГИПЕРТЕНЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО СТИМУЛЯТОРА РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ

В.В. Быков^{1,2*}

¹Инновационные фармакологические разработки, г. Томск, Россия

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия
e-mail: vladimir.b.1989@gmail.com

Ключевые слова: производное индолинона; растворимая гуанилатциклаза; артериальная гипертензия.

Введение. Оксид азота (NO) играет одну из ключевых роль в регуляции артериального давления (Chibireva M.D. et al., 2017; Shimokawa H., Godo S., 2020; Zuchi C. et al., 2020). NO стимулирует содержащую гем растворимую гуанилатциклазу (pGC), которая катализирует продукцию циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в гладких мышцах сосудов. Этот циклический нуклеотид повышает депонирование ионов Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме (Pasmanter N. et al., 2020), препятствует образованию актомиозина (Qiao Y.N. et al., 2014; Bátori R. et al., 2017) и расширяет сосуды. Многие сердечно-сосудистые заболевания сопровождаются дисфункцией эндотелия со снижением выделения NO. Нитраты и другие доноры NO восполняют его дефицит, но к ним быстро формируется толерантность из-за уменьшения чувствительности pGC и ускорения инактивации цГМФ. Кроме того, при приеме доноров NO

накапливаются свободные радикалы NO, что активирует перекисное окисление липидов (Boerrigter G. et al., 2007; Chirkov Y.Y., Horowitz J.D., 2007). Представляет интерес создание антигипертензивного средства, способного стимулировать рГЦ независимо от NO. Такой активностью, согласно данным собственных исследований, обладает производное индолинона (шифр – GRS).

Цель. Изучить антигипертензивную активность производного индолинона GRS у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR.

Материалы и методы. Вещество GRS представляет собой (2-[2-[(5RS)-5-(гидроксиметил)-3-метил-1,3-оксазолидин-2-илиден]-2-цианоэтилиден]-1H-индол-3(2H)-он), синтезирован в ООО «Томская фармацевтическая фабрика» (Россия, Томск). Эксперименты проводили на 18 самцах спонтанно-гипертензивных (SHR) крыс и 6 самцах крыс стока Sprague Dawley и массой тела 300 ± 30 г возрастом 2.5–3 мес. (Пушино, Москва). Крыс содержали в виварии со свободным доступом к воде и пище. Перед введением исследуемых веществ животные не получали корм в течение 16 ч. Исследование одобрено локальным этическим комитетом, работа проведена в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите лабораторных животных (Страсбург, 1986). Соединение GRS вводили крысам в желудок однократно в виде суспензии в 0,5 % водном растворе карбоксиметилцеллюлозы. Крысы SHR получали это соединение в дозах 5 и 10 мг/кг (экспериментальные группы 1 и 2, по 6 животных в группе) или препарат сравнения, донор NO изосорбида динитрат (Фармапол-Волга, РФ) в дозе 5 мг/кг (группы животных 3, 6). Крысам стока Sprague Dawley GRS вводили в дозе 10 мг/кг (группы животных 4, 6). Артериальное давление (АД) измеряли плетизмографической системой неинвазивного измерения АД «Систола» (Нейроботикс Трейдинг, Россия) у бодрствующих крыс перед введением исследуемых веществ (с 8 до 12 ч) и через 1, 2, 4, 8 и 24 ч после их однократного введения. В течение 3 дней перед экспериментом крыс тренировали в устройстве с хвостовой манжетой для исключения влияния стресса на регистрируемые показатели. Статистическую обработку экспериментальных данных производили с помощью программы Statistica 8.0. Результаты представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Различия между выборками анализировали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Систолическое артериальное давление (САД) и диастолическое артериальное давление (ДАД) у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR до введения исследуемых веществ составляли $175,3 \pm 0,5$ и $144,1 \pm 0,5$ мм рт. ст. соответственно. GRS в дозах 5 и 10 мг/кг вызывал выраженное дозозависимое снижение САД и ДАД. Через 1 ч после введения GRS в дозе 5 мг/кг САД снижалось на 26 %, до $130,3 \pm 3,5$ мм рт. ст. ($p < 0,05$), через 2 ч становилось таким же, как у нормотензивных крыс Sprague Dawley ($114,0 \pm 1,8$ мм рт. ст.). ДАД через 1 ч после введения GRS в дозе 5 мг/кг уменьшалось на 36 %, до $92,8 \pm 2,7$ мм рт. ст. ($p < 0,05$), через 2 ч составляло $82,8 \pm 3,4$ мм рт. ст. Гипотензивный эффект соединения GRS в дозе 5 мг/кг сохранялся в течение 8 ч, затем САД и ДАД начинали расти и через 24 ч составляли $146,0 \pm 3,7$ и $106,0 \pm 4,2$ мм рт. ст. соответственно. После введения GRS в дозе 10 мг/кг САД и ДАД у крыс линии SHR уже через 1 ч статистически значимо снижались до $115,7 \pm 3,5$ и $83,5 \pm 2,0$ мм рт. ст. – величин, регистрируемых у нормотензивных крыс Sprague Dawley. Антигипертензивное действие GRS в дозе 10 мг/кг сохранялось на протяжении 24 ч. Донор NO изосорбида динитрат в дозе 5 мг/кг оказывал кратковременное антигипертензивное действие с максимумом эффекта через 1–4 ч (САД и ДАД составляли $112,7 \pm 1,1$ и $77,3 \pm 1,5$ мм рт. ст. соответственно), через 24 ч САД возвращалось к исходному значению $164,7 \pm 2,3$ мм рт. ст. ($p < 0,05$), ДАД оставалось сниженным на 10 % и составляло $129,3 \pm 2,7$ ($p < 0,05$). Производное индолинона GRS в дозе 10 мг/кг не влияло на АД у нормотензивных крыс линии Sprague Dawley.

Заключение. Производное индолинона GRS при введении в желудок оказывает выраженное дозозависимое антигипертензивное действие у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR. В дозе 10 мг/кг GRS вызывает наиболее выраженный антигипертензивный эффект, сопоставимый по силе и продолжительности с действием изосорбида динитрата. Под влиянием соединения GRS АД снижается постепенно, не создается риск артериальной гипотензии и рефлекторной тахикардии. GRS не обладает гипотензивным действием при нормальном артериальном давлении у нормотензивных крыс, что является показателем хорошего профиля безопасности. Единственное существующее на фармацевтическом рынке лекарственное средство с прямым стимулирующим влиянием на рГЦ риоцигуат применяется только для лечения легочной артериальной гипертензии (Khaybullina D. et al., 2014). Таким образом, GRS является перспективным антигипертензивным средством, не уступающим по силе действия донору NO изосорбида динитрату.

Литература

1. Bátori R., Bécsi B., Nagy D., Kónya Z., Hegedűs C., Bordán Z., Verin A., Lontay B., Erdődi F. Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production. *Sci. Rep.* 2017;7:44698. doi: 10.1038/srep44698.
2. Boerrigter G., Costello-Boerrigter L.C., Cataliotti A., Lapp H., Stasch J.P., Burnett Jr. J.C. Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase with BAY 58-2667 in experimental heart failure. *BMC Pharmacology.* 2007;7(1):9. doi:10.1186/1471-2210-7-S1-P9.

- Chibireva M.D., Aflyatumova G.N., Matveeva V.L., Bilalova D.F., Kuz'mina O.I., Sadykova D.I., Nigmatullina R.R. Nitrogen Oxide, Endothelin-1, and Serotonin in the Blood of Immature Spontaneously Hypertensive Rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017;162(3):310–312. doi: 10.1007/s10517-017-3602-8.
- Chirkov Y.Y., Horowitz J.D. Review Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: a new therapeutic frontier? *Pharmacol. Ther.* 2007;116(2):287-305. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.06.012.
- Khaybullina D., Patel A., Zerilli T. Riociguat (adempas): a novel agent for the treatment of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *P. T.* 2014;39(11):749-751, 755-758.
- Lahera V., Navarro-Cid J., Maeso R., Cachofeiro V. Participation of endothelium-derived vasoconstrictor factors in arterial hypertension. *Rev. Esp. Cardiol.* 1999;52(3):4-11.
- Pasmanter N., Iheanacho F., Hashmi M.F. Biochemistry, Cyclic GMP. *StatPearls.* 2020 Jan. [URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542234>] (дата обращения 01.12.2020).
- Qiao Y.N., He W.Q., Chen C.P., Zhang C.H., Zhao W., Wang P., Zhang L., Wu Y.Z., Yang Y.J., Gao J.M., Kamm K.E., Stull J.T., Zhu M.S. Myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1) regulates the contraction and relaxation of vascular smooth muscle and maintains blood pressure. *J. Biol. Chem.* 2014;289(32):22512–23. doi: 10.1074/jbc.M113.525444.
- Shimokawa H., Godo S. Nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization mediated by hydrogen peroxide in health and disease. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2020;127(2):92-101. doi: 10.1111/bcpt.13377.
- Zuchi C., Tritto I., Carluccio E., Mattei C., Gattadori G. Ambrosio G. Role of endothelial dysfunction in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2020;25(1):21-30. doi: 10.1007/s10741-019-09881-3.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ СЛОЖНОЭФИРНОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОМЕТАЦИНА ПРИ АДЬЮВАНТНОМ АРТРИТЕ

А.В. Быкова^{1*}, В.В. Быков^{1,2}

¹ООО «Инновационные Фармакологические Разработки», г. Томск, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия
e-mail: bykovaarina90@gmail.com

Ключевые слова: сложноэфирное производное индометацина, индометацин, адьювантный артрит, противовоспалительное действие, крысы.

Введение. Ревматоидный артрит — хроническое иммунное заболевание, сопровождается пролиферативным воспалением процессом и хронической болью в суставах. По данным Всемирной Организации Здравоохранения ревматоидный артрит диагностируют у 1.7 млрд людей (Cieza A. et al., 2021). Высокой противовоспалительной и анальгетической активностью при этом заболевании обладает неселективный ингибитор циклооксигеназы индометацин, но его применение сопряжено с тяжелыми побочными эффектами (ульцерогенное действие, повреждение печени, нарушение кроветворения) и неудобной фармакокинетики (Lucas S., 2016). Предпринимаются попытки создания на основе структуры индометацина новых малотоксичных препаратов с целью улучшения фармакокинетики, повышения эффективности и безопасности при длительном применении.

Цель. Изучить в эксперименте противовоспалительное действие нового сложноэфирного производного индометацина в сравнении с эффектами индометацина.

Материалы и методы. Сложноэфирное производное индометацина и ментола (индоментил) представляет собой [(1R,2S,5R)-5-метил-2-(пропан-2-ил)циклогексил]{2-[2-метил-5-метокси-1-(4-хлорбензил)-1H-индол-3-ил]ацетат}. Синтезирован в ООО «Томская Фармацевтическая Фабрика» (РФ, Томск). Эксперименты проводили на самках крыс линии Sprague Dawley массой 180–200 г. Животных содержали в пластиковых клетках (по 4 особи) при температуре 18–26°C, относительной влажности воздуха 45–65%, воздухообмене 10–11 об/ч и регулируемом световом режиме (12:12 ч). Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ и выполнено в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите лабораторных животных (Страсбург, 1986) и с соблюдением принципов и правил надлежащей лабораторной практики. Адьювантный артрит как модель ревматоидного артрита вызывали инъекцией под плантарный апоневроз задней конечности полного адьюванта Фрейнда (ПАФ), содержащего убитые микобактерии, суспензированные в вазелиновом масле (Миронов А.Н., 2013). Животным с 7 дня после введения адьюванта в течение 21 сут вводили в желудок индоментил в дозах 6.25, 12.5 и 25 мг/кг в виде раствора в льняном масле или препарат сравнения индометацин в дозе 1 мг/кг в изотоническом растворе натрия хлорида. Контрольные животные с адьювантным артритом получали льняное масло (контроль 1) или изотонический раствор натрия хлорида (контроль 2) в эквивалентном объеме. С помощью плетизмометра («UGO BASIL», Италия) оценивали объем воспаленной конечности до введения ПАФ и 2 раза в неделю на протяжении 21 сут после развития артрита. Разницу между объемом воспаленной конечности у крыс, получавших индоментил или препарат индометацина, и объемом в контрольных группах, выражали в процентах (Миронов А.Н., 2013). После окончания курсового введения индоментила и индометацина крыс умерщвляли в условиях постепенного заполнения камеры диоксидом углерода. Ткани

заплюсневого сустава, образованного соединением костей голени, костями заплюсны и проксимальным концом плюсневых костей, исследовали гистологически на депарафинированных срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Анализ проводили при помощи светооптического микроскопа Axio Scope A1 («Carl Zeiss», Германия) при увеличении $\times 50$. Степень поражения суставов оценивали по пятибалльной шкале (Мужикян А.А. и др., 2014). Для статистической обработки использовали пакет программ Statistica 8.0. Данные представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Достоверность различий ($p < 0,05$) между группами определяли с помощью t-критерий Стьюдента.

Результаты. Отек и гиперемия околосуставных тканей в конечности возникали в течение нескольких часов после введения ПАФ и становились наиболее выраженным к 7 сут. После трех введений индометилла в дозах 6.25, 12.5 и 25 мг/кг объем воспаленной конечности уменьшался на 30, 66 и 67 % соответственно по сравнению с объемом в контроле ($p < 0,05$), препарат индометацина в дозе 1 мг/кг уменьшал объем конечности на 63 % ($p < 0,05$) (рисунок 1). При семикратном введении индометилла в дозах 6.25, 12.5 и 25 мг/кг отек уменьшался на 60, 61 и 83 % соответственно ($p < 0,05$), при введении препарата индометацина — на 83 % ($p < 0,05$). В максимальной степени объем воспаленной конечности становился меньше после 14 введений веществ: индометилл в дозе 6.25 ослаблял отек на 73 %, в дозе 12.5 мг/кг — на 81 % ($p < 0,05$), в дозе 25 мг/кг полностью прекращал экссудативную реакцию в конечности, в которую вводили ПАФ; препарат индометацина в дозе 1 мг/кг уменьшал отек на 80 % ($p < 0,05$). После окончания курсового введения индометилла во всех дозах объем воспаленной конечности тормозился на 57, 83, 93 % соответственно, под влиянием препарата индометацина — на 73 % ($p < 0,05$).

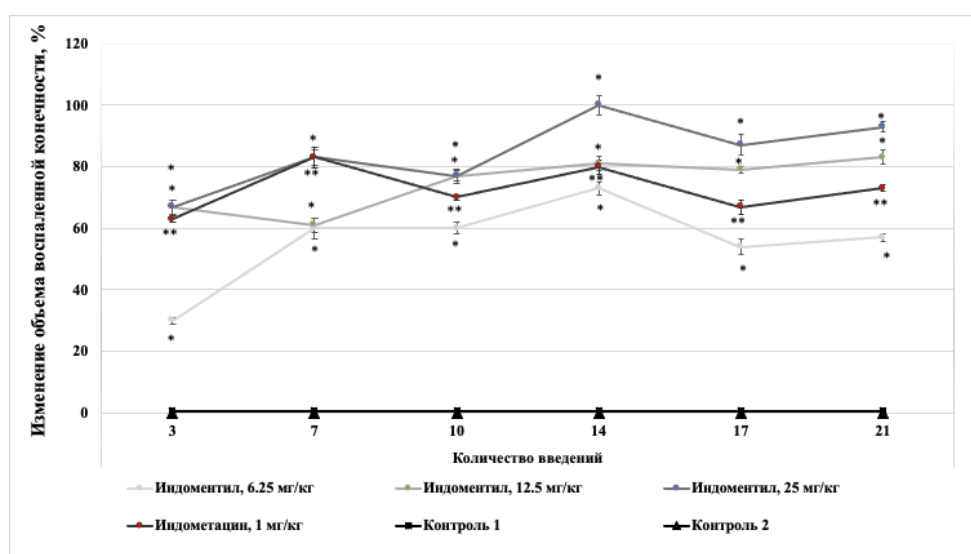


Рис. 1. Противовоспалительное действие индометилла (6.25, 12.5, 25 мг/кг) и препарата индометацина (1 мг/кг) при адьювантном артрите

Гистологическое исследование показало, что в конечности крыс, в которую вводили ПАФ, развивались пролиферативный синовит и воспаление околосуставной ткани (Саратиков А.С. и др., 1983). Синовиальная оболочка заплюсневого сустава была утолщена, отечна, синовиоциты пролиферировали, на синовиальной интимае появлялись луковичеобразные ворсины. Строма сустава была инфильтрирована лимфоцитами и плазматическими клетками. Суставная полость заполнялась жидкостью с лейкоцитами и десквамированными фрагментами синовиальной оболочки. У животных формировался внутрисуставной паннус, что сопровождалось дистрофией и некрозом хондроцитов. Индометилл после курсового введения в дозах 12.5 и 25 мг/кг нормализовал строение заплюсневого сустава и околосуставной ткани крыс с адьювантным артритом: препятствовал гиперплазии синовиальной оболочки, воспалительной инфильтрации стромы сустава, формированию паннуса и повреждению хондроцитов, уменьшал объем внутрисуставного выпота. При введении индометилла в дозе 6.25 мг/кг и индометацина в дозе 1 мг/кг сохранялись умеренная гиперплазия синовиоцитов и воспалительная инфильтрация околосуставной ткани. Индометилл в дозе 25 мг/кг оказывал при адьювантном артрите более значительное антиэкссудативное и антипролиферативное влияние, чем индометацин в дозе 1 мг/кг.

Заключение. При адьювантном артрите, как модели хронического пролиферативного воспаления, индометилл в дозе 25 мг/кг оказывает достоверный противовоспалительный эффект, нормализует строение заплюсневого сустава и околосуставных тканей и по противовоспалительному действию не уступает индометацину в дозе 1 мг/кг.

1. Литература

Всемирная Организация Здравоохранения: официальный сайт. 2021. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions>.

2. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2013. Ч. 1. 944 с.
3. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гушин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;2:103-109. Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Прищеп Т.П. Адьювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия): монография. Томск: Изд-во Том. ун-та; 1983. 101 с. Cieza A., Causey K., Kamenov K., Hanson S.W., Chatterji S., Vos T. Global estimates of the need for rehabilitation based on the Global Burden of Disease study 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2021;396(10267):2006-2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32340-0.
4. Lucas S. The Pharmacology of Indomethacin. *Headache*. 2016;56(2):436–446. DOI: 10.1111/head.12769.

ПОИСК СРЕДСТВ ОБЛАДАЮЩИХ АНТИГИПЕРТЕНЗИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ СРЕДИ СОЕДИНЕНИЙ ИНДОЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

О.И. Дунаева*, О.И. Алиев, М.Б. Плотников

¹НИИФУРМ им. Е.Д.Гольдберга Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

e-mail: olgadunaeva24@mail.ru

Ключевые слова: Артериальная гипертензия, блокаторы рецепторов ангиотензина II, лозартан, крысы Wistar-Kyoto

Введение. В настоящее время серьезной проблемой здравоохранения многих стран остаются сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). Артериальная гипертензия (АГ) является одним из наиболее распространенных ССЗ. Процент пациентов, страдающих стойким повышением кровяного давления в нашей стране составляет 30 – 45% (Шляхто Е.В., 2020). АГ является одной из основных причин поражений сердечно-сосудистой системы, головного мозга, почек, в связи с этим установлено приоритетное направление на борьбу с этим состоянием. Своевременное назначение подходящей антигипертензивной терапии является ключевым моментом в снижении риска развития ССЗ, а также смертности (Williams V. et al., 2018). Несмотря на большое количество препаратов с различными механизмами действия и существующие различные схемы антигипертензивной терапии, стойкий эффект достигается не во всех случаях (Морозов Т.Е. и др., 2016). Ренин-ангиотензиновая система является важным звеном в патогенезе АГ, и в частности ангиотензин II. Ангиотензиновые рецепторы подтипа АТ₁ включены в «перечень биомишеней для разработки схожих по фармакотерапевтическому действию и улучшенных аналогов инновационных лекарственных препаратов». Блокаторы рецепторов ангиотензина (БРА) обладают выраженным антигипертензивным эффектом, большой продолжительностью действия, низкой частотой встречаемости побочных эффектов (Котовская Ю.В., 2019). БРА подавляют многие биологические эффекты АТ II, такие как: сокращение гладкой мускулатуры сосудистой стенки, прессорные реакции, жажду, секрецию альдостерона, высвобождение вазопрессина, высвобождение катехоламинов надпочечниками, усиление норадренергической нейротрансмиссии, повышение симпатического тонуса, изменение функции почек, клеточную гиперплазию и гипертрофию. Преимуществами БРА являются длительное действие, с большим периодом полувыведения, высокий уровень безопасности, низкая частота встречаемости нежелательных эффектов, хорошую переносимость в комбинации с другими препаратами, что в совокупности обеспечивает высокую приверженность пациентов к лечению (Brenner V.M. et al., 2000; Matsuda H. et al, 2003). Таким образом, поиск новых соединений, блокирующих рецепторы подтипа АТ₁, представляет интерес в вопросе терапии АГ.

Цель. Поиск и изучение перспективных соединений индол-3-уксусной кислоты, являющихся блокаторами рецепторов подтипа АТ₁, для фармакотерапии артериальной гипертензии.

Материалы и методы. Эксперименты по изучению антигипертензивной активности исследуемых соединений выполнены на бодрствующих нормотензивных крысах-самцах линии Wistar (n=15) в возрасте 10–12 недель и массой тела 250–300 г. В работе использовали соединения индол-3-уксусной кислоты (Vol01; Vol02; Vol04; Vol06), отобранные в ходе скрининга *in silico* и обладающие активностью блокаторов рецептора АТ₁, а также препарат сравнения лозартан. Животные были разделены на 5 групп: 1-я группа (n=3) – однократное внутривенное введение соединения Vol01 в дозе 5 мг/кг; 2-я группа (n=3) – однократное внутривенное введение соединения Vol02 в дозе 5 мг/кг; 3-я группа (n=3) – однократное внутривенное введение соединения Vol04 в дозе 5 мг/кг; 4-я группа (n=3) – однократное внутривенное введение соединения Vol06 в дозе 5 мг/кг; 5-я группа (n=3) – препарат сравнения лозартан в дозе 20 мг/кг, однократное внутривенное введение. Исследование антигипертензивной активности оценивали по снижению уровня системного артериального давления, которое регистрировали неинвазивным методом на хвосте с помощью системы измерения артериального давления у мелких животных NIBP200A («Biorac Systems, Inc.», США). Данная система предназначена для измерения АД в реальном времени у бодрствующих животных. Запись и обработка данных производится на компьютере с помощью программы «AcqKnowledge 4.2 for MP150». Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft.

Результаты. Снижение систолического (САД) и диастолического (ДАД) артериального давления оценивалось в течение нескольких часов после введения исследуемого вещества, через 180 минут наблюдался наиболее выраженный антигипертензивный эффект. Соединение Vol01 проявляло высокую антигипертензивную активность, значения САД и ДАД достоверно отличались от значений крыс группы лозартана ($p < 0,05$) и были ниже на 12% и 7% соответственно. Активность соединения Vol04 была ниже, значения САД и ДАД превышали значения группы препарата сравнения на 12% и 17%. Однократное введение соединения Vol06 также выявило низкую антигипертензивную активность, значения САД и ДАД по сравнению с лозартаном составили на 6% и 17% больше. Наиболее выраженное снижение артериального давления выявлено при введении соединения Vol02, значения САД и ДАД достоверно отличались от значений группы лозартана ($p < 0,05$), и имели значения на 18% и 35% ниже. Соединение Vol02 проявило высокую антигипертензивную активность как по сравнению с группой лозартана, так и с исследуемыми соединениями и является наиболее перспективным в дальнейших исследованиях.

Заключение. Скрининг перспективных соединений индол-3-уксусной кислоты, являющихся блокаторами рецепторов подтипа AT_1 выявил два соединения – Vol01 и Vol02, с наиболее выраженным антигипертензивным эффектом, и наиболее перспективных для проведения дальнейших исследований, в том числе курсового введения на крысах линии SHR.

Литература

1. Котовская Ю.В. Антагонисты рецепторов ангиотензина II в лечении артериальной гипертонии. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2019;3(10(I)):34-39.
2. Морозова Т.Е., Сычев Д.А., Ших Н.В. Фармакогенетические подходы к прогнозированию эффективности и безопасности фармакотерапии артериальной гипертонии. *Лечащий врач*. 2016;3:77-81. Шляхто Е.В. Кардиология. Национальное руководство. Краткое издание / под ред. Е. В. Шляхто. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. - 816 с.
3. Brenner В.М. Cooper М.Е., de Zeeuw D. Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan (RENAAL). *JRAAS*. 2000;1:328—335.
4. Matsuda Н. Hayashi К. Homma К. Differing antiproteinuric action of candesartan and losartan in chronic renal disease. *Hypertens Res*. 2003;26(11):875–880.
5. Williams В., Mancia G., Spiering W., Rosei E.A., Azizi M., Burnier M., Clement D.L., Coca A., De Simone G., Dominiczak A. ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J. Hypertens*. 2018;36:1953–2041.

4,10-ДИ(ЭТОКСИАЦЕТИЛ)-2,6,8,12-ТЕТРААЦЕТИЛ-2,4,6,8,10,12-ГЕКСААЗАТЕТРАЦИКЛО [5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] ДОДЕКАН КАК НОВОЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО

Е.А. Киселева^{1*}, Л.А. Бахолдина²

¹Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ Российской академии наук (НИИФурМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ), г. Томск, Россия
²ФГБ УН Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (НИПХЭТ СО РАН), г. Бийск, Россия

e-mail: Elena_Kis@sibmail.com

Ключевые слова: фармакология, анальгетик, болевой синдром, этовюрцин.

Введение. В современном мире болевые синдромы занимают лидирующее место среди проблем, с которыми сталкивается каждый человек. Это приводит к ухудшению качества жизни и усугубляет физическое и эмоциональное состояние человека. Поэтому, в настоящее время одним из актуальных направлений фармацевтики является разработка новых высокоэффективных ненаркотических анальгетиков, имеющих минимальное количество противопоказаний и ограничений к назначению. Объектом данного исследования является новое соединение 4,10-ди(этоксиацетил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло [5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] додекан (этовюрцин), обладающее анальгетической активностью (Патент РФ №2736936, зарегистрир. 23.11.2020) (рис.). Исследования острой токсичности показали, что этовюрцин относится к 3 классу опасности «малотоксичные средства» ($LD_{50} > 2000$ мг/кг при отсутствии летальности) (Миронов А.Н., 2012).

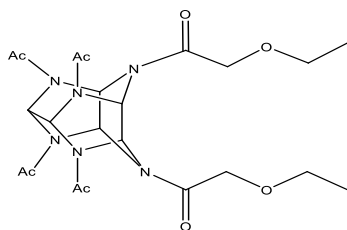


Рис. Структурная формула новой молекулы (этовюрцин)

Цель. Изучение анальгетической активности этовюрцина в сравнении с референс-препаратом трамадолом в тестах «Горячая пластина» и «Укусные корчи».

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 113 аутбредных половозрелых мышах-самцах сток CD1, первой категории, конвенциональных, полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. Тест «Горячая пластина» основан на поведенческих реакциях, контролируемых супраспинальными структурами, в ответ на термическое болевое воздействие (Rice A.S. et al., 2008; Barrot M., 2012; Миронов А.Н., 2012). Этовюрцин вводили в диапазоне доз 25, 50, 100 и 200 мг/кг в объеме водно-твинового растворителя 0,5 мл/ 20 г мышь однократно внутривентриально через зонд за 1 ч до посадки на горячую пластину (HOTPLATE ANALGESIA METER, Columbus Instruments, USA). Трамадол вводили в дозе 10 мг/кг в аналогичном объеме воды очищенной, пути введения и схеме эксперимента. Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое увеличение латентного периода реакции после введения исследуемого вещества, а также рассчитывали эффективность тестируемых веществ по показателю МВЭ % (максимально возможный эффект). $\% \text{ МВЭ} = \frac{\text{ЛП}_0 - \text{ЛП}_k}{(30 - \text{ЛП}_k)} \times 100$, где ЛП₀ – латентный период ноцицептивной реакции в опытной группе; ЛП_к – латентный период ноцицептивной реакции в контрольной группе; 30 с – максимальное время экспозиции для мышей (Миронов А.Н., 2012). Тест «Укусные корчи» направлен на исследование острой висцеральной и соматически глубокой боли (Rice A.S. et al., 2008; Barrot M., 2012; Миронов А.Н., 2012). Этовюрцин вводили в диапазоне доз 25, 50, 100 и 200 мг/кг в объеме водно-твинового растворителя 0,5 мл/мышь ежедневно внутривентриально через зонд в течение 3 суток, в последний день введение осуществляли за 1 ч до инъекции 0,75% раствора уксусной кислоты в объеме 0,1 мл/10 г массы тела мыши. Трамадол вводили в дозе 10 мг/кг в аналогичном объеме воды очищенной, пути введения и схеме эксперимента. Анальгезирующий эффект оценивали по способности потенциального лекарственного средства (в течение 20 мин после инъекции) уменьшать (в %) количество «корчей» по сравнению с контрольной группой животных (критерий эффективности – снижение болевой реакции не менее чем на 50%) и латентному времени наступления болевой реакции. Эвтаназию животных по окончании экспериментов осуществляли кранио-цервикальной дислокацией. Межгрупповые различия оценены с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и углового преобразования Фишера (φ). При $p < 0,05$ различия считали достоверными.

Результаты. В тесте «Горячая пластина» максимально выраженный анальгетический эффект (75%) трамадола фиксировали через 2 ч после однократного введения *per os*. В результате введения этовюрцина в дозах 50 и 100 мг/кг выявлено статистически достоверное снижение времени развития болевой реакции через 1 ч и 2 ч наблюдения относительно аналогичных показателей контроля и группы трамадола. Опиоидный анальгетик уступал этовюрцину как в отношении значения латентного времени развития болевой реакции (50 мг/кг, $p < 0,05$; 100 мг/кг, $p < 0,05$), так и % мышей с 30 с экспозицией (60% и 60% против 20%, $p < 0,05$ в обоих случаях) в первый срок наблюдения. Выявлено, что % МВЭ при использовании доз 50 и 100 мг/кг составил 55% и 56,3% (1 ч), 76% и 65% (2 ч) соответственно, что оказалось сопоставимым с активностью трамадола (75 %, 2 ч) (табл. 1).

Таблица 1. Анальгетический эффект этовюрцина в динамике через 1 и 2 ч наблюдения после однократного применения в диапазоне доз 25-200 мг/кг *per os* в сравнении с трамадолом (10 мг/кг *per os*) в тесте «Горячая пластина» на аутбредных мышах–самцах CD1

Группа доза (мг/кг) количество животных	Латентное время развития болевой реакции через 1 ч, (X±m), с	Макс. возможный эффект через 1 ч, %	% мышей с 30 с экспозицией через 1 ч	Латентное время развития болевой реакции через 2 ч, (X±m), с	Макс. возможный эффект через 2 ч, %	% мышей с 30 с экспозицией через 2 ч
1. Контроль, (n=13)	22,0±1,9	0	30,8	20,0±2,4	0	30,8
2. Этовюрцин, 25 (n=10)	26,9±1,3	61,3	40	26,1±2,3*	61	70 #1-2
3. Этовюрцин, 50 (n=10)	26,4±1,6*	55	60	27,6±1,8* 1-3P<0,01	76	50
4. Этовюрцин, 100 (n=10)	26,5±1,6*	56,3	60	26,5±1,7*	65	60
5. Этовюрцин, 200 (n=10)	23,4±1,9	17,5	20 #3-5, #4-5	26,1±1,9*	61	60
6. Трамадол, 10 (n=10)	22,0±1,9***+	0	20 #3-6, #4-6	27,5±1,3*	75	70 #1-6

Примечание. после * - $p_u < 0,05$ по сравнению с контролем, ** - $p_u < 0,05$ по сравнению с группой «Этовюрцин 50», + - $p_u < 0,05$ по сравнению с группой «Этовюрцин 50» (U-критерий Манна-Уитни); после # - $p_\phi < 0,05$ указаны номера сравниваемых групп (ϕ - критерий Фишера).

Латентное время развития болевой реакции при использовании доз 25 и 200 мг/кг оказалось статистически значимым и сравнимым с аналогичным показателем трамадола во второй час наблюдения. Следует отметить, что при этом МВЭ составил 61% в обеих группах (против 70% трамадола), а % мышей с 30 с экспозицией оказался сравним с этим показателем опиоидного анальгетика (70%, $p < 0,05$ и 60% против 70%, $p < 0,05$ соответственно). В тесте «уксусные корчи» применение этовюрцина в дозе 25 мг/кг способствовало снижению выраженности болевой реакции (44,7%) в результате уменьшения количества уксусных «корчей» в 1,8 раза ($p < 0,05$) относительно аналогичного показателя контроля (таблица 2). В случае введения этовюрцина в дозе 50 мг/кг отмечалось его максимально выраженное обезболивающее действие (86,6%) и самое продолжительное время развития болевой реакции (622 ± 143 с) относительно соответствующих показателей всех экспериментальных групп. Дальнейшее увеличение дозы потенциального анальгетика приводило к постепенному снижению эффекта. Если в результате введения этовюрцина в дозе 100 мг/кг обезболивающее действие уменьшилось и составило 48,4% ($p < 0,05$), то повышение дозы до 200 мг/кг способствовало снижению эффективности до 37,3%. Необходимо отметить, что у животных, получавших новое вещество, выявлено отсутствие «корчей» у 25% (50 мг/кг) и 12,5% (200 мг/кг) мышей в отличие от группы применения трамадола.

Таблица 2. Показатели анальгетической активности этовюрцина (25-200 мг/кг *per os*) в сравнении с трамадалом (10 мг/кг *per os*) на модели «Уксусные корчи» у аутбредных мышей-самцов CD1

Группа наблюдения, доза (количество животных)	Количество «корчей» за 20 мин ($X \pm m$)	Латентное время наступления «корчей» ($X \pm m$), с	Угнетение болевой реакции, %
1. Контроль, (n=10)	27,11 \pm 4,85	337 \pm 75	-
2. Трамадол, 10 (n=8)	16,50 \pm 2,21*	265 \pm 13	39,1
3. Анальгетик, 25 (n=8)	15,00 \pm 3,44*	232 \pm 19	44,7
4. Анальгетик, 50 (n=8)	3,63 \pm 1,35**#+	622 \pm 143*# +	86,6
5. Анальгетик, 100 (n=8)	14,00 \pm 1,79*^	318 \pm 58	48,4
6. Анальгетик, 200 (n=8)	17,00 \pm 4,41^	355 \pm 122	37,3

Примечание. после * - $p_u < 0,05$, ** - $p_u < 0,01$ по сравнению с контролем, # - $p_u < 0,05$ по сравнению с группой «Трамадол», + - $p_u < 0,05$ по сравнению с группой «Этовюрцин 25», ^ - $p_u < 0,05$ по сравнению с группой «Этовюрцин 50» (U-критерий Манна-Уитни).

Таким образом, этовюрцин в тесте «Уксусные корчи» проявляет анальгетическую активность, выраженную в различной степени в зависимости от дозы. Выявлено, что этовюрцин в дозе 50 мг/кг обладает преимущественной активностью по сравнению с референс-препаратом трамадалом по показателю угнетения болевой реакции и продолжительности латентного времени развития болевого ответа.

Заключение. Анализ полученных результатов исследования анальгетической активности этовюрцина в сравнении с референс-препаратом трамадалом в тестах «Горячая пластинка» и «Уксусные корчи» позволяет заключить, что вновь полученное вещество обладает выраженным обезболивающим действием, превосходящим по ряду показателей активность референс-препарата трамадола. Полученные данные о выраженном обезболивающем действии малотоксичного этовюрцина позволяют сделать вывод о перспективности дальнейшего исследования соединения в качестве анальгетического средства для купирования средней и высокой интенсивности болей различного генеза.

Литература

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н., Бунатян Н.Д. и др. М., ЗАО «Гриф и К», 2012.
2. Rice A.S., Cimino-Brown D., Eisenach J.C., Kontinen V.K., Lacroix-Fralish M.L., Machin I. Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain*. 2008;139:243–247. DOI: 10.1016/j.pain.2008.08.017.
3. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211:39-50. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041.

ПРОИЗВОДНЫЕ ГЕКСААЗАИЗОВЮРЦИТАНА В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

С.Г. Крылова^{1*}, Т.Н. Поветьева¹, К.А. Лопатина¹, Ю.В. Нестерова¹, О.Г. Афанасьева¹,
Е.П. Зуева¹, Е.Н. Амосова¹, Т.Г. Разина¹, О.Ю. Рыбалкина¹, П.В. Кульпин¹, Е.А. Киселева¹,
Н.И. Суслов¹, С.В. Сысолятин², Р. Терье⁴, А.Б. Ворожцов³

¹Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ Российской академии наук, г. Томск, Россия

²ФГБУН Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, г. Бийск, Россия

³Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

⁴Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie, Université Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, France

e-mail: krylova5935@mail.com

Ключевые слова: гексаазаизовюрцитан, анальгетики, молекула, тиовюрцин, этовюрцин.

Введение. Разработка препаратов ненаркотических анальгетиков для купирования сильной и средней боли являются относительно новым направлением фармацевтики. Их внедрение в качестве альтернативы опиатам является весьма актуальным (Соснов А.В. и др., 2016). Однако число реальных молекул-кандидатов крайне ограничено. CL-20 или гексанитрогексаазаизовюрцитан хорошо известно, как самое сильное высокоэнергетическое вещество, производные которого впервые были синтезированы в 80-х годах прошлого века. До недавнего времени многочисленные исследования, связанные с синтезом производных 2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] додекана (гексаазаизовюрцитана), перспективного компонента твердых ракетных топлив и композиционных взрывчатых веществ, носили преимущественно оборонный характер. Производные представляют собой полиазотистые полициклические соединения каркасного строения, обуславливающего их уникальные свойства. Лишь с 2003 года после приоритетных публикаций российских ученых соединения гексаазаизовюрцитанового строения начали рассматриваться с точки зрения применения их в медицине. В настоящее время исследователи ИПХЭТ СО РАН и НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ занимаются разработкой методов направленного синтеза новых молекул, начиная с компьютерного прогнозирования потенциальной биологической активности, изучением фармакологии новых молекул на основе гексаазаизовюрцитана, которые могут являться основой для создания инновационных лекарственных средств и эффективных технологий их получения. Проведенные расчеты спектра биологической активности позволили прогнозировать большое число вероятных видов биологической активности производных гексаазаизовюрцитана на основе его структурной формулы с использованием единого описания химической структуры и универсального математического алгоритма установления зависимостей "структура-активность» (рис. 1). Для каждого из соединений выполнено определение возможности наличия фармакологических эффектов с помощью расчёта вероятности drug-likeness, молекулярных механизмов действия и токсичности в диапазоне вероятностей 50% – 100%.

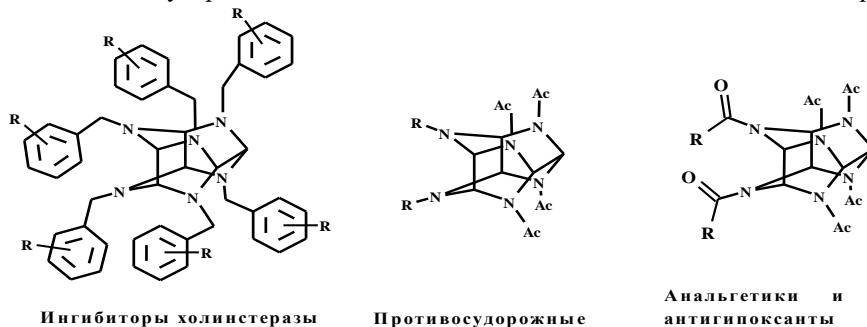


Рис. 1. Структурные формулы новых молекул-кандидатов

Согласно произведенным расчетам, производные гексаазаизовюрцитана могут представлять собой новый класс биологически активных соединений, обладающих разнообразной специфической активностью, в том числе, психотропной, анксиолитической, ноотропной, антинейротоксической, цитопротекторной, иммуномодулирующей, вазопротекторной, противоопухолевой, часть соединений теоретически могут быть кандидатами для разработки лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера. Прогноз спектра биологической активности соединений гексаазаизовюрцитанового строения показал их высокую потенциальную фармакологическую активность, особенно в отношении нервной системы.

Цель. Создание новых молекул методами направленного синтеза, исследование методами *in vivo* и *in silico* вновь синтезированных молекул – кандидатов в анальгетическое средство на основе производных 2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] додекана.

Материалы и методы. Метод компьютерного моделирования с использованием программного пакета PASS; первичный поиск белков-мишеней на сервере Pharm Mapper с использованием подхода картирования

фармакофоров; анализ лиганд-докинга на сервере Rosetta Online; методы молекулярного моделирования, моделирование молекулярной динамики; опытно-конструкторские разработки и лабораторные технологии ИПХЭТ СО РАН; тесты в соответствии с современными требованиями к исследованию фармакологически активных веществ с потенциальной анальгетической активностью (Barrot M., 2012; Миронов А.Н., 2013).

Результаты. В результате межотраслевого взаимодействия ИПХЭТ СО РАН и НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ была получена first-in-class молекула 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекан (тиовюрцин) для медицинского применения (патент РФ №2565766). Как результат выполнения Государственного контракта № 14.N08.11.0179 ФЦП «Фарма-2020» разработан высокоэффективный малотоксичный анальгетик «Тиовюрцин, капсулы 120 мг» для терапии болевого синдрома различной этиологии. Хотя в истории создания лекарственных средств уже применяли нитроглицерин и нитрат калия, но случай с тиовюрцином имеет кардинальные отличия. Несмотря на то, что молекула получена на основе CL-20, в ее структуре отсутствуют 6 нитрогрупп, определяющих взрывчатые свойства (рис. 2). В процессе химического синтеза CL-20 шесть нитрогрупп присоединяются только на конечном этапе процесса, поэтому тиовюрцин является больше прекурсором, чем модифицированной взрывчатой молекулой. Выявленный мультитаргетный механизм анальгетического действия тиовюрцина реализуется на различных уровнях восприятия, проведения и модуляции ноцицептивной активности. Использование специфических фармакологических анализаторов позволило предположить участие κ-опиоидной системы, TRP-рецепторов в реализации антиноцицептивного действия тиовюрцина с вероятным влиянием на серотонин- и ГАМКергические структуры ЦНС, каналы кальция (Ca²⁺) Т-типа (патент РФ №2684107). Проведенные исследования *in vivo* и *in silico* (докинг, молекулярное моделирование, моделирование молекулярной динамики) мультитаргетного механизма действия тиовюрцина объясняют отсутствие его морфиноподобного действия и побочных эффектов НПВС тем, что основными мишенями анальгетика являются TRPA1-рецепторы и потенциал-зависимые Ca²⁺ ионные каналы (Aguero S. et al., 2021).

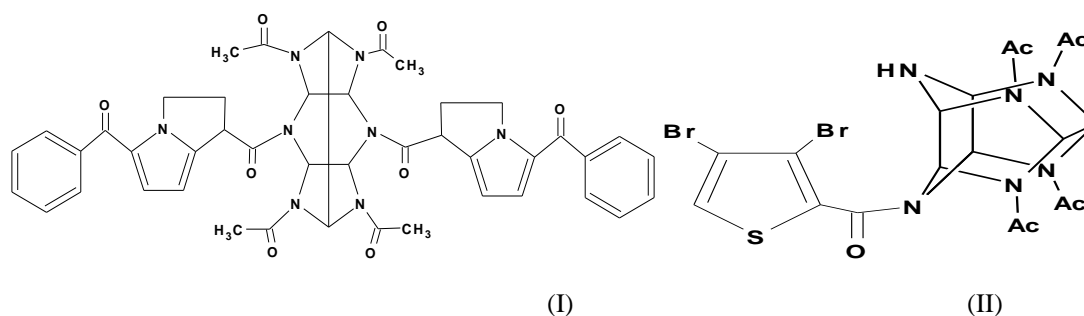


Рис. 2. Структурные формулы инновационных молекул.

- (I) 4,10-бис((±)-5-бензоил-2,3-дигидро-1Н-пирроло[1,2-а]пиррол-1-карбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекана
 (II) 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекана (тиовюрцин)

В поведенческих тестах с различной системой ноцицепции выявлено выраженное анальгетическое действие другой вновь синтезированной молекулы 4,10-бис((±)-5-бензоил-2,3-дигидро-1Н-пирроло[1,2-а]пиррол-1-карбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекана (патент РФ №2558148), сравнимое и/или превосходящее активность референс-препаратов из группы нестероидных противовоспалительных средств. Кроме того, продемонстрировано отсутствие гастротоксического действия соединения при субхроническом введении *per os* в широком диапазоне доз в эксперименте. В данном случае, получение нового производного гексаазазивюрцитана основано на принципе направленного фенолического синтеза, когда использовали в качестве фармакофора CL-20 и лиганды кеторолака, что обусловило значительную анальгетическую активность соединения в эксперименте (рис. 2). Подтверждением возможности получения новых фармакологически активных молекул на основе гексаазазивюрцитана является синтез соединения (рис. 3) 4,10-ди(этоксацетил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекан (патент РФ №2736936).

Проведено исследование анальгетической активности этиовюрцина в сравнении с референс-препаратом трамаолом в тестах «уксусные корчи», «механической компрессии лапы по *Randall-Selitto*» и «горячая пластина», результаты которого позволяют заключить о его выраженном антиноцицептивном действии при внутрижелудочном пути введения в диапазоне доз 25-200 мг/кг, превосходящим по ряду показателей эффективность анальгетика с опиоидным компонентом механизма действия.

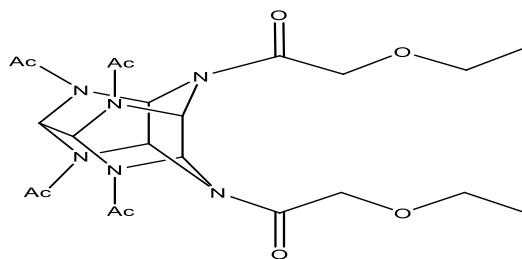


Рис. 3. Структурная формула 4,10-ди(этоксияцетил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекана (этовюрцин)

Заключение. Несмотря на степень разработанности каждая из представленных молекул позиционируется в качестве малотоксичного высокоэффективного анальгетического средства, не имеющего аналогов в патентной и научно-медицинской литературе. Проведенные исследования подтверждают перспективность использования гексаазаиворцитана в качестве перспективного фармакофора для получения на его основе новых молекул с вероятной заданной активностью.

Литература

1. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2013:944.
2. Соснов А.В., Садовников С.В., Семченко Ф.М., Руфанов К.А., Тохмахчи В.Н., Соснова А.А., Тюрин И.А. Сильнодействующие ненаркотические анальгетики как направление развития фармацевтики. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;14(1):196–206.
3. Agüero S., Megy S., Eremina V.V., Kalashnikov A.I., et al. Discovery of a Novel Non-Narcotic Analgesic Derived from the CL-20 Explosive: Synthesis, Pharmacology, and Target Identification of Thiowurtzine, a Potent Inhibitor of the Opioid Receptors and the Ion Channels. *ACS Omega*. 2021;6(23):15400-15411. DOI: [10.1021/acsomega.1c01786](https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01786).
4. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211:39-50. DOI: [10.1016/j.neuroscience.2011.12.041](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041).

АРНИКА – ПЕРСПЕКТИВНОЕ РАСТЕНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

С.В. Лемясева*, Л.В. Крепкова, А.Н. Бабенко, О.С. Кузина

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», г. Москва, Россия

e-mail: lemyaseva.svetlana@yandex.ru

Ключевые слова: арника облиственная, экстракт сухой, крысы.

Введение. В настоящее время отмечается повышенный интерес к растительному сырью, как источнику новых биологически активных компонентов лекарственных средств, а также для получения стандартизованных лекарственных препаратов с доказанной эффективностью и безопасностью. Комплекс биологически активных веществ, содержащихся в растениях, обуславливает широкий спектр их фармакологической активности. Одним из перспективных лекарственных растений является арника облиственная (*Arnica foliosa* Nutt) семейство Астровые (Asteraceae), обладающая кровоостанавливающим, ранозаживляющим, противовоспалительным, гастропротективным, гиполипидемическим, антиоксидантным и желчегонным действием (Багинская А.И. и др., 2012; Бортникова В.В. и др., 2019; Лупанова И.А. и др., 2021). В ФГБНУ ВИЛАР был получен экстракт сухой из травы арники облиственной, основными биологически активными веществами указанного экстракта являлись фенольные соединения (30-35%), липофильные вещества (3–5 %), углеводы (20–25 %), азотсодержащие соединения 20–25 % (Марчишин С.М., Комиссаренко Н.Ф., 1981; Азаркова А.Ф. и др., 2000; Бортникова В.В. и др., 2019). Стандартизацию сухого экстракта арники облиственной (АОЭС) проводили по содержанию фенольных соединений, в пересчете на лютеолин-7-глюкозид, количество которого в экстракте содержалось не менее 4,5%. (Азаркова А.Ф. и др., 2000).

Цель. Доклиническое изучение безопасности арники облиственной экстракта сухого и созданных на его основе лекарственных препаратов.

Материалы и методы. Изучение безопасности арники облиственной экстракта сухого в условиях хронических экспериментов (90 дней) проведено на 80 половозрелых клинически здоровых крысах *Wistar* (самцы и самки); геля 1% - на крысах-самцах *Wistar* и суппозиторий 0,05 г - на 10 кроликах-самцах породы Шиншилла, согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н., 2013) и Правилам надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации. Животные были получены из питомника ФГБНУ ВИЛАР и содержались в контролируемых и стандартных условиях вивария. Первоначальная масса тела крыс составляла 180-200 г (по 10 животных в группе), АОЭС вводили ежедневно в желудок в дозах 100, 500 и 1250 мг/кг. Контрольные животные получали эквивалентные

объемы водопроводной воды. Кроликам вводили суппозитории ректально в дозе 14 мг/кг и наносили гель 1% крысам наружно на депилированный участок кожи спины крыс размером 1,5×1,5 см, один раз в день в дозе 30 мг/кг. Контролем служили животные, получавшие плацебо суппозитория и геля. Дизайны экспериментов были рассмотрены и одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР. В течение эксперимента регистрировали интегральные, гематологические, биохимические показатели и параметры гемостаза, а также проводили функциональные пробы и патогистологические исследования внутренних органов экспериментальных животных. Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики с применением t - критерия Стьюдента. Достоверность различий с контролем считали при P<0,05. Статистические данные обрабатывали с помощью лицензионной программы Statistica version 10.

Результаты. При длительном 90-дневном введении АОЭС в желудок крысам-самцам и самкам в дозах 100, 500 и 1250 мг/кг не установлено его повреждающего действия на основные интегральные показатели животных. На протяжении хронического эксперимента ни в одной из экспериментальных групп не отмечено гибели крыс. При исследовании гематологических показателей периферической крови: количество эритроцитов, лейкоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, среднее содержание и концентрация гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцитов у крыс-самцов и самок II-IV групп не имело статистически достоверных различий с контролем, за исключением статистически достоверного увеличения числа тромбоцитов, до $896 \pm 99 \times 10^9/\text{л}$ (P<0,05), в группе крыс-самцов, получавших экстракт в дозе 1250 мг/кг по сравнению с аналогичным показателем в контроле - $663 \pm 15 \times 10^9/\text{л}$. Введение АОЭС в максимальной испытанной дозе вызывало в конце хронического эксперимента статистически значимое укорочение протромбинового и АЧТВ времени у крыс-самцов, а у крыс-самок укорочение АЧТВ, протромбинового времени и увеличение содержания фибриногена в плазме по сравнению с контролем, что свидетельствует о нарушении реологических свойств крови экспериментальных животных в результате длительного введения АОЭС в указанной дозе. Исследование ряда биохимических показателей (общий белок, альбумины, общий холестерин, триглицериды, общий билирубин, глюкоза, мочевины, креатинин, концентрация ионов Na⁺ и K⁺), а также активности некоторых ферментов сыворотки крови, показало, что длительное введение АОЭС в дозе 1250 мг/кг нарушало функциональное состояние печени экспериментальных животных, вызывая статистически значимое увеличение активности щелочной фосфатазы и γ -глутамилтрансферазы у крыс-самцов (91 день) и у крыс-самок (31 день), по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1. Показатели активности ферментов сыворотки крови крыс-самцов, получавших АОЭС в хроническом эксперименте

Группа животных	Исследуемые показатели, M±m	
	Щелочная фосфатаза, Е/л	γ -Глутамилтрансфераза, Е/л
I. Контроль, вода	757±88	2,6±0,5
II. АОЭС, 100 мг/кг	688±61	6,4±1,5
III. АОЭС, 500 мг/кг	894±85	4,5±1,4
IV. АОЭС, 1250 мг/кг	1172±107*	6,9±1,2*

Примечание. * - достоверность различий с контролем (P<0,05).

Исследование функционального состояния почек крыс-самцов в условиях водной нагрузки показало, что под действием АОЭС в дозе 1250 мг/кг в течение хронического опыта наблюдали относительное увеличение суммарного диуреза крыс за 5 часов проведения пробы до $123,1 \pm 10,0\%$ (P>0,05) по сравнению с контролем $94,5 \pm 13,6\%$. При длительном введении АОЭС в желудок крысам-самкам в дозах 500 и 1250 мг/кг диуретическое действие экстракта в исследуемые сроки было более выражено и коррелировало со снижением концентрации ионов Na⁺ и уровня креатинина в сыворотке крови животных. В хроническом опыте не установлено кардиотоксического действия АОЭС по параметрам ЭКГ-исследования у крыс обоего пола. АОЭС у крыс-самцов и самок во всех испытанных дозах в тесте «открытое поле» вызывал снижение ориентировочных реакций (вертикальный компонент, «норковый» рефлекс и двигательная активность), статистически значимо выраженное у крыс-самцов по сравнению с контролем, что может быть расценено как проявление седативного действия экстракта. Патогистологические исследования внутренних органов крыс-самцов и самок, получавших в течение 90 дней в желудок АОЭС в дозах 100 и 500 мг/кг, не установили токсического эффекта исследуемого экстракта. У крыс-самцов АОЭС в дозе 1250 мг/кг проявлял гепато- и нефротоксичность, выражающиеся в умеренной зернистой дистрофии гепатоцитов и гипертрофии отдельных почечных клубочков, а также вызывал гиперплазию фолликулов селезенки и множество сидерофагов в ее артерии. У крыс-самок исследуемый экстракт в максимальной дозе вызывал лишь незначительную гипертрофию отдельных клубочков почек. Длительное введение суппозитория кроликам в дозе 14 мг/кг показало хорошую переносимость и отсутствие повреждающего действия изучаемого лекарственного средства на показатели периферической крови, белковый, липидный, углеводный обмен в печени, состояние сердечно-сосудистой системы экспериментальных животных; не

влияло на систему плазменного гемостаза по показателям тромбинового времени и содержанию фибриногена в плазме крови кроликов; не оказывало кардиотоксического действия. Патогистологические исследования внутренних органов кроликов, проведенные в конце хронического эксперимента, не установили общетоксического эффекта, а также местнораздражающего действия суппозиторий на слизистую толстого кишечника животных. При наружном применении мягкой лекарственной формы арники - геля 1 %, в дозе 30 мг/кг на депилированную кожу крыс не установлено его токсического действия. Гематологические и биохимические показатели у опытных и контрольных животных во время проведения эксперимента соответствовали средним величинам, характерным для этого вида лабораторных животных. Не установлено кардио- и нефротоксического действия. Патогистологические исследования внутренних органов животных, получавших длительные аппликации арники геля 1 %, не выявили морфологических нарушений, обусловленных его токсическим действием. Исследуемый гель не раздражал депилированную кожу крыс.

Заключение. В результате изучения общетоксического действия АОЭС установлено, что его длительное введение в желудок крысам в дозах, превышающих терапевтическую в 10 и 50 раз, не оказывало токсического действия на основные органы и системы организма подопытных животных. В условиях хронического опыта введение АОЭС в 125-кратной терапевтической дозе повышало риск внутрисосудистого свертывания крови, вызывало гепато- и нефротоксичность. Проведенные экспериментальные токсикологические исследования готовых лекарственных форм, суппозиториев ректальных 0,05 г и геля 1 % для наружного применения, созданных на основе АОЭС, свидетельствуют хорошей их переносимости подопытными животными, отсутствии нежелательных побочных эффектов и местнораздражающего действия. Полученные результаты позволяют рекомендовать лекарственные препараты, содержащие АОЭС, для терапии острых и хронических локализованных или генерализованных воспалительных процессов.

Литература

1. Азаркова А.Ф., Давыдова В.Н., Бурова А.Е., Кирьянов А.А., Нестеров Н.Н. Труды ВИЛАР. *Химия, технология и медицина*. 2000:50–53.
2. Багинская А.И., Лескова Т.Е., Леонидова Ю.А., Минеева М.Ф., Колхир В.К., Сокольская Т.А. Фармакологические свойства сухого экстракта травы арники обливенной. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012;1:189-195.
3. Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Михеева Н.С., Боровкова М.В. Доклиническое изучение безопасности арники обливенной (*Arnica foliosa* Nutt.) экстракта сухого. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019;82(5):28-35.
4. Лупанова И.А., Крепкова Л.В., Ферубко Е.В., Трумпе Т.Е., Бортникова В.В., Бабенко А.Н., Курманова Е.Н., Фатеева Т.В., Мизина П.Г., Сидельников Н.И. Новые лекарственные средства растительного происхождения ВИЛАР. М.:ФГУП Издательство «Наука», 2021. 159 с.
5. Марчишин С.М., Комиссаренко Н.Ф. Компоненты *Arnica montana* и *Arnica foliosa*. *Химия природных соединений*. 1981;5:662.
6. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012. с. 445-452.

ФАРМАКОКИНЕТИКА И МЕТАБОЛИЗМ ИННОВАЦИОННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА – АНТИАГРЕГАНТА

К.А. Леонов^{1*}, Д.А. Вишенкова², В.В. Быков¹, В.И. Павловский^{1,2}

¹ООО «Инновационные фармакологические разработки», г. Томск, Россия

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия
e-mail: leonov_k90@mail.ru

Ключевые слова: антиагрегант, фармакокинетика, метаболизм, ВЭЖХ/МС.

Введение. Тромбообразование наряду с артериальной гипертензией и ишемией тканей сердца и головного мозга являются основными причинами развития опасных для жизни осложнений сердечно-сосудистых заболеваний: острого коронарного синдрома, инфаркта миокарда, инсульта (Айнетдинова Д.Х. и др., 2007). Для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний используют ингибиторы агрегации тромбоцитов (антиагреганты) с различным механизмом действия: ингибиторы циклооксигеназы (ацетилсалициловая кислота), антагонисты АДФ (P2Y₁₂)-рецепторов тромбоцитов – тиаенопиридины (клопидогрел, тиклопидин, прасугрел), ингибитор цАМФ фосфодиэстеразы (дипиридамол), антагонисты гликопротеиновых рецепторов GP IIb/IIIa (эптифибатид, тирофибан) и некоторые другие (Суслина З.А. и др., 2009; Чарная М.А., Морозов Ю.А., 2009; Greenhalgh J., Bagust A., 2011). Учитывая лимитированный перечень эффективных антиагрегантов и наличие противопоказаний, побочных явлений, ограничений в способах применения, актуален поиск новых эффективных и безопасных средств лечения и профилактики тромбоза для снижения смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Томской компанией «Ифар» разработано новое антитромботическое лекарственное средство – производное индолинона (кодовое

наименование – GRS) (Граник В.Г. и др., 1997). Полученное соединение (рисунок 1), обладая новым механизмом действия, активирует растворимую гуанилатциклазу, тормозит агрегацию тромбоцитов и препятствует тромбообразованию, снижает мышечный тонус сосудов и, следовательно, улучшает кровоснабжение ишемизированных органов. Кроме того, инновационное соединение проявляет антигипертензивные и кардиопротекторные свойства.

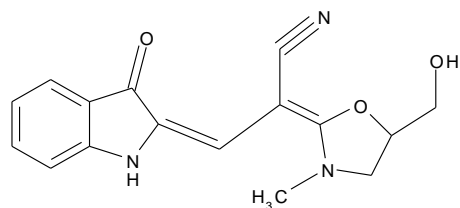


Рис. 1. Структурная формула GRS

Цель. Выявить закономерности всасывания и выведения нового лекарственного средства в организме лабораторных животных, оценив его концентрацию в биологических жидкостях. Рассчитать фармакокинетические параметры соединения в плазме крови, моче и кале животных, а также плазме крови человека. Определить скорость и степень распределения вещества по внутренним органам и тканям животных, установить кумуляцию. Идентифицировать продукты биотрансформации целевого лекарственного средства в исследуемых биологических объектах.

Материалы и методы. В экспериментах с животными использовали крыс Sprague Dawley в возрасте от 2,5 до 3 месяцев, массой 320–350 г, без каких-либо специфических патогенных факторов. Крыс содержали в виварии с контролируемыми условиями окружающей среды: температура 20–23 °С, относительная влажность 70%, воздухообмен от 10 до 11 об/ч, регулируемый световой режим 12:12. Также использовали кроликов (*Oryctolagus cuniculus* L.) Калифорнийской породы в возрасте до 3,5 месяцев массой 2,4–3,0 кг. Кроликов содержали в конвенциональной секции при контролируемых условиях окружающей среды: температура 16–22°С, относительная влажность до 30–70%, воздухообмен 8–15 об/ч и регулируемый световой режим 12:12. До введения субстанции GRS и готовых лекарственных форм на ее основе (за 16–20 ч, но не более 24 ч) животных лишали корма, доступ к питьевой воде сохраняли. В исследованиях фармакокинетики и метаболизма субстанцию вводили животным внутривенно в виде суспензии в 0,5% водном растворе карбоксиметилцеллюлозы, готовые лекарственные формы внутривенно в виде суспензии таблеточной или капсульной массы. Введение осуществляли с помощью зонда. Клинические испытания проводили на базе ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ) с участием здоровых добровольцев. Прием внутрь лекарственного препарата в виде капсул осуществлялся натощак в дозе 20 мг. Количественное определение GRS в биологических образцах проводили методами ВЭЖХ/УФ и ВЭЖХ/МС. Хроматографический анализ осуществляли на приборе Милихром А-02 (ООО ИХ ЭкоНова, Новосибирск, Россия) с детектированием при длине волны 360 нм (Leonov K.A., Vishenkova D.A., 2020). Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре QTRAP 4500 (ABSciex, США) в комплексе с жидкостным хроматографом Infinity 1260 (Agilent, США) с детектированием при положительной полярности в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) по селективному переходу m/z 298,3 → 183,1. Все аналитические методики предварительно валидировали в соответствии с требованиями (Граник В.Г. и др., 1997; Leonov K.A., Vishenkova D.A., 2020). Содержание GRS в испытуемых образцах определяли по градуировочной кривой зависимости площади пика аналита от его концентрации. По значениям концентраций рассчитывали фармакокинетические параметры вещества, статистическую обработку данных проводили, используя пакет прикладных программ Microsoft Office Excel и язык программирования R. Идентификацию метаболитов в биологических объектах животных и человека проводили методом масс-спектрометрии высокого разрешения на приборе Q-TOF 6540 (Agilent, США) с регистрацией ионов в режиме сканирования полного ионного тока в диапазоне 100–500 Да и регистрацией ионов-продуктов в диапазоне 50–500 Да.

Результаты. В фармакокинетических исследованиях на животных выявлено быстрое всасывание GRS из желудка с линейным пропорциональным увеличением экспозиции вещества в крови в зависимости от введенной дозы (10, 20, 40 мг/кг). Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) составляет 0,5–1 ч, период полувыведения ($T_{1/2}$) – 1,4–3,9 ч. Определена высокая относительная биодоступность (> 86 %) GRS из лекарственной формы капсулы. При многократном введении субстанции показано отсутствие статистически значимых отличий в показателях максимальной концентрации и общей экспозиции вещества, что свидетельствует об отсутствии накопительного эффекта в крови. Благодаря анализу органов и тканей установлено наибольшее распределение GRS в печени, меньше всего вещества содержится в тканях почек и сердца. Испытуемый объект не проникает и не накапливается в тканях головного мозга. Кумулятивный эффект в тканях внутренних органов отсутствует. В результате исследования экскреции установлены пути элиминации GRS из организма в неизменном виде: около 0,3 % – с мочой, около 10 % – с калом. В качестве основного метаболита в плазме крови и моче животных и человека идентифицировано гидроксипроизводное GRS – продукт гидроксирования I-фазы биотрансформации.

Заключение. В рамках доклинических и клинических испытаний инновационного лекарственного средства антиагреганта установлены закономерности всасывания и выведения нового соединения. Определены фармакокинетические параметры в плазме крови, моче, кале, органах и тканях животных и человека, исследована кумуляция вещества в биологических средах. Оценены абсолютная и относительная биодоступности нового лекарственного средства. Идентифицированы продукты биотрансформации GRS в биологических объектах животных и человека.

Литература

1. Айнетдинова Д.Х., Удовиченко А.Е., Сулимов В.А. Роль антитромбоцитарной терапии в первичной и вторичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. *Эффективная фармакотерапия в кардиологии и ангиологии*. 2007;2:36–41.
2. Граник В.Г., Рябова С.Ю., Григорьев Н.Б. Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы его образования (химический аспект). *Успехи химии*. 1997;66(8):792.
3. Суслина З.А., Танащян М.М., Домашенко М.А., Антиромботическая терапия ишемических нарушений мозгового кровообращения с позиций доказательной медицины, 2-е изд. Москва: ООО «Медицинское информационное агентство»; 2009.
4. Чарная М.А., Морозов Ю.А. Современные антиагрегантные препараты и их применение в клинике (обзор литературы). *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2009;1:34-40.
5. Greenhalgh J., Bagust A. Clopidogrel and modified-release dipyridamole for the prevention of occlusive vascular events (review of Technology Appraisal No. 90): a systematic review and economic analysis. *Health Technol. Assess.* 2011;15(31):1-178.
6. Leonov K.A., Vishenkova D.A. Development and validation of HPLC-UV method for quantitation of a new antithrombotic drug in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. 2020:1160.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ¹H ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПЛАЕНТНОСТИ К ТЕРАПИИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Е.М. Моисеева*, В.В. Рафальский, Г.С. Куприянова, И.Г. Мершиев, А.Ю. Зюбин

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

e-mail: emoiseeva@kantiana.ru

Ключевые слова: ¹H ЯМР-спектроскопия, ацетилсалициловая кислота, комплаентность.

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения каждый год 17,5 тысяч человек умирает от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). В это число входит 7,3 миллиона смертей в результате ишемической болезни сердца, а также 6,2 миллиона – от инсульта. Большое внимание уделяется профилактике сердечно-сосудистой смертности у пациентов, входящих в группу высокого риска. Для данной группы пациентов важно, чтобы лечение было непрерывным и высокая комплаентность сохранялась в течение длительного времени (Packard K.A., Hilleman D.E., 2016). В настоящее время разработано несколько подходов к оценке приверженности к терапии ацетилсалициловой кислотой (АСК): методы подсчета препарата, опрос пациентов, оценка функции тромбоцитов, определение метаболитов аспирина в крови и моче. Лишь в нескольких исследованиях измеряли уровни метаболитов АСК у пациентов с ССЗ, принимающих АСК для профилактики ССЗ (Hanke G.J., Eikelboom J.W., 2006; Navaratnam K. et al., 2017). В данной работе мы сосредоточили свое внимание на изучении метаболитов АСК в моче, принимая во внимание тот факт, что период полувыведения АСК составляет 2-3 часа и, следовательно, концентрация метаболитов в моче значительно выше, чем в плазме (Liu J.H. et al., 1996).

Цель. Изучить возможность использования ¹H ЯМР-спектроскопии для идентификации метаболитов АСК в моче и поиска характерных маркеров, которые можно было бы использовать для мониторинга комплаентности пациентов к терапии АСК.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие здоровые добровольцы в возрасте 19-50 лет. Добровольцы не принимали никаких лекарственных препаратов в течение как минимум семи дней до участия в исследовании. Образцы мочи были собраны после подписания информированного согласия. Информированное согласие, протокол исследования были одобрены независимым этическим комитетом. Образцы мочи 4 добровольцев были собраны до и после приема (через 1,5, 4, 6 и 9 часов) 100, 300 и 3000 мг АСК. Добровольцы собирали мочу в течение 24 часов после приема АСК. Свежесобранную мочу центрифугировали при 2000 g в течение 10 минут, после чего супернатант собирали и пропускали через фильтр (диаметр пор 0,2 мкм, ацетат целлюлозы, стекловолокно) (Merck, Millipore)). Затем, чтобы избежать изменений химических сдвигов и стабилизировать образец, рН мочи довели до 7,2-7,4. Затем образцы замораживали и хранили при -20 ° С до проведения анализа. Образцы оставались стабильными и давали повторяемые результаты после 3-4 циклов оттаивания и замораживания. Пробы мочи исследовали методом ¹H ЯМР на спектрометре VARIAN 400 в магнитном поле 9Т. Основные параметры одномерных экспериментов: длительность 900 импульсов 2,5 мкс, количество сканирований от 128 до 8192. Все спектры

снимались при температуре 25° С. Спектральное разделение сигналов эндогенных соединений в образцах мочи проводили с учетом литературных данных о химических сдвигах в биологических жидкостях, константах спин-спинового взаимодействия (Emwas, Roy et al. 2019). Для дифференцировки сигналов метаболитов АСК на фоне сигналов других метаболитов, предварительно были сняты ¹Н ЯМР спектры контрольных соединений (приобретены у Sigma-Aldrich): салициловой, салицилуровой и гентизиновой кислот. Данные соединения соответствуют основным метаболитам АСК и гиппуровой кислоты. Спектры были сняты в тех же экспериментальных условиях, что и образцы мочи.

Результаты. Образцы мочи здоровых добровольцев до и после приема 100 мг, 300 мг и 3000 мг АСК были исследованы с помощью ¹Н ЯМР-спектроскопии. Наиболее значительные изменения наблюдались в спектрах образцов мочи добровольцев после приема 3000 мг АСК. Выявлены интенсивные сигналы в области между 6,7 и 6,8 ppm, а также четко различимые триплетные и перекрывающиеся сигналы в областях между 7,2 и 7,4 ppm и между 7,5 и 7,6 ppm. Данные сигналы характеризуют основные метаболиты АСК: салициловую, салицилурованную и гентизиновую кислоту. В качестве примера на рисунке 1 показаны два фрагмента спектров ¹Н ЯМР мочи, полученные до и через 2,5 часа после приема 3 г АСК.

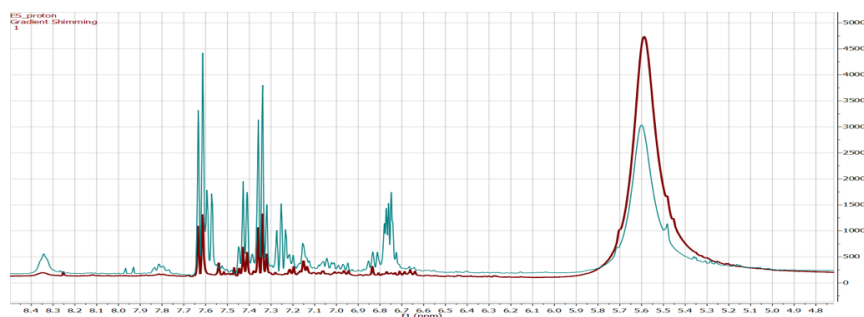


Рис. 1. Фрагменты ¹Н ЯМР спектра образца мочи добровольца, собранные до (красный) и через 2 часа после приема 3000 мг АСК (зеленый)

Аналогичные изменения в спектрах ¹Н ЯМР наблюдались в образцах мочи добровольцев после приема 100 г и 300 г. Выяснилось, что интенсивность возникающих сигналов зависит от времени сбора мочи после приема препарата и величины дозы. Фрагменты ¹Н ЯМР спектров образцов мочи добровольцев, собранных после приема 100 мг и 300 мг препарата, показаны на рисунке 2 и рисунке 3.

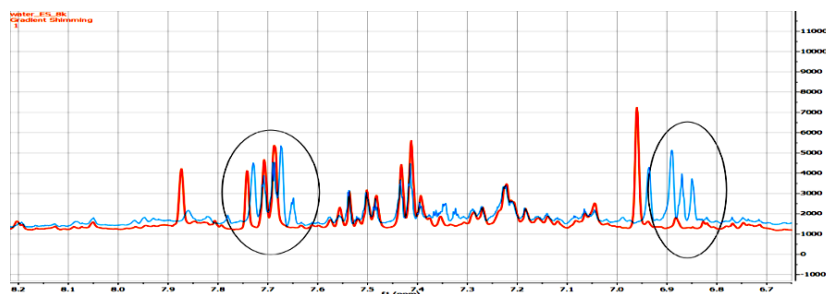


Рис. 2. ¹Н ЯМР образца мочи здорового добровольца, полученный до (оранжевый) и через 4 часа после приема 300 мг аспирина (синий)

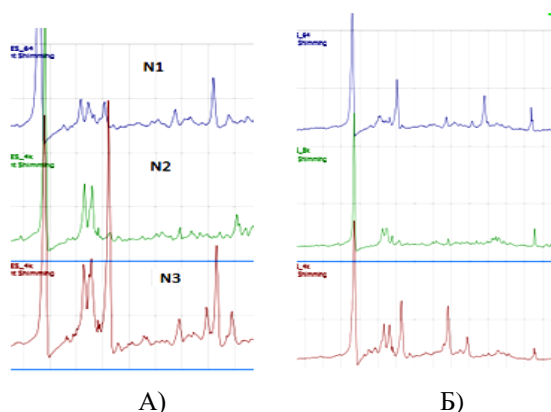


Рис. 3. Фрагменты спектров ¹Н ЯМР образцов мочи, собранных до (а) и после приема 100 мг аспирина (б). Образец мочи собирают через 4 часа после приема для добровольцев №1 и №2 и через 3 часа для добровольца №2

Анализ ^1H ЯМР спектров мочи здоровых добровольцев до и после приема АСК показал разную динамику метаболизма в зависимости от времени сбора мочи. Спектр образцов мочи, собранных через 1,5 часа после приема препарата, не претерпел значительных изменений. Однако профиль ^1H ЯМР спектра мочи, собранной через 4 часа после приема 100 мг препарата, имеет значимые изменения. Более выраженные изменения в одних и тех же областях ^1H ЯМР спектров можно наблюдать для образцов мочи, собранных через 4 часа и 6 часов у добровольцев, принявших однократную дозу 300 мг аспирина. Необходимо обратить внимание на динамику сигнала гиппуровой и салицилуевой кислоты в области от 3 ppm до 4 ppm. Динамика процесса зависит как от индивидуальных особенностей добровольцев, так и от интервала после введения дозы. Например, было обнаружено, что сигнал гиппурата уменьшился в 12,3 раза через 4 часа после введения 100 мг АСК для добровольца № 1 и в 1,77 раза для №3, тогда как он уменьшился в 2 раза для добровольца №2 через 3 часа после введения дозы. Исследование образцов мочи добровольцев до и после приема 100 мг, 300 мг и 3000 мг АСК выявило значительные изменения в одномерном и двумерном ^1H ЯМР спектрах, связанные с наличием дополнительных сигналов, характерных для метаболитов АСК, среди которых превалировал сигнал салицилуевой кислоты.

Заключение. В этой работе было обнаружено, что у здоровых добровольцев после приема 100, 300 и 3000 мг АСК наиболее интенсивные пики метаболитов аспирина в ^1H ЯМР спектрах связаны с салицилуевой кислотой. Наиболее интенсивная группа сигналов наблюдается в области от 6,6 до 6,9 ppm. Эта группа сигналов не перекрывается с сигналами естественных метаболитов и сигналами гиппуровой кислоты. Таким образом, данное исследование может быть использовано для контроля приема АСК в дозах, используемых для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. В нашей работе показано, что ^1H ЯМР спектроскопия — это быстрый и эффективный неразрушающий метод обнаружения метаболитов АСК, который не требует трудоемкой пробоподготовки и может служить основой для разработки алгоритмов автоматического определения метаболитов АСК в моче.

Работа поддержана грантом РФФИ и правительства Калининградской области, проект № 19-415-390001.

Литература

1. Emwas A.H., Roy R., McKay R.T., Tenori L., Saccenti E., Gowda G.A.N., Raftery D., Alahmari F., Jaremko L., Jaremko M., Wishart D.S. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*. 2019;9(7). DOI: 10.3390/metabo9070123
2. Hanke G.J., Eikelboom J.W. Aspirin resistance. *Lancet*. 2006;367(9510):606-617. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68040-9
3. Liu J.H., Smith P.C. Direct analysis of salicylic acid, salicyl acyl glucuronide, salicylic acid and gentisic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;675(1):61-70. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00337-1
4. Navaratnam K., Alfirevic Z., Pirmohamed M., Alfirevic A. How important is aspirin adherence when evaluating effectiveness of low-dose aspirin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;219:1-9. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2017.10.004
5. Packard K.A., Hilleman D.E. Adherence to therapies for secondary prevention of cardiovascular disease: a focus on aspirin. *Cardiovasc Ther*. 2016;34(6):415-422. DOI: 10.1111/1755-5922.12211

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА ИНДУЦИРУЕМОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА

В.С. Мотов^{1,2*}

¹ООО «Инновационные Фармакологические Разработки», г. Томск, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Томск, Россия

email: slammingpenguin@gmail.com

Ключевые слова: производное аминоксидина, диклофенак, индуцируемая форма синтазы оксида азота, экссудативное воспаление, крысы.

Введение. Заболевания, сопровождающиеся воспалением, являются одной из наиболее серьезных проблем современной медицины, так как поражают жизненно важные органы и ухудшают качество жизни. Фармакотерапия таких заболеваний ограничена приемом нестероидных противовоспалительных средств и глюкокортикоидов, при тяжелом течении заболеваний также применяют иммунодепрессанты и препараты моноклональных антител (Ira T., Glass C.K., 2013). При воспалении активируется индуцируемая синтаза оксида азота (iNOS). Этот фермент создает цитотоксичную концентрацию NO, усиливающего воспаление (Kang O.H. et al., 2008). Потенциальным методом лечения воспалительных заболеваний может быть ингибирование iNOS и уменьшение синтеза NO.

Цель. Изучить влияние ингибитора индуцируемой NO-синтазы, производного аминоксидина (шифр – LIS-M), на острое экссудативное воспаление.

Материалы и методы Производное аминоксидина LIS-M представляет собой (3-(4-нитрофениламино)индол-2-ил]метиленамино)гуанидинаметансульфонат. LD₅₀ LIS-M при введении в

желудок крысам составляет 15 200 мг/кг. Синтезирован в ООО «Ифар» (РФ, Томск). Эксперименты проводили в испытательном центре ООО «Инновационные Фармакологические Разработки» (ИЦ) на 90 аутбредных самках крыс линии Sprague Dawley массой 180–200 г. Животных получали из отделения свободных от патогенной флоры лабораторных животных ИЦ. Крыс содержали в пластиковых клетках (по 6 особей) при температуре 18–26°C, относительной влажности воздуха 45–65%, воздухообмене 10–11 об/ч и регулируемом световом режиме (12:12 ч). Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ и проведено в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите лабораторных животных (Страсбург, 1986) и с соблюдением принципов и правил надлежащей лабораторной практики. Для оценки влияния LIS-M на разные виды острого экссудативного воспаления под плантарный апоневроз задней конечности крыс вводили по 0,1 мл растворов каррагинана (20 мг/мл), гистамина (20 мг/мл) или серотонина (0,1 мг/мл) в изотоническом растворе натрия хлорида (все Sigma-Aldrich, США). Под плантарный апоневроз другой задней конечности вводили изотонический раствор натрия хлорида в том же объеме. Выбор воспалительных агентов основан на разной степени вовлеченности iNOS в развитие воспаления (Holsapple M.P. et al., 1980; Миронов А.Н., 2013). Каррагинан связывается с TLR-рецепторами и при участии цитозольных киназ активирует ядерный фактор κ B с усилением синтеза iNOS (Holsapple M.P. et al., 1980). Гистамин как агонист H_1 -рецепторов активирует фосфолипазу C и продукцию диацилглицерола и инозитол-3-фосфата. Вторичные мессенджеры активируют протеинкиназу C β и ядерный фактор κ B, что становится стимулом к синтезу iNOS (Holsapple M.P. et al., 1980). Серотонин при участии на 5-HT $_2$ -рецепторов активирует фосфолипазу A и митоген-активируемые протеинкиназы. Это увеличивает синтез iNOS (Huang G.J. et al., 2012). Крысам однократно за 0,5 ч до инъекции воспалительного агента внутримышечно вводили LIS-M в дозах 5, 10 и 20 мг/кг или препарат сравнения диклофенак в дозе 10 мг/кг (Миронов А.Н., 2013). Животные контрольной группы получали растворитель в эквивалентном объеме. Степень отека оценивали при помощи плетизмометра (UGO BASIL, Италия) как разницу между объемом конечности, в которую вводили воспалительный агент, и объемом конечности, в которую вводили изотонический раствор хлорида натрия. Оценку проводили через 4 ч после введения раствора каррагинана или через 0,5 ч после введения растворов гистамина и серотонина (Holsapple M.P. et al., 1980). Рассчитывали показатель ЭД $_{50}$ как дозу, вызывающую 50 % эффект (Миронов А.Н., 2013). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Выявлено нормальное распределение данных, поэтому достоверность различий ($p < 0,05$) между группами определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Расчеты проводили методом пробит-анализа, адаптированным для оценки результатов, полученных в градуировочной форме.

Результаты. Каррагинан, гистамин и серотонин вызывали экссудативную реакцию в конечности животных. Серотонин оказывал провоспалительное действие сильнее гистамина и каррагинана. LIS-M во всех дозах и диклофенак в дозе 10 мг/кг при однократном внутримышечном введении статистически достоверно ослабляли отек конечностей крыс. При серотониновой модели противовоспалительный эффект LIS-M и диклофенака был слабее, чем в эксперименте с инъекцией каррагинана и гистамина. Эффекты LIS-M в тесте с серотином не зависели от дозы, что обусловлено значительно меньшей ролью iNOS при данной модели отека. ЭД $_{50}$ для LIS-M при каррагинановом отеке составила 10 (5–15) мг/кг, 8 (4–14) мг/кг при гистаминовом и 1,7 г/кг при серотониновом. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Величина отека конечностей животных после введения растворителя, LIS-M в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, диклофенака в дозе 10 мг/кг ($X \pm SE$)

Группа	Каррагинан		Гистамин		Серотонин	
	Мл	%	Мл	%	Мл	%
Растворитель	0,54±0,08	100	0,37±0,01	100	0,90±0,04	100
LIS-M 5 мг/кг	0,38±0,06*	70	0,21±0,03*	56	0,70±0,07*	77
LIS-M 10 мг/кг	0,23±0,03*	42	0,18±0,03*	48	0,68±0,05*	75
LIS-M 20 мг/кг	0,18±0,02*	33	0,10±0,03*	29	0,64±0,07*	71
Диклофенак, 10 мг/кг	0,26±0,03*	48	0,12±0,03*	32	0,67±0,07*	74

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с показателем контрольных животных.

Заключение. LIS-M при внутримышечном введении в дозах 5, 10 и 20 мг/кг обладает выраженной противовоспалительной активностью в моделях острого экссудативного отека конечности, вызванного у крыс каррагинаном, гистамином и серотином. LIS-M в дозах 10 и 20 мг/кг по антиэкссудативной активности сопоставим с эффектом препарата сравнения диклофенаком в дозе 10 мг/кг.

Литература

1. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2013. Ч. 1. 944 с.

- Holsapple M.P., Schnur M., Yim G.K.W. Pharmacological modulation of edema mediated by prostaglandin, serotonin and histamine. *Agents and Actions*. 1980;10(4):368–373.
- Huang G.J., Pan C.H., Liu F.C., Wu T.S., Wu C.H. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide-stimulated RAW246.7 macrophages and the λ -carrageenan-induced paw edema model. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(5):1485–1493.
- Ira T., Glass C.K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 2013;339(6116):166–72.
- Kang O.H., Chae H.S., Oh Y.C., Choi J.G., Lee Y.S., Jang H.J. Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Angelicae Dahuricae Radix* Through Inhibition of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and NO Production. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2008;36(05):913–928.
- Manivet P., Mouillet-Richard S., Callebert J., Nebigil C.G., Maroteaux L., Hosoda S., Kellermann O., Launay J.-M. PDZ-dependent Activation of Nitric-oxide Synthases by the Serotonin 2B Receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(13):9324–9331.
- Tanimoto A., Wang K.Y., Murata Y., Kimura S., Nomaguchi M., Nakata S., Tsutsui M., Sasaguri Y. Histamine upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase in human intimal smooth muscle cells via histamine H1 receptor and NF-kappaB signaling pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(7):1556–1561.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЛЕЙ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА ПРИ ОСТРОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ С ГИПЕРКАПНИЕЙ

Г.А. Плиско*

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
e-mail: Grigoriy.Plisko@pharminnotech.com

Ключевые слова: гипоксия, этилметилсульфопиридин, доклинические исследования.

Введение. Гипоксия является типовым патологическим процессом. Выявление механизмов, влияющих на данное состояние предусматривает исследование внутриклеточных биохимических процессов, а также поиск лекарственных препаратов, механизм которых связан с активацией анаэробного гликолиза и повышением эффективности биохимических реакций аэробного окисления субстратов. Ряд производных 3-оксипиридина – этилметилгидроксипиридина (ЭМГП) сукцинат и ЭМГП малат, используются в качестве сквенджеров свободных радикалов жирных кислот и гидроперекисей липидов, обладающих антигипоксической активностью. Помимо того, что ЭМГП сукцинат активирует ФАД-зависимое звено цикла Кребса, также он обладает широким спектром плеiotропных эффектов, в т.ч. гепатотропным действием. Однако прямых экспериментальных сравнительных исследований эффективности антигипоксического действия различных производных ЭМГП ранее не проводилось (Ивкин Д.Ю. и др., 2020; Суханов Д.С. и др., 2020).

Цель. Целью данного исследования явилась сравнительная оценка антигипоксического действия различных солей ЭМГП.

Материалы и методы. В исследовании была оценена эквивалентная 100мг/кг ЭМГП сукцината доза производных, он же использован как препарат сравнения. Животные контрольных групп получали воду для инъекций в эквивалентном количестве. Препараты сравнения и исследуемые соединения вводили внутривенно. В каждой группе было по 10 животных. Нами для моделирования была выбрана острая нормобарическая гипоксическая гипоксия с гиперкапнией. Мышей помещали в герметически закрываемые банки объемом 200 см³ и фиксировали продолжительность жизни животных.

Результаты. Животные контрольной группы погибали через 2085,3±113,3 с после помещения в гермообъем. Наиболее выраженным антигипоксическим эффектом обладало референтное средство – 3382,2±542,2 с. Статистически достоверные отличия от группы контроля наблюдали также при применении веществ ЭМГП ацетилсалицилат, ЭМГП оротат и ЭМГП сукцинат (p<0,05), а применение соединений ЭМГП ацетилсалицилат и ЭМГП оротат снижало устойчивость животных к данному виду гипоксии. Следующим за ЭМГП сукцинатом по выраженности антигипоксического эффекта было вещество ЭМГП салицилат, при использовании которого время жизни лабораторных животных увеличивалось на 31,8% по сравнению с контролем, тогда как ЭМГП сукцинат повышал данный показатель на 62,2%.

Заключение

- Эталонное соединение – ЭМГП сукцинат, обладает антигипоксической активностью на данной модели;
- ЭМГП ацетилсалицилат и ЭМГП оротат так же показали выраженную антигипоксическую активность на модели острой нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией;
- Субстраты окисления из числа дикарбоновых интермедиатов цикла Кребса (сукцинат, малат, фумарат, оксалоацетат) представляют большой интерес как антигипоксические средства биоэнергетической направленности.

Литература

1. Ивкин Д.Ю., Суханов Д.С., Плиско Г.А. Антигипоксическая активность различных солей этилметилгидроксипиридина. *Молекулярная медицина*. 2020;18 (4):36–41.
2. Суханов Д.С., Ивкин Д.Ю., Плиско Г.А. Влияние производного 2-этил-6метил-3-гидроксипиридина на течение неалкогольной жировой болезни печени в эксперименте. *Молекулярная медицина*. 2020;18(1):21–26.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ SGLT-2 ИНГИБИТОРА НА ХРОНИЧЕСКУЮ СЕРДЕЧНУЮ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ, ИНДУЦИРОВАННУЮ ВВЕДЕНИЕМ ДОКСОРУБИЦИНА

Е.Д. Семивеличенко*

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: Evgeniy.Semivelichenko@pharminnotech.com

Ключевые слова: Доксорубин, Эмпаглифлозин, кардиотоксичность, антрациклиновые антибиотики.

Введение. Доксорубин – эффективный химиотерапевтический агент, который назначается для лечения широкого спектра различных видов опухолей. Однако, несмотря на то, что благодаря данному лекарственному препарату снижается вероятность смерти от онкологических заболеваний, вероятность смерти от сердечно - сосудистых событий увеличивается. Доказано, что доксорубин обладает кардиотоксичностью, поэтому проблема поиска кардиопротектора является актуальной на сегодняшний день. SGLT- 2 ингибиторы представляют особый интерес в отношении наличия кардиопротективного эффекта. В исследовании EMPA-REG в 2015 в отношении неблагоприятных сердечно -сосудистых событий у больных сахарным диабетом II типа было продемонстрировано положительное влияние эмпаглифлозина на сердце. Последние исследования подтвердили преимущества терапии эмпаглифлозином для сердечно-сосудистой системы у пациентов, не страдающих сахарным диабетом (Казаченко А.А. и др., 2013; Sabatino J. et al., 2020).

Цель. Оценка влияния ингибитора SGLT-2 Эмпаглифлозина на хроническую сердечную недостаточность, индуцированную введением доксорубина.

Материалы и методы. В исследовании были оценено влияние двух доз эмпаглифлозина (терапевтическая доза и превышающая терапевтическую в 10 раз) на хроническую сердечную недостаточность, вызванную введением антрациклинового антибиотика доксорубина. Токсические эффекты противоопухолевой терапии были смоделированы путем внутривенного введения доксорубина (кумулятивная доза 15 мг/кг) в течение месяца (4 точки). Для проведения эксперимента были выбраны взрослые белые беспородные крысы-самцы, полученные из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область), массой от 200 до 250 г. Было взято 36 животных, которые разделили на 3 группы по 12 в каждой (n=12), где первая группа – получала только доксорубин, вторая и третья группа были экспериментальными, получали эмпаглифлозин в соответствующих дозах (терапевтическая доза и превышающая терапевтическую в 10 раз). Результаты оценивались на основе следующих показателей: масса тела; биохимические показатели крови; гистологический анализ; эхокардиография.

Результаты. *Показания массы тела.* Животные, получавшие только доксорубин, теряли в массе к окончанию эксперимента (-12,9 %), у второй группы наблюдалась тенденция к увеличению массы тела к 3-ей точке наблюдения. Третья группа лабораторных животных значительно прибавила в весе по отношению к первой неделе эксперимента (+6,5 %). *Показатели ЭхоКГ.* Через месяц у 1-ой группы опытных животных после введения доксорубина наблюдались признаки эксцентрического ремоделирования миокарда левого желудочка, характеризующиеся увеличением КДР на 11,7 %, ТМЖПд на 16,2 %. Также снизились показатели сократимости ФУ на 10,5 % и ФВ на 16,2 %. У второй группы лабораторных животных, которые помимо доксорубина получали эмпаглифлозин в терапевтической дозе также отмечались признаки эксцентрического ремоделирования миокарда ЛЖ, характеризующиеся увеличением КДР (на 23,3 %), однако ТМЖПд увеличился на 7,7 %, что почти вдвое меньше результата 1-ой группы. Показатели сократимости также были снижены, но меньше, чем у 1-ой группы (ФВ снизился на 4,5%, ФУ на 5,9 %). Лучше всего себя проявила десятикратная доза эмпаглифлозина, так как в третьей группе наблюдается увеличение показателей сократимости (ФВ на 3,5 % и ФУ на 2,9 %) и уменьшение размеров левого желудочка (КДР снизился на 13,8 % и ТМЖПс на 11,1 %). *Показатели биохимии.* Повышение уровня АСТ говорит о повреждении кардиомиоцитов, так как в больших количествах содержится в миокарде. О возникновении хронической сердечной недостаточности говорит значительное увеличение активности АСТ без аналогичного увеличения активности АЛТ. По результатам исследования уровень АЛТ снизился у всех групп. Наибольшее повышение уровня АСТ наблюдалось у 1-ой группы (83,73 ± 12,26 Ме/л), а наименьший уровень у 2-ой (62,77 ± 21,09 Ме/л), показатели второй и третьей группы были близки к нормальным.

Заключение

- Эмпаглифлозин оказал небольшое кардиопротективное действие в отношении ХСН, индуцированной доксорубином;

- У групп, получавших докосорубин и эспаглифлозин, достоверно снижались биохимические показатели, свидетельствующие о поражении сердца и общем токсическом эффекте;
- Показатели эхокардиографии подтверждают кардиопротективное действие эспаглифлозина;
- SGLT-2 ингибиторы (в частности эспаглифлозин) представляют большой интерес для дальнейших исследований как кардиопротективные средства.

Литература

1. Казаченко А.А., Оковитый С.В., Куликов А.Н., Ивкин Д.Ю., Шустов Е.Б. Экспериментальное моделирование хронической сердечной недостаточности. *Биомедицина*. 2013;1(3):41-48.
2. Sabatino J., De Rosa S., Tammè L. Empagliflozin prevents doxorubicin-induced myocardial dysfunction. *Cardiovasc Diabetol*. 2020;19:66. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01040-5>.

ВЛИЯНИЕ ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

А.В. Сидехменова^{1*}, О.И. Алиев¹, А.М. Анищенко^{1,2}, А.Ю. Шаманаев¹, М.Б. Плотников¹

¹НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

²ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

e-mail: sidehmenva@yandex.ru

Ключевые слова: артериальная гипертензия, гемореологические средства, микроциркуляция.

Введение. Артериальная гипертензия (АГ) широко распространена и является одним из основных факторов риска развития сердечно сосудистых заболеваний, таких как инсульт и сердечная недостаточность (Williams B., 2018). В связи с этим поиск новых терапевтических подходов, учитывающих не только коррекцию артериального давления, но и другие факторы риска, приводящие к развитию сердечно сосудистых осложнений, является актуальной проблемой фармакологии. Изменение реологических свойств крови при артериальной гипертензии, выявленные в многочисленных исследованиях как у пациентов (Sloop G., 2015), так и в эксперименте (Korbut R.A., 2003) приводят к изменению микроциркуляции в органах-мишенях (Sloop G., 2015). Таким образом, одним из подходов коррекции нарушений микроциркуляции, возникающих при артериальной гипертензии, может являться применение средств с гемореологической активностью.

Цель. Изучить влияние гемореологических средств на параметры микроциркуляции и микроваскуляризации в коре головного мозга крыс со спонтанной артериальной гипертензией.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на животных категории SPF: 10 нормотензивных крысах линии Wistar-Kyoto (WKY) и 40 спонтанно гипертензивных крысах линии SHR, полученных из вивария ИБХ РАН, г. Пушкино. Содержание животных и уход за ними осуществлялись в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Директива 2010/63/EU). Протокол исследования утвержден комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол №166092019). Крыс включали в эксперимент после достижения возраста 6 недель. В качестве нормотензивного контроля использовали крыс линии WKY (n=10). Крысы SHR (n=40) были рандомизированы на группу контроля и опытные группы. Крысам SHR опытных групп вводили дигидрохверцетин в дозе 50 мг/кг, *n*-тирозол в дозе 50 мг/кг и пентоксифиллин в дозе 100 мг/кг внутривенно в 1% крахмальной слизи ежедневно в течение 6 недель. Крысы SHR контрольной группы и нормотензивные крысы WKY получали эквивалентное количество крахмальной слизи по той же схеме. Локальный кровоток в головном мозге крыс, наркотизированных тиопенталом натрия (80 мг/кг) определяли методом лазер-доплеровской флоуметрии на высокоскоростной системе сбора и обработки данных MP150 производства «Biopac Systems Inc.» (США) с использованием модуля LDF100C и оптоволоконного поверхностного датчика игольчатого типа TSD144 (25 мм x 1 мм (d)). Интенсивность локального кровотока оценивали в относительных единицах (blood perfusion unit – BPU). Данные обрабатывали с помощью программы «AcqKnowledge 4.2 for MP150». Структуру микроциркуляторного русла коры головного мозга исследовали методом микроскопии. Головной мозг фиксировали в 10% нейтральном формалине. Участок в области затылочной коры больших полушарий обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин, и изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. На микроскопе Axio lab.1 Carl Zeiss с помощью видеокамеры AxioCam ERc 5s на гистологическом препарате каждого животного фотографировали 25 последовательных полей зрения в зоне коры (увеличение 400x). В программе Image G измеряли диаметр всех капилляров, встречающихся на выполненных снимках, и определяли: плотность капиллярного русла (число капилляров в расчете на 1 мм²), средний диаметр капилляров, а также структура капиллярной сети. Для количественной оценки структуры капиллярной сети капилляры в соответствии с их диаметром распределяли на четыре интервальные группы в диапазонах: до 3, от 3 до 5, от 5 до 7 и от 7 до 9 мкм. Микрососуды диаметром, превышающим 10 мкм, рассматриваются, как артериолы (Francois-Dainville E., 1986). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ «Statistica 8.0». В тексте и таблицах данные

представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего значения. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали непараметрические критерии «Kruskal-Wallis test» и «Mann-Whitney U-test».

Результаты. У крыс с артериальной гипертензией наблюдалось статистически значимое снижение количества капилляров 3–5 мкм на 38%, количества капилляров 5–7 мкм на 66%, количества капилляров 7–9 мкм на 50% и плотности капиллярного русла на 25% в коре головного мозга по сравнению с показателями у нормотензивных животных (табл. 1, табл. 2). Относительное количество капилляров диаметром менее 3 мкм в коре головного мозга крыс SHR было на 78% статистически значимо выше, чем у крыс WKY (табл. 2).

Таблица 1. Влияние курсового введения (6 недель, ежедневно) дигидрохверцетина (50 мг/кг), *n*-тирозола (50 мг/кг) и пентоксифиллина (100 мг/кг) на распределение капилляров по диаметру в коре головного мозга крыс линии SHR в возрасте 12 недель.

Таблица 1. Плотность капиллярного русла в коре головного мозга крыс с АГ

Группа	Количество капилляров, шт/мм ²			
	0–3 мкм	3–5 мкм	5–7 мкм	7–9 мкм
WKY, n=10	23±4	103±9	29±4	2±1
Контроль SHR, n=10	41±4*	64±5*	10±1*	1±1*
Дигидрохверцетин, n=10	36±3	82±4 ⁺	20±3 ⁺	4±1 ⁺
<i>n</i> -Тирозол, n=10	38±3	84±4 ⁺	27±2 ⁺	4±1 ⁺
Пентоксифиллин, n=10	32±3	93±4 ⁺	22±2 ⁺	5±1 ⁺

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями в группе контроля WKY; ⁺ – $p < 0,05$ по сравнению со значениями в группе контроля SHR.

Капилляры диаметром менее 3 мкм непроходимы для эритроцитов. (Новицкий В.В., 2004), и формирование этой «патологической» структуры капиллярного русла может проявляться в расстройствах микроциркуляторного русла. У контрольных крыс линии SHR наблюдалось статистически значимое снижение локального мозгового кровотока в зрительной коре на 40% по сравнению с показателем у нормотензивных животных (таб. 2). Рарификация капилляров и нарушения микроциркуляции могут приводить к гипоксии мозговой ткани у крыс со спонтанной артериальной гипертензией (Бачманов А.А., 1991).

Таблица 2. Влияние курсового введения (6 недель, ежедневно) дигидрохверцетина (50 мг/кг), *n*-тирозола (50 мг/кг) и пентоксифиллина (100 мг/кг) на плотность капиллярного русла (штук/мм²) и локальный мозговой кровоток (ЛМК, ВРУ) в коре головного мозга крыс линии SHR в возрасте 12 недель

Группа	Плотность капиллярного русла	ЛМК
Контроль WKY, n=10	156±10	2878±361
Контроль SHR, n=10	117±7*	1736±205*
Дигидрохверцетин, n=10	142±6 ⁺	2865±334 ⁺
<i>n</i> -Тирозол, n=10	154±6 ⁺	2349±364
Пентоксифиллин, n=10	152±6 ⁺	3015±297 ⁺

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями в группе контроля WKY; ⁺ – $p < 0,05$ по сравнению со значениями в группе контроля SHR.

Курсовое введение крысам со спонтанной артериальной гипертензией дигидрохверцетина (50 мг/кг), *n*-тирозола (50 мг/кг), пентоксифиллина (100 мг/кг) приводило к статистически значимому увеличению плотности капиллярного русла на 21%, 32% и 30% соответственно по сравнению с показателем в контрольной группе SHR (таблица 2). Увеличение плотности капиллярного русла после курсового введения гемореологических средств происходило за счет повышения доли проходимых для эритроцитов капилляров. Введение дигидрохверцетина, *n*-тирозола и пентоксифиллина приводило к статистически значимому повышению капилляров диаметром 3–9 мкм у крыс с артериальной гипертензией (таблица 1). У крыс, получавших дигидрохверцетин и пентоксифиллин показатель локального мозгового кровотока статистически значимо превышал значения в контрольной группе SHR в 1,7 раз и достоверно не отличался от значения у нормотензивных животных (таблица 2). У крыс, получавших *n*-тирозол не выявлено статистически значимых различий по сравнению с контролем SHR, но вместе с тем отсутствовали статистически значимые различия и с группой нормотензивных животных (табл. 2).

Заключение. Таким образом, курсовое введение дигидрохверцетина (50 мг/кг), *n*-тирозола (50 мг/кг) и пентоксифиллина (100 мг/кг) крысам со спонтанной артериальной гипертензией приводило к нормализации структуры капиллярного русла и увеличению локального мозгового кровотока в коре головного мозга.

Литература

1. Бачманов А.А., Масленникова Л.С., Маркова Л.А. Изменения кислородного обмена при обучении активному избеганию у спонтанно гипертензивных и нормотензивных крыс. *Физиол журн. СССР им. И.М. Сеченова*. 1991;77(12):35–40.
2. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Издательство: Томск: ТГУ; 2004. 202 с.
3. Francois-Dainville E., Buchweitz E., Weiss H.R. Effect of hypoxia on percent of arteriolar and capillary beds perfused in the rat brain. *J. Appl. Physiol.* 1986;60(1):280–288.
4. Korbut R.A., Madej J., Adamek-Guzik T., Korbut R. Secretory dysfunction of vascular endothelium limits the effect of angiotensin converting enzyme inhibitor quinapril on aggregation of erythrocytes in experimental hypertension. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003;54(3):397–408.
5. Sloop G., Holsworth R.E., Weidman J.J., St Cyr J.A. The role of chronic hyperviscosity in vascular disease. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 2015;9(1):19–25. DOI: 10.1177 / 1753944714553226.
6. Williams B., Mancia G., Spiering W., et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018;39(33):3021–3104. DOI:10.1093/eurheartj/ehy339.

ВОЗМОЖНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ МЕКСИДОЛА В КОРРЕКТИРОВАНИИ ПАРАМЕТРОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛЬЮ НА ФОНЕ ХИМИОТЕРАПИИ ЛИПОСОМАЛЬНЫМИ ЦИТОСТАТИКАМИ

А.В. Сипров*, М.А. Соловьева

¹ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

e-mail: alek-s13@mail.ru

Ключевые слова: липосомы, мексидол, перекисное окисление липидов, цитостатики.

Введение. Известно, что активации оксидативных процессов в нормальных клетках органов и тканей отводится важная роль в развитии побочных и токсических эффектов противоопухолевых средств, особенно алкилирующих цитостатиков и антрациклиновых антибиотиков (Безбородова О.А. и др., 2013; Бурашова Е.В. и др., 2018; Гумерова К.С. и др., 2020). Средства с антиоксидантной активностью обладают способностью в разной степени снижать токсическое действие противоопухолевой химиотерапии в отношении нормальных клеток органов и тканей (Безбородова О.А. и др., 2013; Сипров А.В., Масягин В.А., 2015; Zhu B. et al., 2015), но при этом сохраняет актуальность изучения оптимизации применения таких средств с целью максимального усиления их цитопротективного воздействия.

Цель. Оценить преимущества липосомальной формы мексидола перед его свободной формой в корректировании содержания малонового диальдегида и активности каталазы в крови у крыс с карциномой Walker-256 на фоне терапии липосомальной комбинацией «доксорубин+циклофосфамид».

Материалы и методы. Исследования выполняли на 79 крысах-самках Вистар. Суспензию клеток карциномы Walker-256 (в количестве 1 млн) вводили под кожу хвоста или внутримышечно в 0,9% растворе натрия хлорида. Всех животных разделили на 8 групп: группа 1 (n=7): интактные крысы; группа 2 (n=12): крысы с трансплантированной опухолью Walker-256, не получавшие препаратов; группа 3 (n=10): крысы с опухолью, получавшие доксорубин и циклофосфамид (4 и 45 мг/кг соответственно) однократно внутривенно на 11-й день после трансплантации опухолевых клеток; группа 4 (n=10): крысы с опухолью, получавшие липосомальные доксорубин и циклофосфамид (4 и 45 мг/кг соответственно) однократно внутривенно на 11-й день после трансплантации опухолевых клеток; группы 5 и 6 (n=20): крысы с опухолью, получавшие липосомальные цитостатики и мексидол в дозе 25 мг/кг в свободной и липосомальной форме соответственно 5 дней внутривенно, начиная со дня применения цитостатиков; группы 7 и 8 (n=20): крысы с опухолью, получавшие липосомальные цитостатики и мексидол в дозе 50 мг/кг в свободной и липосомальной форме соответственно 5 дней внутривенно, начиная со дня применения цитостатиков. Липосомы с цитостатиками формировали гидратацией липидной пленки (из лецитина и холестерина с предварительно инкапсулированным циклофосфамидом) доксорубином с последующим экструдированием через поликарбонатные фильтры. Удаление не попавших в липосомы свободных фракций лекарств производили ультрафильтрацией под давлением инертного газа. Липосомальную форму мексидола создавали так же, используя в качестве гидратирующего раствора водные растворы препарата с концентрациями 25 мг/мл и 50 мг/мл. Оценку концентрации доксорубина, циклофосфамида и мексидола в липосомах проводили с использованием спектрофотометра Shimadzu (Япония). Концентрация доксорубина составила 1,86 мг/мл, циклофосфамида – 21,17 мг/мл, мексидола – 25 и 50 мг/мл (в зависимости от концентрации гидратирующего раствора). На 3 и 7 дни после химиотерапии под прикрытием тиопенталом натрия (50 мг/кг) животных (5-6 из каждой группы) выводили из опыта. В сыворотке крови определяли содержание малонового диальдегида (МДА) и активность каталазы рутинными методами. Результаты обрабатывали с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты. У крыс 2, 3, 4 групп уровень МДА превышал исходный показатель в интактной группе на 78%, 91% и 69% (p<0,01) соответственно на 3 день после химиотерапии, а на 7 день – на 63%, 52% и 49%

($p < 0,05$) соответственно (рис. 1). У крыс 6, 7, 8 групп содержание МДА в крови снижалось по сравнению с 4-ой группой (с липосомальными цитостатиками) на 29,5%, 35,5% и 42% ($p < 0,05$) соответственно на 3 день после химиотерапии, а на 7 день – только в 6 и 7 группах уровень МДА был ниже, чем в 4-ой группе, на 28% и 31% ($p < 0,05$) соответственно (рис. 1).

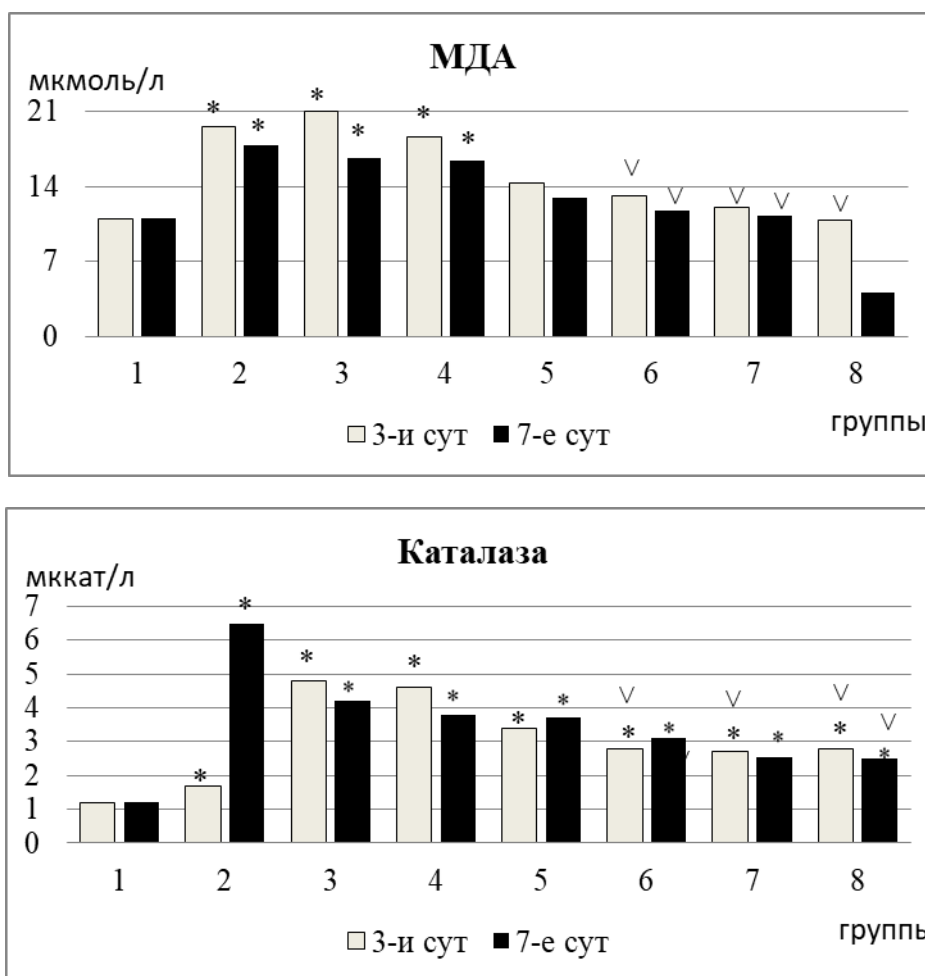


Рис. 1. Уровень малонового диальдегида и каталазы в сыворотке крови крыс с карциномой Walker-256 при использовании липосомальной формы мексидола на фоне терапии липосомальной комбинацией «доксорубин+циклофосфамид».

* - $p < 0,05$ по сравнению с интактными крысами; ∇ - $p < 0,05$ по сравнению с группой 4.

Активность каталазы достоверно превышала исходный показатель в интактной группе во всех экспериментальных группах как на 3, так и на 7 день после химиотерапии. Наиболее значительно активность каталазы возрастала в 3 и 4 группах – в 4 и 3,8 раза ($p < 0,001$) соответственно на 3 день после химиотерапии, а на 7 день – во 2 группе – в 5,4 раза ($p < 0,01$, рис. 1). При этом у крыс 6, 7, 8 групп активность каталазы была ниже, чем в группе 4, на 39%, 41% и 39% ($p < 0,05$) соответственно на 3 день после химиотерапии. На 7 день после химиотерапии лишь у крыс 8 группы активность каталазы оказалась ниже, чем в 4 группе, на 34,5% ($p < 0,05$).

Заключение. Липосомальная форма мексидола в дозе 25 мг/кг, в отличие от свободной формы в аналогичной дозе, снижает повышенный уровень малонового диальдегида в крови на фоне терапии липосомальной комбинацией «доксорубин+циклофосфамид» в течение всего периода исследования. Это сопровождается снижением и активности каталазы на 3 сутки после химиотерапии. Аналогичные изменения возникают при использовании свободной формы мексидола в дозе 50 мг/кг. Липосомальный мексидол в дозе 50 мг/кг в целом оказался сопоставим с его свободной формой в этой же дозе в корректировании содержания малонового диальдегида и активности каталазы у крыс в условиях проведенного эксперимента.

1. Литература

Безбородова О.А., Немцова Е.Р., Венедиктова Ю.Б., Якубовская Р.И., Александрова Л.Н., Коваленко А.Л. Экспериментальное изучение ремаксола как препарата поддерживающей терапии при традиционной и высокодозной химиотерапии опухоли. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2013;76(5):18–22. DOI: 10.30906/0869-2092-2013-76-5-18-22.

2. Бурнашева Е.В., Шатохин Ю.В., Снежко И.В., Мацуга А.А. Поражение почек при противоопухолевой терапии. *Нефрология*. 2018;22(5):17–24. DOI: 10.24884/1561-6274-2018-22-5-17-24.
3. Гумерова К.С., Сахаутдинова Г.М., Полякова И.М. Кардиоваскулярная токсичность, индуцированная применением противоопухолевых препаратов, и современные методы лечения опухолевых новообразований. *Креативная хирургия и онкология*. 2020;9(4):285–292. DOI: 10.24060/2076-3093-2019-9-4-285-292.
4. Сипров А.В., Масыгин В.А. Миелопротективная эффективность комбинации производных пиридина и 3-гидроксипиридина при антибластомной химиотерапии в эксперименте. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2015;11(3):258–262.
5. Zhu B., Zheng Y.F., Zhang Y.Y. Protective effect of L-carnitine in cyclophosphamide-induced germ cell apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2015;16(9):780–787. DOI:10.1631/jzus.B1500015.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И РЕПАРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ НОВОГО АНАЛОГА ТИМОГЕНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТРАВМЫ КОЖИ

М.Ю. Смахтин, Г.С. Маль, А.М. Смахтина*

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Курск, Россия

e-mail: smaxtina2012@yandex.ru

Ключевые слова: новый аналог тимогена, антиоксидантная активность, супероксиддисмутаза, репаративная регенерация кожных покровов, кожное повреждение.

Введение. Травматизм широко распространен среди всех слоев населения и до сих пор остается одной из важнейших медико-социальных проблем для всего мира. Поиск эффективных ранозаживляющих средств остается актуальным (Смахтин М.Ю. и др., 2019). Наиболее перспективным направлением являются исследования, направленные на изучение и усовершенствование действия пептидных биорегуляторов, эффективность которых уже была доказана, что сделало реальным их применение в клинической практике (Чердаков В.Ю. и др., 2013). Тимоген – иммуномодулятор, состоящий из L-конфигураций глутаминовой кислоты и триптофана; показан для комплексной терапии тяжелых травм различного генеза (механических, термических, химических, радиационных) (РЛС), что обусловило выбор препарата. Предположительно, введение D-аминокислот в молекулу пептида сможет пролонгировать его эффекты за счет защиты препарата от протеолитических ферментов и увеличения его полужизни (Бобынцев И.И. и др., 2015).

Цель. Изучение эффектов нового аналога тимогена, оказываемых в условиях кожных ран на репаративную регенерацию и первичное звено антиоксидантной защиты.

Материалы и методы. Эксперимент был проведен на базе НИИ Экспериментальной медицины Курского государственного медицинского университета. У 70 крыс Вистар моделировался раневой процесс на холке: были нанесены полнослойные кожные раны площадью 1 см². Моделирование патологического процесса проводилось под хлоралгидратным наркозом, дозировка которого составила 300 мг/кг. На протяжении 10 дней внутрибрюшинно вводились пептиды в эквиволярных дозовых режимах: тимоген в дозе 1 мкг/кг, его новый аналог, модифицированный D-Ala с C-конца пептида, – 1,2 мкг/кг массы тела лабораторного животного. Аналог был получен в Научно-исследовательском институте химии Санкт-Петербургского государственного университета. Крысы из группы контроля получали физиологический раствор в эквивалентном объеме. В крови экспериментальных животных спектрофотометрически измеряли уровень супероксиддисмутазы (СОД) на аппарате «Arel 330 PD» (Япония). В основе метода лежит ингибирование автоокисления кверцетина супероксиддисмутазой. За условную единицу принималась концентрация СОД, необходимая для снижения скорости аутоокисления кверцетина на 50 % (Бобынцев И.И. и др., 2015). Для гистологического исследования готовились срезы кожных покровов, которые фиксировали в формалине, затем обезвоживали и заливали в парафин. Срезы толщиной 7 – 10 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, после чего измеряли процентное соотношение фибробластов и лимфоцитов (на 100 клеток) на световом микроскопе Leica CME (Савостьянов Г.А., 2005). Статистическая обработка результатов проводилась путем расчета границ расхождения доверительных интервалов и непараметрического критерия Манна-Уитни. Проведенный эксперимент соответствует принципам гуманности, описанным в Хельсинской декларации. Исследование было одобрено Региональным этическим комитетом.

Результаты. Тимоген и его новый аналог, модифицированный D-аланином с C-конца пептида, сопоставимо увеличивали активность СОД ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля, где наблюдалось снижение антиоксидантной защиты, развившееся на фоне кожной травмы, что представлено на рисунке 1.

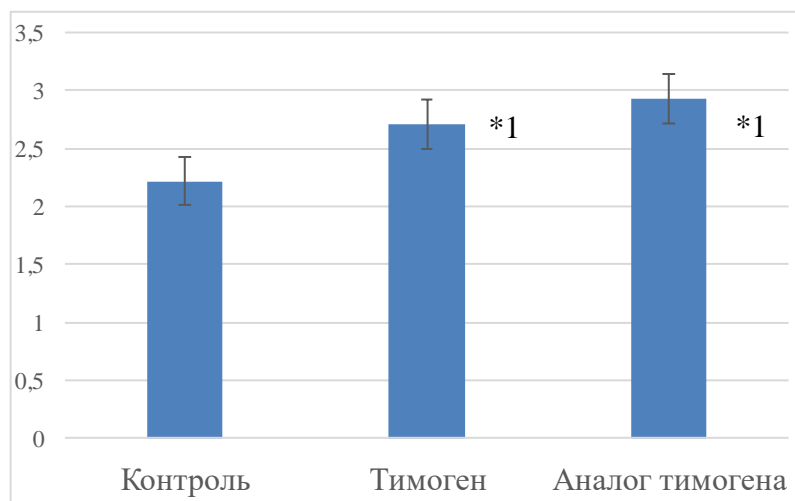


Рис. 1. Эффекты тимогена и его аналога на активность супероксиддисмутазы крови в условиях кожных ран (ус. ед.)

Гистологическое исследование показало, что тимоген и его аналог, модифицированный D-аланином с C-конца пептида, увеличивали количество лимфоцитов в сосочковом слое кожи, но достоверной разницы между препаратами установить не удалось (таблица 1). Это можно объяснить иммуномодулирующим воздействием пептидов в условиях сниженной иммунной функции, развившейся на фоне кожного повреждения. В отношении фибробластов было установлено индуцирующее влияние аналога тимогена (таблица 1). При этом достоверных отличий по данному показателю для оригинального препарата установить не удалось. Возможно это связано с увеличением лимфоцитов (в том числе и Т-хелперов), которые участвуют в пролиферации клеток и регенерации.

Таблица 1. Репаративные эффекты тимогена и его аналога в условиях кожной травмы

	Лимфоциты, %	Фибробласты, %
Контроль (NaCl)	20,7±1,2	29,3±1,2
Тимоген	25,4±1,6 ^{*1}	29,6±1,7
H2N-L-Glu-L-Trp-D-Ala-COOH	24,6±1,4 ^{*1}	34,7±1,5 ^{*1, 2}

Примечание. * – достоверность разницы ($p < 0,05$); цифра рядом – номер группы сравнения.

Заключение. Резюмируя проведенный эксперимент, можно сделать вывод, об увеличении репаративной активности пептида после введения в его молекулу D-аланина. При этом снижения эффективности по изучаемым показателям выявлено не было, что говорит о перспективности дальнейшего изучения данного лекарственного кандидата и о возможности расширения показаний к применению данного пептида.

Литература

1. Бобынцев И.И., Чернышёва О.И., Долгинцев М.Е., Смахтин М.Ю., Белых А.Е. Влияние пептида Gly-His-Lys и его аналогов на болевую чувствительность у мышей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015;78(1):13-15.
2. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопросы медицинской химии*. 1990;36(2):88-91.
3. Регистр лекарственных средств России (РЛС). Энциклопедия лекарств 2021. Выпуск 29. URL: https://www.rlsnet.ru/prep_index_id_611778.htm (дата обращения: 20.06.2021).
4. Савостьянов Г.А. Основы структурной гистологии. Пространственная организация эпителиев. Санкт-Петербург: Наука; 2005. 375 с.
5. Смахтин М.Ю., Фурман Ю.В., Чуланова А.А., Смахтина А.М. Иммунотропные и репаративные эффекты фактора роста клеток печени. *Российская наука и образование сегодня: проблемы и перспективы*. 2019;2(27):45-46.
6. Чердаков В.Ю., Смахтин М.Ю., Дубровин Г.М., Бобынцев И.И. Синергичное иммунотропное и репаративное действие тимогена, даларгина и регуляторного пептида GLY-HIS-LYS при экспериментальной травме кожи. *Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье»*. 2013;1:38-42.

ИММУНОТЕРАПИЯ В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ ОПЕРАБЕЛЬНОГО РАКА ЖЕЛУДКА: ОПЫТ РАБОТЫ УЧРЕЖДЕНИЯ

А.В. Августинovich*, С.Г. Афанасьев, Л.В. Спирина
¹НИИ онкологии, ФГБНУ ТНИМЦ РАН, г. Томск, Россия
e-mail: aov862@yandex.ru

Ключевые слова: рак желудка, иммунотерапия, комбинированное лечение.

Введение. В настоящее время рак желудка (РЖ) занимает одно из ведущих мест в структуре онкологических заболеваний и смертности в мире и России. Основной причиной неудовлетворительных отдалённых результатов оперативного вмешательства является наличие у пациентов субклинических гематогенных и лимфогенных метастазов уже к моменту начала лечения. В последние годы наибольшие перспективы в лекарственном лечении злокачественных опухолей связаны с углублением знаний о биологических особенностях опухоли, в первую очередь ее генетических характеристиках. Кроме того, в последние годы активно набирает обороты и лекарственное воздействие на так называемые иммунные контрольные точки (checkpoints) (PD-L1) при онкологических заболеваниях (Dolcetti R. et al., 2018; Sitarz R. et al., 2018).

Цель. Изучить эффективности иммунотерапии в комбинированном лечении больных операбельным РЖ.

Материал и методы. С 2020 года по настоящее время в ТНИМЦ НИИ онкологии проводится проспективное исследование. В него включено 8 пациентов с диагнозом: операбельный рак желудка. До начала терапии больным проведено комплексное обследование, включающее в себя: первичную диагностику, стадирование процесса, а также определение PD-L1-статуса. В данное исследование нами включены пациенты с положительным PD-L1-статусом (CPS>10). В настоящее время пациенты находятся на различных этапах комбинированного лечения. Четверо пациентов завершили лечение. Лечение проводилось по следующей схеме: восемь курсов предоперационной полихимиотерапии по схеме FLOT (доцетаксел в дозе 50 мг/м² внутривенно капельно, оксалиплатин в дозе 85 мг/м² внутривенно капельно, длительность инфузии 2 часа, лейковорин в дозе 200 мг/м² внутривенно капельно, длительность инфузии 2 часа, 5-фторурацил 2600 мг/м² в течение 48 часов с интервалом между курсами 14 дней). Повторный курс через 2 недели. Также всем пациентам вводился препарат пембролизумаб в дозе 400 мг 1 раз в 6 недель.

Результаты. Оценка эффективности терапии проводилась после 3, 6 и 8 курсов полихимиотерапии. У всех пациентов после третьего курса лечения зафиксирована регрессия опухолевого процесса. При проведении терапии нами не было отмечено выраженных побочных эффектов, которые бы потребовали ее отмену. Интервал между предоперационной терапией и операцией составил 3 недели. Четверем пациентам проведено оперативное лечение в объеме гастрэктомии. Послеоперационный период протекал без осложнений. Пациенты выписаны из стационара на 7-е сутки после операции. У трёх из них при плановом гистологическом исследовании операционного материала зафиксирован патоморфоз TRG1 по Mandard-полное отсутствие опухоли в макропрепарате. Четверо пациентов в настоящее время находятся на различных этапах комбинированного лечения.

Заключение. Таким образом, применение иммунотерапии при наличии позитивного PD-L1-статуса у больных операбельным раком желудка позволяет надеется на улучшение результатов лечения (возможно полной регрессии опухолевого процесса).

Литература

1. Dolcetti R., De Re V., Canzonieri V. Immunotherapy for Gastric Cancer: Time for a Personalized Approach? *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(6):1602.
2. Sitarz R., Skierucha M., Mielko J., Offerhaus G.J.A., Maciejewski R., Polkowski W.P. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Management and Research*. 2018;10:239–248.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ МУЖСКОЙ ВОСПРОИЗВОДЯЩЕЙ ФУНКЦИИ, ВЫЗВАННЫХ ЦИТОСТАТИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ

В.А. Григорьева*, Т.Г. Боровская
НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, г. Томск, Россия
e-mail: lgrig2@mail.ru

Ключевые слова: онкофертильность, цитостатическая химиотерапия, семенник, фармакологическая коррекция.

Введение. В результате совершенствования методов ранней диагностики и успехов в терапии целого ряда онкологических заболеваний, одним из критериев успешного лечения пациентов является сохранение

качества их жизни. Особый приоритет в этом плане занимает способность к деторождению, несостоятельность которой может нанести пациенту серьезную психологическую травму. Повреждение половых желез является закономерным следствием токсического действия цитостатических препаратов на активно пролиферирующую ткань. В настоящее время к числу эффективных способов сохранения способности к деторождению у мужчин относятся криоконсервация сперматозоидов и тестикулярной ткани. Однако, эти способы инвазивны, дороги, технически сложны. В связи с этим, ведется поиск альтернативных путей преодоления такого нежелательного последствия химиотерапии. К их числу принадлежит использование фармакотерапии (Demarko R.S., Jones D.L., 2021). Главная трудность для сохранения мужской репродуктивной функции – это защита стволовых сперматогониальных клеток и стимуляция их пролиферативной активности. Поиск таких путей основывается на информации об условиях функционирования ССК. В настоящее время показано, что одним из путей, отвечающих за пролиферацию ССК, является сигнальный путь Jak-STAT. К числу средств, осуществляющих воздействие через этот путь, относятся плеiotропный цитокин Г-КСФ и его пегелированная форма (Kotzur T. et al., 2017). Кроме того, показано, что пролиферация ССК может быть усилена посредством антиоксидантного воздействия Demarko R.S., Jones D.L., 2021). Известно, что тестикулярная ткань чувствительна к антиоксидантам фенольной природы. К их числу принадлежит полифенольный антиоксидант пара-тирозол. Важным является тот факт, что отмеченные выше средства коррекции не противопоказаны для пациентов, имеющих в анамнезе онкологическую патологию.

Цель. Целью данной работы явилось экспериментальное изучение эффективности использования Г-КСФ, ПЕГ-ГКСФ и пара-тирозола для восстановления сперматогенеза, угнетение которого обусловлено цитостатическим воздействием на ССК.

Материалы и методы Эксперименты проведены на аутбредных крысах-самцах линии Вистар (n=40) репродуктивного возраста (2,5 мес). Повреждение стволовых сперматогоний моделировали однократным внутривенным введением в максимально переносимой дозе цитостатического препарата паклитаксел (Митотакс, Dr. Reddy's, Индия) (Боровская Т.Г. и др., 2015). В качестве стимуляторов регенерации сперматогенной ткани были выбраны Г-КСФ (Нейпоген, F.Hoffmann-La Roche, Швейцария), ПЕГ-ГКСФ (Саентифик фьючер менеджмент) и антиоксидант пара-тирозол. Г-КСФ и ПЕГ-ГКСФ вводили крысам-самцам в течение 5 дней, 1 раз в день подкожно в дозе 100 мкг/кг на следующий день после введения цитостатического препарата. Пара-тирозол вводили в дозе 7,6 мг/кг в течение 5 дней до, и 5 дней после цитостатического воздействия. Эффективность лекарственных средств оценивали по показателям численности клеточной популяции сперматогоний, количеству клеток микроокружения, степени зрелости сперматогенного пласта (Сухоруков В.С., Шамшад Д.Е., 1989) и общему количеству половых клеток (ОКС). Состояние воспроизводящей функции у животных изучалось в сроки, соответствующие проявлению воздействия на пролиферативный пул, – через 90 суток после введения препаратов. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты. В семенниках крыс, получавших паклитаксел и Г-КСФ, количество сперматогоний превосходило таковое в контроле на 35%. Степень зрелости сперматогенного пласта была снижена, что свидетельствует о наличии репаративной регенерации, которая, судя по количеству клеток Сертоли, оказалась эффективной. Это подтверждает и значение ОКС, превысившее контрольную группу на 55%. В семенниках крыс, получавших паклитаксел и ПЕГ-КСФ, наблюдалась высокая численность клеточной популяции сперматогоний, которая превышала контрольные значения на 38% и достигала показателей фона. При подсчете продуктивности сперматогенеза, было установлено, что ОКС на фоне введения ПЕГ-ГКСФ достоверно превышало в 2,3 раза контрольные значения, в 1,3 раза фоновые и в 1,4 раза значения Г-КСФ. Таким образом, эффективность пегелированной формы Г-КСФ оказалась более высокой, что может быть связано с ее лучшей биодоступностью. Через 90 суток после сочетанного введения паклитаксела и пара-тирозола численность клеточной популяции сперматогоний статистически значимо превышала таковую в контрольной группе. Статистически значимо по сравнению с контролем возрастало ОКС. Степень зрелости сперматогенного пласта снижалась по сравнению с контрольными и фоновыми значениями. Количество клеток Сертоли превышало контрольные значения и не отличалось от фона, что позволяет говорить об эффективной репаративной регенерации ткани.

Заключение. Исследованные фармакологические препараты – Г-КСФ (100мкг/кг), ПЕГ-ГКСФ (100мкг/кг), пара-тирозол (7,6 мг/кг) являются эффективными средствами восстановления сперматогенеза, угнетение которого обусловлено цитостатическим воздействием на ССК.

Литература

1. Боровская Т.Г., Дыгай А.М., Чайковский А.В., Жданов В.В., Зюзьков Г.Н., Ставрова Л.А., Удуд В.В., Мирошниченко Л.А., Симанина Е.В., Полуэктова М.Е. Реакции сперматогенной ткани и механизмы их развития при цитостатическом воздействии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015;159(6):716-719.
2. Сухоруков В.С., Шамшад Д.Е. Определение степени зрелости сперматогенного пласта крысы при его регенерации и в процессе созревания интактного семенника. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1989;9:89– 91.

- Demarko R.S., Jones D.L. Redox signaling as a modulator of germline stem cell behavior: Implications for regenerative medicine. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021;166:67-72.
- Kotzur T., Benavides-Garcia R., Mecklenburg J., Sanchez J. R., Reilly M., Hermann B.P. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) promotes spermatogenic regeneration from surviving spermatogonia after high-dose alkylating chemotherapy. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017;15:7.

ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ: СВЯЗЬ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ

М.К. Ибрагимова*, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков
 НИИ онкологии ФГБНУ ТНИМЦ РАН, г. Томск, Россия
 e-mail: imk1805@yandex.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, полнотранскриптомный микроматричный анализ, гематогенное метастазирование.

Введение. На сегодняшний день в литературе крайне малочисленны данные по сравнению экспрессионного профиля пациенток с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) в процессе проведения предоперационного лечения. Как правило, исследования в данном направлении затрагивают именно молекулярное профилирование опухоли в процессе лечения. Так, в работе Loibl S. методом NGS проведено комплексное исследование молекулярных событий при РМЖ (n=851), оценена значимость геномных изменений для ответа на неоадьювантную химиотерапию (НХТ). Показано, что наиболее распространенными геномными изменениями в процессе НХТ были мутации *TP53* (38,4%), *PIK3CA* (21,5%) и 8 амплификаций (*TOP2A* 34,9%; *ERBB2* 30,6%; *ZNF703* 30,1%; *TP53* 21,9%; *PIK3CA* 24,1%; *CCND1* 17,7%; *PAK1* 14,9%; *FGFR* 12,6%) (Loibl S. et al., 2019).

Цель. Целью представленного исследования явилось проведение полнотранскриптомного анализа опухоли молочной железы в процессе НХТ в зависимости от статуса гематогенного метастазирования.

Материал и методы. В исследование включены 60 больных РМЖ T1-4 N0-2 M0 (IIA–IIIB стадии) люминального В подтипа, в возрасте 22–68 лет (46,2±0,4). Пациенты получали 4-8 курсов системной НХТ по схеме FAC, AC, CAX, CP, АСТ и АТ. Материалом служили парные образцы биопсийного (до лечения) и операционного материала (после НХТ) для каждого из пациентов. РНК из исследуемого материала выделялась набором RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипах Clarion™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA). Анализ данных осуществлялся при помощи программы Transcriptome Analysis Console (ТАС) software 4.0 **Результаты.** Проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения НХТ. Было показано, что количество дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в опухоли до лечения у больных с наличием и без гематогенного метастазирования составило 24 гена (19 Up-regulated, 5 Down-regulated). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с наличием и без гематогенного метастазирования различались по 154 ДЭГ (36 Up-regulated, 118 Down-regulated) (рис. 1а, б).

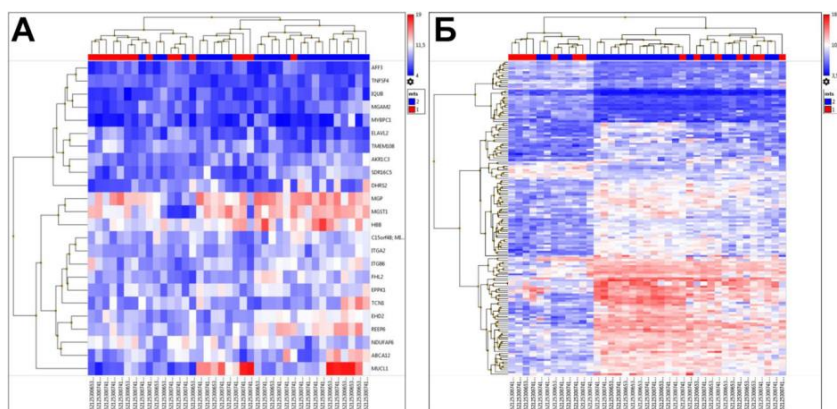


Рис. 1. Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ: а – до лечения с наличием (есть – 1) и отсутствием гематогенного метастазирования (нет – 2), б - после НХТ с наличием (есть – 1) и отсутствием гематогенного метастазирования (нет – 2)

Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются по 1 гену – *EHD2* (19q13.33). *EHD2* признан прогностическим параметром для плоскоклеточного рака пищевода – экспрессия данного гена вовлечена в его патогенез (Li M. et al., 2013), и может рассматриваться в качестве фактора прогрессирования для пациентов с РМЖ – он является негативным регулятором миграции и инвазии в клетках РМЖ (Yang X. et al., 2015).

Заключение. Проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии. Полученные результаты могут являться платформой как для персонализированного подхода в профилактике отдаленного метастазирования при раке молочной железы, так и при назначении предоперационной химиотерапии.

Работа выполнена в рамках конкурса 2021-2023 года на получение стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам.

Литература

1. Li M., Yang X., Zhang J., et al. Effects of EHD2 interference on migration of esophageal squamous cell carcinoma. *Medical Oncology*. 2013;30(1):396.
2. Loibl S., Treue D., Budczies J. Mutational diversity and therapy response in breast cancer—a sequencing analysis in the neoadjuvant GeparSepto trial. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(13):3986-3995.
3. Yang X., Ren H., Yao L., et al. Role of EHD2 in migration and invasion of human breast cancer cells. *Tumor Biology*. 2015;36(5):3717-3726.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ КОСТНОГО МОЗГА И СИСТЕМУ КРОВИ

О.В. Неупокоева*, Е.П. Федорова, М.В. Филонова, О.Л. Воронова, А.А. Чурин

НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберг Томского НИМЦ РАН

, г. Томск, Россия

e-mail: repaov@mail.ru

Ключевые слова: генотоксичность, гематология, флавоноиды, фурукумарины, цисплатин. **Введение.** Противоопухолевые препараты обладают высокой токсичностью и выраженными побочными эффектами. Свое терапевтическое воздействие они оказывают за счет генотоксического влияния на активно делящиеся клетки новообразований. Патогенетическая значимость генотоксических поражений генома цитостатиками сводится к индукции соматических мутаций и выявлению их роли в развитии канцерогенеза. В практических рекомендациях по лечению немелкоклеточного рака легкого 2020 в многие схемы включен цисплатин или карбоплатин, препараты платины составляют «золотой стандарт» химиотерапии рака яичников. Международное агентство по изучению рака (МАИР) классифицирует цисплатин как вещество канцерогенного риска 2А (Белицкий Г.А., 2020). В клинко-эпидемиологических исследованиях установлена взаимосвязь между применением цитостатических препаратов и возникновением вторичных опухолей у пролеченных пациентов. Препараты платины образуют аддукты, способные обнаруживаться в различных тканях человека до 10 лет после окончания курса лечения, а также вызывают мутации в стволовых клетках и опухоли у животных (Gietema J.A. et al., 2000; Проданчук Н.Г., 2010). Генетические структуры, вне всякого сомнения, необходимо защищать от повреждения цитостатиками. Добиться избирательного защитного действия на нормальные клетки является трудной задачей, так как наряду с меньшим повреждением цитостатиками ДНК может снижаться противоопухолевая эффективность препаратов. В нашем исследовании на цисплатин-индуцированной модели гено- и гематотоксичности изучали возможность защиты наследственного материала клеток костного мозга и системы крови, как наиболее остро реагирующей системы на токсические воздействия и являющейся лимитирующей при лечении цитостатиками. Для коррекции нежелательных последствий противоопухолевой химиотерапии были использованы препараты, полученные биотехнологическим путем. В качестве агентов защитного воздействия, большой интерес вызывают флавоноиды шлемника байкальского *Scutellaria baicalensis* Georgi (культура hairy root) и фурукумарины (ФК), полученные из культуры клеток болиголова пятнистого (*Copium maculatum* L.). Таким образом, цель данного исследования - изучить возможность применения экстракта трансформированных корней шлемника байкальского (ЭШБ) и экстракта ФК для коррекции гено- и гематотоксичности цисплатина.

Материалы и методы. Эксперименты были проведены на 100 самцах и самках мышей линии СВА и 100 мышак-самках линии CD1 массой 18-25 г. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Содержание животных и дизайн экспериментов были одобрены Комиссией по биоэтике НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Цисплатин (Cisplatin-LANS, Россия) вводили мышам однократно внутрибрюшинно в максимально переносимой дозе (МПД) 10 мг/кг. ЭШБ вводили внутривентрикулярно однократно в дозе 200 мг/кг и 5-дневным курсом в дозе 40 мг/кг. Материал для получения экстракта был предоставлен к.б.н. Кузовкиной И.Н., Институт физиологии растений РАН г. Москва. Экстракт ФК получен методом, изложенным в патенте РФ № 2713118. Качественный состав ФК определяли с помощью масс-спектрометрии и тонкослойной хроматографии, количественное содержание и чистоту определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. ФК вводили мышам внутривентрикулярно однократно и курсом в дозе 30 мг/кг в крахмальной взвеси. Для оценки цитогенетических нарушений исследовали состояние хромосом метафазных пластинок костного мозга по модифицированному методу Форда

(Миронов А.Н., 2012). В тест-системе соматического мозаицизма (Миронов А.Н., 2012), использовали селектированную мутантную линию самцов *D. melanogaster* генотипа wsp^3/Y (w – white – белая окраска глаз, sp^3 – singed – извитая, скрученная форма щетинок) и мутантную линию самок генотипа yellow (желтая окраска тела и щетинок), полученные с кафедры цитологии и генетики Биологического Института НИ ТГУ, г. Томск. ЭШБ вводился в дозе 200 мг/кг в питательную среду, а ФК в дозе 150 мг/кг. В случае возникновения генетических нарушений у самок дрозофил регистрировали мутантные пятна и щетинки фенотипа yellow или singed. Значимость различий для показателя частоты появления самок с мутациями при статистической обработке данных оценивали по критерию χ^2 с поправкой Йейтса. Уровень значимости критериев задавали равным 1% и 5% (Трухачева Н.В., 2012). В периферической крови определяли содержание эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, концентрацию гемоглобина и гематокритное число, используя автоматический гематологический анализатор Mythic18(vet) (EU). Комбинированную окраску препаратов периферической крови проводили фиксатором-красителем Май-Грюнвальда и азур II-эозином по Нохту. Контрольным животным в эквивалентном объеме вводили физиологический раствор. Статистический анализ проводился программой StatPlus 2009. Использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты. На начальном этапе исследования была проведена оценка мутагенных свойств ЭШБ и ФК *in vivo* в тесте учета хромосомных aberrаций у млекопитающих и на *D. melanogaster*. Генотоксикологическое исследование не выявило у изученных растительных экстрактов кластогенного действия на хромосомы мышей ни при однократном, ни при курсовом применении. Кроме того, их использование не индуцировало появления мутантных пятен у самок *D. melanogaster*, по сравнению с таковыми в контроле. Применение цисплатина в качестве повреждающего агента на генетические структуры оказало выраженный генотоксический эффект как на хромосомы мышей, так и на *D. melanogaster*. Так, через 24 ч после однократного внутрибрюшинного введения цисплатина в метафазных пластиках костного мозга мышей было выявлено 24,2% поврежденных клеток и 37,0% aberrантных хромосом. Среди нарушений были зафиксированы одиночные, парные фрагменты и обмены. У *D. melanogaster* цисплатин индуцировал разрывы хромосом, что способствовало интенсивному обмену их участками и появлению на теле самок пятен фенотипа yellow или singed. Так, в контроле рекомбинантных самок выявлено 0,3%, а в эксперименте с добавлением в питательную среду цисплатина 7,7% ($\chi^2=54,5$). В периферической крови после однократного применения цисплатина отмечалось снижение количества лейкоцитов с 2 по 15 сутки за счет понижения числа лимфоцитов в этот же период относительно контрольных значений. Содержание сегментоядерных гранулоцитов было ниже контрольных величин на 2, 5 и 15 сутки в сравнении со значениями контрольной группы. Одним из механизмов развития цитопении в периферической крови является индукция окислительного стресса в нормальных клетках, в том числе и в клетках костного мозга, образующиеся в результате активные формы кислорода способны повреждать мембраны клеток, наследственный материал, индуцировать апоптоз и приводить к гибели клеток (Lin S.H. et al., 2020). Целесообразным является применение препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами. При однократном ведении ЭШБ и последующей инъекции цисплатина мышам-самцам доля поврежденных метафаз снизилась на 50,4%, а количество aberrантных хромосом на 57,8% по сравнению с группой цитостатика. Курсовое применение ЭШБ было сопоставимо с однократным введением. Флавоноиды ЭШБ препятствуют взаимодействию свободных радикалов с генетическими структурами, выводят их из клетки, проявляя тем самым защитное действие (Gao Z. et al., 2001; Gonzalez R. et al., 2010). Снижение числа aberrаций, в данном случае, возможно, связано с изменением уровня генерируемых цитостатиком АФК. Применение ЭШБ оказывало выраженный генопротекторный эффект на фоне повреждающего действия цисплатина у *D. melanogaster*. Количество рекомбинантных самок снизилось в 1,7 раза, по сравнению с экспериментальной группой цисплатина, достигнув 4,7% ($\chi^2=6,68$). Сочетанное применение цисплатина и ФК через 24 часа не оказало защитного действия на хромосомы клеток костного мозга, но и не увеличивало повреждающее действие цитостатика. Курсовое использование ФК, после однократной инъекции цисплатина в 4,5 раза снижало количество поврежденных клеток и в 4 раза количество aberrантных хромосом. В периферической крови при введении ФК на фоне действия цисплатина выявлено повышение количества лейкоцитов на протяжении всего периода исследования за счет увеличения числа сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. Так, содержание нейтрофильных гранулоцитов у животных, получавших ФК, было выше значений животных, получавших цисплатин на 7 и 15 сутки на 26,8% и 28,4 %. Количество лимфоцитов повышалось на этих же сроках исследования. Выявлено увеличение содержания эритроцитов с 7 по 20 сутки исследования в сравнении с группой животных, получавших цисплатин. Таким образом, применение ЭШБ снижает кластогенное действие цисплатина на структуры наследственности клеток костного мозга мышей и *D. melanogaster*. Использование ФК имеет выраженный антимуtagenный эффект при курсовом применении. Выявлена нормализация количества aberrантных клеток в костном мозге на цисплатиновой модели генотоксичности после 4 кратного применения ФК. Вероятно, ФК обладает апоптоз-индуцирующим действием, aberrантные клетки активно элиминируются на ранних сроках исследования (Еремина Н.В., 2021). Таким образом, процесс элиминации дефектных клеток будет стимулировать регенерацию костного мозга, что в свою очередь приведет к положительным изменениям в периферической крови. Этот факт продемонстрирован в нашем исследовании. Так, в периферической крови

отмечалось повышение количества лейкоцитов за счет повышения числа зрелых нейтрофилов и лимфоцитов, а также увеличение содержания эритроцитов.

Литература

1. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовская Е.А. Лекарственный канцерогенез: факторы риска и возможности предотвращения. *Успехи биологической химии*. 2020;60:173-226.
2. Еремина Н.В., Жанатаев А.К., Дурнев А.Д. Индуцируемая клеточная гибель как возможный путь антимуtagenного воздействия. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021;171(1):4-22.
3. Проданчук Н.Г. Токсическое воздействие ксенобиотиков на стволовые клетки как фактор риска развития общесоматической и онкологической патологии. *Современные проблемы токсикологии*. 2010;1:17-41.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под общей редакцией Миронова А.Н. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
5. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica: книга для студентов, аспирантов и преподавателей медицинских колледжей и вузов. М., 2012.
6. Gao Z., Huang H., Xu H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria Baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. *Pharmacological Research*. 2001;43(2):173-178
7. Gietema J.A., Meinardi M.T., Messerschmidt J., Gelevert T., Alt F., Uges D.R., Sleijfer D.T. Circulating plasma platinum more than 10 years after cisplatin treatment for testicular cancer. *Lancet*. 2000;355:1075–1076.
8. Gonzalez R., Ballester I., López-Posadas R., Suárez M.D., Zarzuelo A., Martínez-Augustin O., Sánchez de Medina F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011;51:331–362.
9. Lin S.H., Li M.H., Chuang K.A. Chlorella sorokiniana Extract Prevents Cisplatin-Induced Myelotoxicity In Vitro and In Vivo. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020: 14. doi.org/10.1155/2020/7353618

КОРРЕКЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА ЭРИТРОПОЭЗ ЖИВОТНЫХ С КАРЦИНОМОЙ ЛЁГКИХ ЛЬЮИС С ПОМОЩЬЮ АНТОЦИАНСОДЕРЖАЩЕГО КОМПЛЕКСА ИЗ *SORBUS AUCUPARIA L.*

О.Ю. Рыбалкина^{1*}, Е.Ф. Федорова¹, А.В. Чайковский¹, Т.Г. Разина¹, Г.И. Калинин²,
Н.В. Исайкина², В.В. Жданов¹

¹НИИФурМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, г. Томск, Россия,

²ФГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия
e-mail: olgotomsk87@gmail.com

Ключевые слова: антоцианы, эритропоэз, карцинома лёгких Льюис.

Введение. В настоящее время в клинической онкологии применяется широкий спектр цитостатических препаратов, отличающихся как по химическому строению, так и по механизму действия на опухолевые клетки. Несмотря на высокую противоопухолевую активность, цитостатики обладают рядом побочных действий, среди которых отдельное место занимает угнетение эритроидного ростка кроветворения (Iwamoto T., 2013). Значительное подавление эритропоэза может приводить к осложнению течения основного заболевания: нарушается структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов, меняются микрореологические свойства крови, уменьшаются различные эритроидные показатели, что, в конечном итоге, приводит к развитию локальной гипоксии и ухудшению общего состояния таких пациентов (Новик А.В., 2009). В связи с этим, проблема снижения токсических эффектов, в том числе в отношении эритрона, а также повышения эффективности химиотерапии продолжает оставаться актуальной и привлекает большое внимание онкологов-экспериментаторов. Одним из возможных вариантов коррекции анемического синдрома, индуцированного цитостатиками, является применение препаратов на основе природных соединений, которые, в отличие от химически синтезированных, используемых для базовой терапии, малотоксичны, обладают высокой биодоступностью и широким спектром фармакологической активности (Mishra V.B., Tiwari V.K., 2011). Перспективными в этом плане могут быть антоцианосодержащие растения из рода *Sorbus*, в частности, *Sorbus aucuparia L.* Доказаны противовоспалительный, антиоксидантный, нейропротекторный и другие эффекты антоцианов (Gezici S., Şekeroğlu N., 2019).

Цель. Изучить влияние антоцианосодержащего комплекса из *S. aucuparia L.* на доксорубицин-индуцированный анемический синдром у мышей с карциномой лёгких Льюис.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 122 конвенциональных мышах-самках линии C57Bl/6 (массой 20-21 г в возрасте 3 мес.) 1-й категории (сертификат качества № 188-05), полученных из отдела

экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (Томский НИМЦ). Карциному лёгких Льюис (LLC) перевивали внутримышечно по 1×10^6 клеток в 0,1 мл физиологического раствора (Софьина З.П., 1980). Моделью угнетения эритроидного ростка кроветворения явилась цитостатическая миелосупрессия, вызванная введением животным однократно внутрибрюшинно доксорубицина в дозе 6 мг/кг на 10 сут после перевивки LLC. Антоциансодержащий комплекс деалкоголизировали на водяной бане, довели до прежнего объёма дистиллированной водой и вводили мышам внутрибрюшинно в дозе 5 мл/кг ежедневно в течение 9 сут, начиная через 24 часа после инъекции доксорубицина. Содержание антоцианов в 5 мл растительного комплекса на 95% этаноле в расчёте на сухой остаток составляет 165 мг. Показатели периферической крови (эритроциты, гемоглобин, гематокрит) определяли на 3, 5, 7, 10 сут после введения доксорубицина мышам с опухолью (что соответствует 13, 15, 17, 20 сут после перевивки), а также у животных интактного контроля с помощью гематологического анализатора «Muchic 18vet» (Cormay, Франция). На эти сроки эксперимента исследовали мазки для подсчёта ретикулоцитов и клеток костного мозга, полученные стандартными гематологическими методами (Гольдберг Е.Д., 1992). Показатели клональной активности (КОЕ-Э, КлОЕ-Э) определяли на 3, 5, 10 сут после введения цитостатика. На 20 сут мышей выводили из эксперимента путём дислокации шейного отдела позвоночника, определяя массу первичной опухоли, подсчитывая количество и площадь метастазов в лёгких, вычисляя торможение роста опухоли (ТРО), частоту метастазирования и индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) в процентах (Софьина З.П., 1980). Обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона-Манна-Уитни (U) и углового преобразования Фишера (ϕ) (*Microsoft Excel* (2007) и *SPSS Statistics 17.0* (IBM, США)).

Результаты. Как показало проведенное исследование, на фоне развития опухолевого процесса у мышей с LLC наблюдалось угнетение эритроидного ростка кроветворения, следствием чего явилась анемия. Так, снижение общего количества эритроцитов отмечалось с 13 сут и сохранялось до 20 сут эксперимента. При анализе миелограмм на 20 сут обнаружено снижение количества эритроидных клеток в 2,0 раза относительно соответствующего показателя у здоровых животных. В этот же срок эксперимента в периферической крови мышей с опухолью отмечено также достоверное уменьшение количества эритроцитов (в 1,6 раза). Кроме того, на 17, 20 сут эксперимента наблюдалось достоверное снижение количества ретикулоцитов (в 1,4 и 2,6 раза, соответственно, относительно этого показателя у здоровых животных). Введение доксорубицина привело к углублению депрессии костномозгового кроветворения, в основном за счёт снижения числа клеток эритроидного ростка. Так, на 3, 5, 10 сут после введения цитостатика наблюдалось достоверное уменьшение количества эритроидных клеток в костном мозге в 1,8; 1,6; 1,2 раза соответственно относительно этого показателя у мышей контрольной группы. Анализ периферической крови у животных с опухолью, получавших только цитостатик, показал развитие ретикулоцитопении (3-7 сут после введения доксорубицина), с последующим восстановлением содержания ретикулоцитов к 10 сут исследования. На 3, 5 сут после инъекции доксорубицина количество эритроцитов в периферической крови у животных группы монокимиотерапии оставалось достоверно ниже значений у мышей контроля. Развитие гипоплазии костномозгового кроветворения мышей с опухолью, получавших доксорубицин, сопровождалось выраженными изменениями колоние- и кластерообразующей способности костного мозга. Так, при изучении количества клеток-предшественников эритропоэза в костном мозге мышей с карциномой лёгких Льюис, получавших доксорубицин, выявлено достоверное увеличение уровня КлОЕ-Э и КОЕ-Э на 5 сут после инъекции цитостатика. Начиная с 10 сут, наблюдалось их снижение: КлОЕ-Э - в 2,9 раз ($P < 0,01$) и КОЕ-Э - 1,8 раза ($P < 0,05$) относительно этих показателей у контрольных животных соответственно. Курсовое применение антоциансодержащего комплекса из *S. aucuparia L.* в дозе 5 мл/кг оказало стимулирующий эффект на процесс эритропоэза. Так, на протяжении всего эксперимента отмечена более высокая клеточность костного мозга по сравнению с таковой у животных группы монокимиотерапии. Содержание эритроидных клеток в костном мозге мышей, получавших растительный препарат, на 3, 5, 10 сут превосходило эти значения у мышей группы монокимиотерапии, достигая максимума на 10 сут эксперимента (в 1,6 раза, $P < 0,01$). Кроме того, в аналогичные сроки эксперимента после инъекции цитостатика количество ретикулоцитов у мышей, получавших растительный комплекс, оказалось выше в 1,5 ($P < 0,05$), 1,4 ($P < 0,01$) и 1,3 ($P < 0,01$) раза соответственно относительно такового у животных группы монокимиотерапии. Отмечено достоверное увеличение содержания общего количества эритроцитов в периферической крови животных относительно этих показателей у мышей, получавших только доксорубицин. При оценке колоние- и кластерообразующей способности клеток костного мозга, наблюдалось увеличение выхода КОЕ-Э в 5,4 и 3,2 раза на 3 и 10 сут после введения доксорубицина. Кроме того, стимулирующее действие растительного комплекса в отношении КлОЕ-Э в костном мозге мышей с опухолью отмечено на 10 сут после инъекции цитостатика. При изучении влияния антоциансодержащего комплекса на эффективность проводимой химиотерапии показано, что его назначение не изменило ингибирующего влияния цитостатика на рост первичной опухоли, однако существенно повысило противометастатическое действие доксорубицина, что выражалось в достоверном уменьшении количества (в 4,8 раза) и площади метастазов в лёгких (в 16,4 раза) по сравнению с этими показателями у получавших монокимиотерапию животных.

Заключение. Таким образом, при гемодепрессии, вызванной введением доксорубицина, использование антоциансодержащего комплекса из *S. aucuparia L.* приводит к стимуляции эритроидного ростка

крововетворения в костном мозге мышей с LLC, в результате чего наблюдается увеличение количества ретикулоцитов и эритроцитов в периферической крови. Кроме того, показано существенное повышение противометастатического действия доксорубина при его совместном использовании с растительным комплексом. Совокупность полученных результатов позволяет говорить о том, что антоцианосодержащий комплекс из *S. aucuparia* L. является перспективным сырьевым источником для создания препарата-корректора, снижающего риск развития анемического синдрома, вызванного химиотерапией у пациентов со злокачественными новообразованиями.

Литература

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во Томского Университета. 1992. 264 с.
2. Новик А.В. Анемия и метаболические расстройства у онкологических больных. *Практическая онкология*. 2009;10(3):131-139.
3. Софьина З.П., Сыркин А.Б., Голдин А., Кляйн А. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. М.; 1980. 296 с.
4. Gezici S., Şekeroğlu N. Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2019;19(1):101-111.
5. Iwamoto T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2013;36(5):715-718.
6. Mishra B.B., Tiwari V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;46: 4769-807. doi: 10.1016 / j.ejmech.2011.07.057

ИССЛЕДОВАНИЯ РАДИОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ СОЛЕЙ ЛИТИЯ НА МОДЕЛИ ОПУХОЛЕВОЙ КУЛЬТУРЫ

М.С. Третьякова*, М.Н. Аникин, Е.В. Плотников

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия

e-mail: trremer@mail.ru

Ключевые слова: Радиосенсибилизация, лучевая терапия, соли лития, нейтронное облучение

Введение. На сегодняшний день онкозаболевания являются одной из основных причин смертности в России. Современная лучевая терапия является широко распространённым методом лечения онкологических заболеваний. Повышение эффективности лучевой терапии злокачественных новообразований, равно как и снижение побочных эффектов могут достигаться применением радиомодулирующих препаратов. Поиск и изучение таких соединений представляется актуальной задачей, а требования к ним достаточно жесткие, и как правило, включают низкую токсичность, усиление повреждающего действия ионизирующего излучения на раковые клетки и защита здоровых тканей от повреждения, улучшение восстановления организма после лучевого воздействия и т.п. Определенный интерес в этом контексте представляют литиевые соли аскорбиновой кислоты и ее производных. Имеющаяся экспериментальная информация и литературные данные позволяют предполагать у данных солей лития набор свойств и биологических эффектов, которые перспективны при сочетанном применении в лучевой терапии опухолей. Фармакологические препараты на основе солей лития многие десятилетия успешно используются в психиатрии для лечения биполярных расстройств, поэтому хорошо изучены побочные действия данных препаратов, токсичность и установлена терапевтическая доза. В течение последних лет в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo* были получены данные, свидетельствующие о наличии у ионов лития широкого спектра положительных эффектов, в том числе нейро-, кардио- и нефро-, радиопротекторных свойств, регуляция функций стволовых клеток, регуляция воспаления и др. (Plotnikov E.V. et al., 2014; Лосенков И.С. и др., 2020).

Цель. Целью данной работы являлось изучение радиосенсибилизирующее действие аскорбата лития на модели опухоли *in vitro* - SKOV-3 (рак яичника) в условиях смешанного нейтронного и гамма излучения.

Материалы и методы. Аскорбат исследовали в виде водного раствора в диапазоне концентраций 1,8-0,3 мМ по иону лития. В качестве препарата сравнения использовался радиосенсибилизатор, применяющийся в медицине - метронидазол. SKOV-3 выращивали в стандартных условиях в среде DMEM/F-12 (Gibco) и инкубировали при 37 °С в атмосфере CO₂ (5 %). Клетки засеивали в 96-луночный планшет в количестве 3000 клеток на лунку. После 24 часов инкубации к культурам клеток было добавлено тестируемое вещество в различных концентрациях 1,8 мМ - 0,3 мМ. Далее на клеточную культуру воздействовали смешанным нейтронным и гамма излучением суммарной дозой 10 Грей, мощностью 0,5 Грей/мин. Оценку выживаемости клеток проводили с помощью МТТ-теста (колориметрический анализ для оценки жизнеспособности клеток) через 48 часов после воздействия. Указанная тестовая система позволяет оценить жизнеспособность клеток в условиях *in vitro* в относительно короткие сроки (Черепович В.С., 2006).

Результаты. Результаты оценки влияния солей лития на жизнеспособность клеток *in vitro* при лучевом воздействии представлены в таблице 1. Контроль без облучения и взаимодействием с веществом, обозначен за 100 %.

Таблица 1. Влияние исследуемых препаратов на жизнеспособность клеток при лучевом воздействии 10 Гр (результаты выражены в % от необлученного контроля, среднее \pm ст.откл.)

Исследуемые вещества	1,8 мМ	1,2 мМ	0,6 мМ	0,3 мМ
Аскорбат лития (10 Гр)	17 \pm 3	22 \pm 4	27 \pm 1	70 \pm 4
Метронидазол (10 Гр)	75 \pm 5	74 \pm 4	78 \pm 3	72 \pm 3
Контроль (10 Гр)	75 \pm 4	75 \pm 4	75 \pm 4	75 \pm 4
Контроль (без облучения)	100 \pm 4	100 \pm 4	100 \pm 4	100 \pm 4

Заключение. Полученные нами результаты показывают, что аскорбат лития при сочетанном действии с облучением обладает радиосенсибилизирующим действием *in vitro*. При всех исследуемых концентрациях наблюдается снижение жизнеспособности опухолевых клеток более чем на 70% по сравнению с группой контроля. Однако, для концентрации аскорбата лития 0,3 мМ и ниже статистически значимых отличий жизнеспособности от группы облучения не выявлено на данной культуре клеток. В свою очередь, облучение в дозе 10 Грей без комбинации с препаратами снижает жизнеспособность клеток на 25 %. Метронидазол в данном эксперименте не проявил значимого радиосенсибилизирующего действия *in vitro* в широком диапазоне доз (в том числе, концентрации, используемые в лучевой терапии). Данные результаты могут послужить основой для применения препаратов на основе солей лития не только в психиатрии, но и в онкологии при лучевой терапии.

Литература

1. Лосенков И.С., Плотников Е.В., Епимахова Е.В., Бохан Н.А. Литий в психофармакологии аффективных расстройств и механизмы его эффектов на клеточную физиологию. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020;120(11):108-115.
2. Черепович В.С. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности. *Медицинский журнал*. 2006;2:106-108.
3. Plotnikov E.V., Silachev D.N., Zorova L.D., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Zorov S.D., Babenko V.A., Skulachev M.V., Zorov D.B. Lithium salts - simple but magic. *Biochemistry* 2014;79(8):740-9. doi: 10.1134/S0006297914080021

Иммунофармакология и молекулярная иммунология

ВЛИЯНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ИЗ СЫРЬЯ *COLURIA GEOIDES* (ROSACEAE) НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ГРАНУЛОЦИТАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

С.В. Дутова^{1*}, М.Р. Карпова², Ю.В. Саранчина¹

¹ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», г. Абакан, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

г. Томск, Россия

e-mail: coluria@mail.ru

Ключевые слова: фагоцитарная активность, нейтрофилы, фагоцитоз.

Введение. Долгое время считалось, что основная функция нейтрофилов – это реализация врожденного иммунного ответа посредством фагоцитоза. Однако, сейчас опубликованы данные, свидетельствующие о более многочисленных их функциях (Тотолян А.А., 2000; Пинегин Б.В., 2007). Гранулоциты играют важную роль в иммунном ответе посредством фагоцитоза, внеклеточных ловушек, высвобождения цитотоксических гранул и рекрутирования других иммунных клеток против возбудителей инфекций. Последние экспериментальные данные свидетельствуют о модуляции гранулоцитов при хронической вирусной инфекции. Кроме того, гранулоциты могут мигрировать в воспаленные ткани во время инфекции и могут служить мишенью для иммунотерапии (Jones R. et al. 2021). В связи с этим, исследования иммунокорректоров, влияющих на функции гранулоцитарных нейтрофилов, являются актуальными. В результате предшествующих доклинических исследований суммарных извлечений из сырья *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*) нами было установлено их выраженное иммуностропное действие (Дутова С.В., Карпова М.Р., 2019). Для дальнейших исследований в качестве фармацевтической субстанции было решено использовать комплекс биологически активных соединений, извлекаемый из сырья растения 40 % спиртом этиловым (субстанция Сg).

Цель: оценить возможность коррекции фагоцитарной активности нейтрофилов с помощью разработанной фармацевтической субстанции.

Материалы и методы. Исследование проводили согласно «Методическим рекомендациям по исследованию иммуностимулирующей активности лекарственных средств» (Миронов А.Н., 2012). Материалом явилась субстанция Сg, полученная из сырья *S. geoides* методом перколяции с помощью 40 %-ного спирта этилового, стандартизованная по содержанию m-кумаровой кислоты (использовали высушенное досуха извлечение). Для исследования *in vivo* использовали максимальную из рекомендуемых для впервые исследуемых субстанций дозу – 50 мг/кг (или 1000 мкг/мышь), *in vitro* – 10 мкг/мл питательной среды. Эффекты субстанции Сg оценивали в сравнении с официальным иммуностимулятором растительного происхождения – настойкой эхинацеи пурпурной (ООО «Ватхэм-Фармация», рег. № ЛСР-007043/09). Экспериментальную модель иммунодепрессии у животных создавали однократным введением циклофосфана (ОАО «Биохимик», г. Саранск, рег. № Р N001579/01, далее ЦФ), внутривенно в дозе 250 мг/кг. Влияние субстанции Сg на фагоцитарную активность нейтрофилов изучали на инбредных мышках-самках линии СВА/СаЛас. Экспериментальным животным вводили субстанцию Сg в желудок в течение 5 дней в воде очищенной, животные контрольной группы получали растворитель. Оценивали фагоцитарную активность перитонеальных нейтрофилов и нейтрофилов периферической крови мышей. Для эксперимента *in vitro* использовали образцы крови условно здоровых доноров-добровольцев, стерильно взятой из локтевой вены (после подписания информированного согласия). Способность субстанции Сg влиять на фагоцитоз оценивали микроскопически. На мазках при увеличении x1000 учитывали процент нейтрофилов, вступивших в фагоцитоз (фагоцитарный индекс) и среднее число частиц латекса, поглощенное одной клеткой (фагоцитарное число). Просматривали не менее 20 полей зрения, исследовали не менее 200 нейтрофилов. Полученные результаты обрабатывали с использованием пакетов программ «IBM SPSS Statistics 19» и «Statistica 6.1». Результаты исследования представлены в виде медианы с интерквартильным размахом. Для проверки статистической значимости различий показателей использовали непараметрические критерии – Манна-Уитни (для сравнения независимых выборок), различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты. Введение животным субстанции Сg достоверно стимулировало активность и интенсивность фагоцитоза нейтрофилами периферической крови животных (табл. 1): фагоцитарный индекс составил 36,5 % (в контроле 28,0 %), фагоцитарное число – 2,56 (в контроле 1,60). Причем стимуляция активности фагоцитоза субстанцией Сg была сопоставима с эффектом настойки эхинацеи, по влиянию на интенсивность фагоцитоза – уступала препарату сравнения. Исследуемая субстанция также стимулировала активность фагоцитоза перитонеальными нейтрофилами мышей, достоверно превосходя при этом действие настойки эхинацеи.

Таблица 1. Влияние субстанции Сg на фагоцитарную активность нейтрофилов мышей (n=9-10)

Группа животных	Фагоцитарный индекс (% фагоцитирующих нейтрофилов)	Фагоцитарное число (частиц латекса/нейтрофил)
<i>показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови</i>		
Контрольная	28,0 (25,0÷32,0)	1,60 (1,44÷1,64)
1-я экспериментальная (настойка эхинацеи)	35,0 (24,0÷38,0)	3,92 (3,69÷4,81)*
2-я экспериментальная (субстанции Сg)	36,5 (33,3÷40,8)*	2,56 (2,29÷3,04)*#
<i>показатели фагоцитарной активности перитонеальных нейтрофилов</i>		
Контрольная	28,0 (20,0÷35,0)	2,52 (2,06÷3,03)
1-я экспериментальная (настойка эхинацеи)	35,0 (32,8÷44,5)*	4,49 (4,03÷5,73)*
2-я экспериментальная (субстанция Сg)	48,0 (44,0÷57,5)*#	2,70 (2,40÷3,34)#

Примечание. Различие достоверно при $p \leq 0,05$ с показателями * – контроля, # – настойки эхинацеи.

Далее исследовали влияние субстанции Сg на фагоцитоз на фоне экспериментального иммунодефицита (табл. 2). В условиях иммунодепрессии Сg оказывала корригирующее влияние на фагоцитоз нейтрофилов периферической крови и перитонеальных, повышая фагоцитарный индекс до 29,0 % и 32 % (у иммунодепрессированных животных контрольной группы 17,0 % и 13 % соответственно). Эффект субстанции был сопоставим с действием настойки эхинацеи, а по влиянию на нейтрофилы периферической крови – превосходил. Интенсивность фагоцитоза субстанция Сg достоверно не стимулировала.

Таблица 2. Влияние субстанции Сg на фагоцитарную активность нейтрофилов мышей при экспериментальном иммунодефиците (n=9-10)

Примечание. Различие достоверно при $p \leq 0,05$ между показателями: & – 1 и 2-й контрольной группы; * – экспериментальных и 2-й контрольной группы (с экспериментальным иммунодефицитом); # – групп животных, получавших субстанции Сg и настойку эхинацеи.

Затем оценили влияние Сg на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови условно здоровых доноров. Добавление к образцам крови субстанции Сg достоверно стимулировало активность фагоцитоза нейтрофилами периферической крови (таблица 3): фагоцитарный индекс составил 73,5 % (в контроле 59,0 %). Применение исследуемой субстанции также достоверно стимулировало интенсивность фагоцитоза. Оцениваемое иммуностимулирующее действие было ниже, чем у препарата сравнения.

Группа животных			Фагоцитарный индекс, % нейтрофилов	Фагоцитарное число, частиц латекса/нейтрофил
<i>показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови</i>				
1-я контрольная (физ. р-р)			28,0 (25,0÷32,0)	1,60 (1,44÷1,64)
2-я контрольная (ЦФ)			17,0 (16,0-20,0) &	1,50 (1,28-1,74)
1-я экспериментальная (ЦФ+н-ка эхинацеи)			14,0 (13,0-22,0)	1,54 (1,36-2,00)
2-я экспериментальная (ЦФ+Сg)			29,0 (22,0÷35,0)*#	1,65 (1,48÷1,77)
<i>показатели фагоцитарной активности перитонеальных нейтрофилов</i>				
1-я контрольная (физ. р-р)			28,0 (20,0÷35,0)	2,52 (2,06÷3,03)
2-я контрольная (ЦФ)			13,0 (8,5÷19,3)&	1,93 (1,65÷2,34)&
1-я экспериментальная (ЦФ+н-ка эхинацеи)			37,0 (20,3÷53,8)*	2,42 (1,64÷3,53)
2-я экспериментальная (ЦФ+Сg)			32,0 (13,3÷55,0)*	3,32 (1,70÷3,92)

Таблица 3. Влияние субстанции Сg на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови условно здоровых доноров (Медиана (25%÷75%), n=7)

Условия стимуляции	Фагоцитарный индекс, % фагоцитирующих нейтрофилов	Фагоцитарное число, частиц латекса/нейтрофил
Без стимуляции (контроль)	59,0 (53,0÷69,5)	3,23 (2,63÷4,28)
Настойка эхинацеи	80,5 (78,3÷82,0)*	8,31 (8,13÷9,06)*
Субстанции Сg	73,5 (68,3÷80,8)*#	4,10 (3,92÷5,00)*#

Примечание. Различие достоверно при $p \leq 0,05$ с показателями: * – контроля; # – настойки эхинацеи.

Заключение. Субстанция Сg обладает иммуностимулирующим действием в отношении фагоцитарной активности нейтрофилов сопоставимым, а в отдельных случаях и превышающим действие настойки эхинацеи. Кроме того, изучаемая субстанция обладает иммунокорригирующим действием, повышая фагоцитарные показатели до фоновых значений в условиях экспериментального иммунодефицита. Комплекс биологически активных соединений, извлекаемых из сырья *C. geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*) 40 % спиртом этиловым, является перспективной основой для иммуностимулирующего препарата, оказывающего положительное влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов.

Литература.

1. Дутова С.В., Карпова М.А. Результаты доклинического исследования нового иммунокорректора растительного происхождения *Российский иммунологический журнал*. 2019; 13(22):239-241.

2. Пинегин Б.В., Маянский А.Н. Нейтрофилы: структура и функция. *Иммунология*. 2007;(28)6:374-382.
3. Тотолян А. А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб.: Наука; 2000. 231с.
4. Jones R., Manickam C., Ram D.R., Kroll K., Hueber V. Woolley G. Systemic and mucosal mobilization of granulocyte subsets during lentiviral infection. *Immunology*. 2021;00:1–10.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ЭКСТРАКЦИИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ РАСТЕНИЙ РОДА SAUSSUREA НА АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗЫ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ

А.А. Лигачёва^{1*}, Е.И. Гулина², Ю.В. Шабанова³, Е.С. Трофимова¹, С.В. Кривошеков²,

Н.В. Гуркин², Е.Ю. Шерстобоев¹, М.Г. Данилец¹, М.В. Белоусов^{2,3,1}

¹НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, г. Томск, Россия.

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

г. Томск, Россия

³ФГАОУ ВО НИ ТПУ, г. Томск, Россия

e-mail: vittelli@mail.ru

Ключевые слова: растения рода *Saussurea*, оксид азота, перитонеальные макрофаги, полимиксин В.

Введение. Оксид азота (NO) является многофункциональным медиатором, который, участвует в огромном количестве биологических процессов, в частности, в защите от инфекционных организмов, во врождённом иммунитете, в формировании специфического иммунитета, при воспалении (Moncada S. et al., 2006). NO регулирует функциональную активность иммунных клеток, включая макрофаги, дендритные клетки, Т-лимфоциты, нейтрофилы и др. (Ibiza S. et al., 2008; Tripathi P. et al., 2007). В ответ на стимулирование лигандами TLR-рецепторов (TLR) и/или интерфероном- γ (IFN- γ) происходит классическая активация макрофагов (M1) (Sica A. et al., 2012), для которых характерен синтез провоспалительных цитокинов, экспрессия индуцибельной NO-синтазы, продукция реактивных промежуточных соединений азота и кислорода, стимулирование ответа Th1, микробицидная и противоопухолевая активность (Sica A. et al., 2012). Одними из лигандов, взаимодействующими с TLR являются растительные полисахариды (ПС), большинство из которых способствуют появлению у макрофагов воспалительных свойств M1 и, прежде всего, повышение синтеза оксида азота активированными клетками (Scheretkin I.A. et al., 2006). Следует отметить, что растительные ПС могут содержать бактериальный эндотоксин (липополисахарид, ЛПС), который сам оказывает NO-продуцирующее действие. Для определения его наличия в образцах ПС широко применяют антибиотик полимиксин В (Scheretkin I.A. et al., 2006). Ранее проведённые исследования показали перспективность более детального изучения растений рода *Saussurea* DC (соссуреа или горькуша) из семейства Asteraceae (сложноцветные). Показано, что наибольшее количество водорастворимых растительных ПС содержится в траве соссуреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.), соссуреи спорной (*S. controversa* D.), соссуреи Фролова (*Saussurea frolovii* Ledeb.) (Решетов Я.Е. и др., 2018). Первым этапом в изучении иммуномодулирующих свойств ПС в растениях этих видов является отбор образцов, обладающих NO-продуцирующей активностью, при этом свободных от эндотоксина и не обладающих цитотоксическими свойствами.

Цель. Изучить влияние способа экстракции водорастворимых полисахаридов (ПС), выделенных из надземной части соссуреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.) соссуреи спорной (*S. controversa* D.) соссуреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.), на активность NO-синтазы и пролиферацию перитонеальных макрофагов.

Материалы и методы. Водорастворимые полисахариды выделяли из надземной части соссуреи иволистной (ПС SS), соссуреи спорной (ПС SC), соссуреи Фролова (ПС SF) при использовании экстрагента (вода очищенная) с различной pH 2, 6 и 10 (3 часа, температура 60 °C). Экстракт отделяли бумажным фильтром под вакуумом, упаривали на ротационном испарителе ИР-1ЛТ (Россия). Полисахаридные комплексы осаждали 96 % этиловым спиртом, отстаивали в течение 12 часов при 4°C, центрифугировали при 2600 об/мин 10 минут. После растворения осадка в воде очищенной с помощью магнитной мешалки раствор диализировали в течение 48 часов против воды при комнатной температуре. Далее раствор замораживали и подвергали лиофильному высушиванию на сушилке SP Scientific Advantage EL-85 (США). Активность NO-синтазы зрелых перитонеальных макрофагов (МФ) мышей оценивали по концентрации нитритов в супернатанте клеток после 48-часового культивирования в присутствии ПС или ЛПС (серотип O111:B4, «Sigma» добавляя к нему реактив Грейса в соотношении 1:1 и измеряя оптическую плотность раствора на многоканальном спектрофотометре Titertek Multiskan® MCC («Labsystems», Финляндия) (длина волны 540 нм). Макрофаги получали из перитонеальной полости мышей-самок C57BL/6 (возраст 8-10 недель), выращенных в отделе экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, используя набор EasySep™ Biotin Positive Selection Kit («Stemcell Technologies»). Примесь эндотоксина оценивали при добавлении антибиотика полимиксин В (50 мкг/мл). Цитотоксические свойства изучаемых веществ и ЛПС определяли в классическом тесте МТТ, измеряя оптическую плотность, как описано выше. Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ Statistica 13.3, используя критерий Шапиро-Уилка для

проверки нормальности распределения, однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Даннета. Результаты представлены в виде $X \pm m$, где X — среднее значение, m — стандартная ошибка среднего. Уровень значимости: $p < 0,05$.

Результаты. ПС всех исследуемых растений стимулировали продукцию оксида азота макрофагами (таблица 1) в 19,2-20,1 (ПС SS), в 16,4-19,0 (ПС SC) и в 14,8-16,8 (ПС SF) раз по сравнению с интактным контролем, что было сравнимо с влиянием стандартного активатора макрофагов – ЛПС. Два образца ПС – SC pH 2 и SF pH 2 – превосходили его действие в 1,2 раза. При добавлении полимиксина В в культуры МФ, содержащих ПССS и ПССF, выделенные в кислой среде (pH2), концентрация нитритов в них не изменялась по сравнению с инкубацией без антибиотика, что свидетельствует об отсутствии в данных образцах примеси эндотоксина. Продукция нитритов при культивировании МФ с ПССS и ПССF, выделенными в нейтральной (pH6) и щелочной (pH10) среде и обработанными полимиксином В, достоверно снижалась в 1,3-2,3 раза. Инкубация с антибиотиком ПССC, экстрагированных всеми тремя способами, приводила к уменьшению ими степени стимуляции продукции оксида азота макрофагами: в 1,4 (pH2), 2,7 (pH6) и 2,2 (pH10) раз. Однако, несмотря на значимое снижение, концентрация нитритов в этих условиях не опускалась до значений контроля и была гораздо выше его в 14,5-15,6 (ПС SS), в 6,9-11,6 (ПС SC) и в 6,5-15,3 (ПС SF) раз. При этом NO-активирующие свойства всех образцов ПС, обработанных полимиксином В, были сильнее ЛПС в 11,2-16,5 (ПС SS), в 4,4-9,8 (ПС SC) и в 4,4-10,2 раз (ПС SF) в условиях обработки последнего антибиотиком, связывающим эндотоксин. Концентрация оксида азота в митоген-стимулированных супернатантах макрофагов при добавлении полимиксина В снижалась в 9,5-14,3 раз, превышая уровень интактного контроля всего лишь в 1,3-1,6 раз. На пролиферацию макрофагов ни один из образцов и ЛПС влияния не оказывали, что указывает на отсутствие пирогенных свойств изучаемых образцов, не зависимо от способа экстракции.

Таблица 1. Влияние водорастворимых полисахаридов, выделенных в различных условиях из надземной части сосюреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.), сосюреи спорной (*S. controversa* D.) и сосюреи Фролова, на пролиферацию и активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов интактных мышей линии C57BL/6 в отсутствии и присутствии полимиксина В ($X \pm m$)

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Пролиферация, ед. оптической плотности, $\times 10^{-3}$	Концентрация нитритов, мкМ	
			инкубация без полимиксина В	инкубация с полимиксином В
Среда (контроль)	–	289±1	2,98±0,18	2,91±0,03
ЛПС	0,1	318±9	54,29±0,51*	3,79±0,15 ^{▲■}
SS pH 2	20	329±7	59,79±0,7*	62,56±1,18 ^{■◆}
SS pH 6	20	294±3	58,29±1,56*	45,37±0,95 ^{■▲◆}
SS pH 10	20	299±4	57,15±0,9*	42,29±1,64 ^{■▲◆}
Среда (контроль)	–	297±7	3,07±0,30	2,70±0,08
ЛПС	0,1	291±4	49,42±0,51*	4,27±0,16 ^{▲■}
SC pH 2	20	307±6	58,44±1,13* [•]	42,05±1,31 ^{■▲◆}
SC pH 6	20	316±8	50,35±0,96*	18,75±0,76 ^{■▲◆}
SC pH 10	20	315±3	56,76±1,65*	26,37±1,58 ^{■▲◆}
Среда (контроль)	–	304±3	3,87±0,15	3,84±0,08
ЛПС	0,1	282±3	54,64±0,85*	5,75±0,13 ^{▲■}
SF pH 2	20	293±8	65,03±1,81* [•]	58,73±2,09 ^{■◆}
SF pH 6	20	317±6	57,23±1,38*	25,06±1,33 ^{■▲◆}
SF pH 10	20	300±6	58,68±1,26*	44,49±1,51 ^{■▲◆}

Примечание. *– различия показателя со средой без полимиксина достоверны, [■] – различия показателя со средой с полимиксином достоверны, [▲] – различия показателя с инкубацией каждого вещества без полимиксина, [•] – различия показателя по сравнению с ЛПС без полимиксина достоверны, [◆] – различия показателя с ЛПС с полимиксином достоверны; $p < 0,05$, $n=9$.

Заключение. Водорастворимые полисахариды, выделенные из надземной части сосюреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.), сосюреи спорной (*S. controversa* D.), сосюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.) значительно увеличивали продукцию оксида азота макрофагами и не обладали цитотоксическими свойствами. Два образца (ПССS pH2 и ПССF pH2) свободны от примеси эндотоксина. В остальных веществах (ПССS pH 6 и pH 10; ПССC pH 2, pH 6 и pH 10; ПССF pH 2 и pH 10) примеси выявлены в небольшом количестве. Образцы ПС без загрязнения ЛПС могут быть использованы для дальнейшего, более детального изучения иммуномодулирующих свойств.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90016.

Литература

1. Решетов Я.Е., Белоусов М.В., Авдеева Е.Ю., Шурупова М.Н. Сравнительное исследование элементного состава и биологически активных веществ растений рода *Saussurea* DC. флоры Восточной Сибири. *Химия растительного сырья*. 2018;4:205–214.
2. Moncada S., Higgs E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147(1):193–201.
3. Ibiza S., Serrador J.M. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses. *Inmunología*. 2008;27(3):103–117.
4. Tripathi P., Tripathi P., Kashyap L., Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007;51(3):443–452.
5. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(3):787–795.
6. Schepetkin I.A., Quinn M.T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 2006;6:317–333.

ЭКСПРЕССИЯ PD-1, PD-L1, PD-L2 В ТКАНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Л.В. Спирина^{1,2*}, А.В. Августинович¹, З.А. Юрмазов¹, С.Г. Афанасьев¹, Е.А. Усынин¹, И.В. Кондакова¹

¹НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

г. Томск, Россия

e-mail: spirinalvl@mail.ru

Ключевые слова: PD-1, PD-L1, PD-L2, рак почки, VHL, рак желудка.

Введение. Иммуногенность опухоли является одной из актуальных проблем в современной онкологии. PD-1 (Programmed cell death 1) — мембранный белок надсемейства иммуноглобулинов, играет роль в клеточной дифференцировке иммунных клеток (Кушлинский Н.Е. и др., 2018). В физиологических условиях при взаимодействии PD-1 с его лигандами (PD-L1 PD-L2) происходит передача ингибиторного сигнала, предотвращающего развитие чрезмерного иммунного ответа, запуская процессы апоптоза цитотоксических лимфоцитов. В настоящее время очевидна прогностическая роль уровня PD-L1 с агрессивностью заболевания и развитием неблагоприятного исхода.

Положительная экспрессия при раке почки связана с агрессивностью sporadic и наследственного рака почки (Yearley J.H. et al., 2017). Выявлено, что инактивация VHL, связанного с развитием светлоклеточного рака почки, сопровождается ростом иммуногенности опухоли, повышением экспрессии HIF-2. Экспрессия PD-1 в ткани рака желудка ассоциирована с хорошим прогнозом заболевания, при этом неблагоприятный исход патологического процесса связана с экспрессией PD-L2 (Ueda K. et al., 2018; Hong V. et al., 2019). Выявлена гетерогенность в экспрессии PD-L1 в ткани первичной опухоли и ткани метастазов у пациентов с раком желудка и опухолями (Messai Y. et al., 2016; Kammerer-Jacquet S.F. et al., 2017).

Цель. Изучить экспрессии PD-1, PD-L1, PD-L2 в ткани опухоли почки и рака желудка в связи с эффективностью противоопухолевой терапии.

Материал и методы. В исследование было включено 39 пациентов с почечноклеточным раком. При изучении рака желудка было обследовано 34 больных раком желудка, получавшим 3 курса химиотерапии по схеме FLOT. Материалом исследования являлись образцы опухолевой и неизменной ткани почки, полученная при проведении оперативного лечения, находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухолей, которые после забора замораживались и хранились при температуре - 80°C. Экспрессия PD-1, PD-L1, PD-L2 была определена с методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. В результате проведенного исследования выявлена связь экспрессии PD рецепторов и PD-L1 лиганда с увеличением размера опухоли. Уровень мРНК рецептора PD снижалась в 5,17 и 10,1 раза у пациентов с размером опухоли у пациентов со стадией T3N0M0 и T2N0M0 по сравнению с T1N0M0. Также отмечалось снижение уровня мРНК PD-L2 с ростом опухоли. Наличие диссеминированной формы заболевания приводило к снижению экспрессии PD и PD-L1 в 4,75 и 2,7 раза, соответственно, по сравнению с пациентами без отдаленных метастазов. Отмечены различия в экспрессии PD-L2 в ткани метастазов, где зафиксировано снижение данного показателя в 2,26 раза по сравнению с таковым в ткани первичной опухоли. Исследование экспрессии PD-1, PD-L1, PD-L2 в ткани больных раком желудка в зависимости от клинико-морфологических параметров заболевания позволило выявить связь размера опухоли желудка с экспрессией PD-1 и PD-L1. Наблюдалось увеличение экспрессии PD-1 и PD-L1 по мере увеличении размера опухоли. При поражении региональных лимфатических узлов отмечено статистически значимая экспрессия PD-L1, PD-L2. Отмечена волнообразная динамика изменения экспрессия PD-L1 и PD-L2 с пиком у больных со стадией заболевания T2-4N2M0-1. При метастатической форме заболевания происходило увеличение экспрессии PD, PD-L1, PD-L2 в 52,1, 30,06 и 30,07 раза, соответственно, по сравнению с пациентами без отдаленных метастазов. Изучение экспрессии PD-1, PD-L1, PD-L2 в ткани рака желудка в зависимости от

эффекта лечения заболевания выявило связь с экспрессией PD-L2. Отмечено увеличение экспрессии PD-L2 у пациентов с прогрессированием заболевания после проведенного лечения в 138,97; 513,11 и 34,92 раза по сравнению с больными с полной регрессией; с частичной регрессией и стабилизацией опухоли. Выявлено снижение экспрессии рецепторов PD, PD-L1, PD-L2 у пациентов с диссеминированным раком почки. Данные изменения согласуются с ранее представленными данными, когда эффективность лечения опухоли может определяться биологическими особенностями первичных и вторичных очагов опухолевого роста (Hong B. et al., 2019). При этом отмечена гетерогенность по уровню молекулярных маркеров в ткани первичной опухоли и ткани метастазов. Снижение уровня мРНК данных показателей возможно является особенностью почечно-клеточного рака. Отмечена связь агрессивности опухоли желудка по мере распространения заболевания. Увеличение размеров опухоли, появление регионарных метастазов и развитие диссеминированной формы заболевания ассоциировано с повышением уровня рецепторов программированной клеточной гибели и его лигандов. При этом наличие ответа опухоли на лечения коррелировало с экспрессией PD-L2. Выявленные факты согласуются с фактом того, что рост экспрессии данного белка наблюдался у пациентов с неблагоприятным прогнозом заболевания (Messai Y. et al., 2016; Kammerer-Jacquet S.F. et al., 2017).

Заключение. Таким образом, выявлены особенности экспрессии PD, PD-L1, PD-L2 в ткани опухолей почки и аденокарциномах желудка. Для светлоклеточного почечноклеточного рака характерно снижение уровня мРНК изучаемых показателей по мере распространения заболевания. Однако для аденокарцином желудка отмечена связь агрессивности заболевания, эффективности лечения с рецепторами программированной клеточной гибели и их лигандами.

Литература

1. Кушлинский Н.Е., Фридман М.В., Морозов А.А., Герштейн Е.С., Кадагидзе З.Г., Матвеев В.Б. Современные подходы к иммунотерапии рака почки. *Онкоурология*. 2018;14(2):54-67. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2018-14-2-54-67>
2. Hong B., Cai L., Wang J., Liu S., Zhou J., Ma K., Zhang J., Zhou B., Peng X., Zhang N., Gong K. Differential Expression of PD-L1 Between Sporadic and VHL-Associated Hereditary Clear-Cell Renal Cell Carcinoma and Its Correlation With Clinicopathological Features. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2019;17(2):97-104.e1. doi: 10.1016/j.clgc.2018.11.001.
3. Kammerer-Jacquet S.F., Crouzet L., Brunot A., Dagher J., Pladys A., Edeline J., Laguerre B., Peyronnet B., Mathieu R., Verhoest G., Patard J.J., Lespagnol A., Mosser J., Denis M., Messai Y., Gad-Lapiteau S., Chouaib S., Belaud-Rotureau M.A., Bensalah K., Rioux-Leclercq N. Independent association of PD-L1 expression with noninactivated VHL clear cell renal cell carcinoma-A finding with therapeutic potential. *International Journal of Cancer*. 2017;140(1):142-148. doi: 10.1002/ijc.30429.
4. Messai Y., Gad S., Noman M.Z., Le Teuff G., Couve S., Janji B., Kammerer S.F., Rioux-Leclercq N., Hasmim M., Ferlicot S., Baud V., Mejean A., Mole D.R., Richard S., Eggermont A.M., Albiges L., Mami-Chouaib F., Escudier B., Chouaib S. Renal Cell Carcinoma Programmed Death-ligand 1, a New Direct Target of Hypoxia-inducible Factor-2 Alpha, is Regulated by von Hippel-Lindau Gene Mutation Status. *European Urology*. 2016;70(4):623-632. doi: 10.1016/j.eururo.2015.11.029.
5. Ueda K, Suekane S, Kurose H, Chikui K, Nakiri M, Nishihara K, Matsuo M, Kawahara A, Yano H, Igawa T. Prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology*. 2018;36(11):499.e9-499.e16. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.07.003.
6. Yearley JH, Gibson C, Yu N, Moon C, Murphy E, Juco J, Lunceford J, Cheng J, Chow LQM, Seiwert TY, Handa M, Tomassini JE, McClanahan T. PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(12):3158-3167. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1761.

УЧАСТИЕ КАСКАДА ИКК-2/NF-κB В АКТИВАЦИИ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ГУМИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ ТОРФА

Е.С. Трофимова^{1*}, М.В. Зыкова², А.А. Лигачева¹, М.Г. Данилец¹, Е.Ю. Шерстобоев¹, А.В. Цупко², Д.А. Михалев², М.В. Белоусов²

¹НИИФурМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
г. Томск, Россия

e-mail: trofimova_es@pharmso.ru

Ключевые слова: гуминовые кислоты, оксид азота, ИКК-2, NF-κB, иммуноблоттинг.

Введение. Путь передачи сигналов с помощью ядерного фактора-κB (NF-κB) является одним из наиболее значимых внутриклеточных механизмов, связанных с развитием иммунных реакций. Сигнальный путь NF-κB активируется многочисленными экзогенными и эндогенными стимулами и является ключевым в регуляции воспалительной реакции на патогены и раковые клетки, а также аутоиммунных заболеваний. Семейство NF-κB состоит из пяти мономеров NF-κB (RelA/p65, RelB, cRel, NF-κB1 p50 и NF-κB2 p52),

которые могут димеризоваться с образованием до 15 уникальных факторов транскрипции. В покоящихся клетках ядерный фактор находится в цитоплазме в виде гетеродимера, инактивированного ингибиторным белком IκB. Стимуляция цитокиновых или паттерн-распознающих рецепторов приводит к фосфорилированию киназного комплекса IκB (IKK2), который состоит из субъединиц IKK-β и NEMO (известный как IKK-γ). Активация IKK-β приводит к фосфорилированию IκB, убиквитинированию, протеасомальной деградации и высвобождению NF-κB с последующей транслокацией в ядро и запуску транскрипции генов (Dorrington M.G. et al., 2019). В последнее время гуминовые кислоты (ГК) стали широко использоваться в экспериментальной медицине как объект для исследований. Выявлено их гепатопротекторное, антиоксидантное, антибактериальное, адаптогенное, ранозаживляющее, действие (Зыкова М.В. и др., 2018). Кроме того, показано, что *in vitro* ГК обладают противовирусной активностью против вирусов герпеса 1 и 2 типов (HSV1, HSV2), респираторного и цитомегаловируса человека (HCMV, RSV) (Cagno V. et al., 2015), проявляют иммуномодулирующие свойства на фоне применения антибиотиков, а также способствуют усилению сосудобразования (Radomska-Leśniewska D.M. et al., 2016). Ранее авторами было доказано, что ГК торфа усиливают продукцию оксида азота макрофагами, подавляют в них активность аргиназы, а также стимулируют секрецию ряда провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-12, ФНО-α, ИФН-γ) и снижают продукцию противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10) иммунокомпетентными клетками (Трофимова Е.С. и др., 2016; Трофимова Е.С. и др., 2019). Иными словами, ГК торфа вызывают активацию макрофагов по классическому пути и появление у них провоспалительных свойств, однако внутриклеточные механизмы такой активации почти не изучены. Поляризация МФ зависит от целого ряда путей сигнальной внутриклеточной трансдукции, в частности, MAP киназ, JNK, PI3 киназы/Akt, Notch, JAK/STAT, TGF-β, TLR/NF-κB и NIF (Мальшев И.Ю. 2015; Zhou D. et al. 2016). Однако провоспалительные свойства макрофагов чаще всего связывают с передачей сигнала с помощью молекулы NF-κB.

Цель. Изучение вклада внутриклеточного сигнального каскада IKK2/NF-κB, в процесс активации макрофагов гуминовыми кислотами торфа.

Материалы и методы. В работе использовали ГК, которые получали из верхового торфа болота «Васюганское», Томской области: ГКп-1 (сфагново-мочажинный торф, мочажина грядово-мочажинного комплекса, глубина отбора 20-70 см; степень разложения 5-10 %; зольность 2,77 %), ГКп-2 (сосново-пушицевый торф, высокий рям, глубина отбора 10-50 см; степень разложения 30-35 %; зольность 7,25 %), ГКп-3 (магелланикум торф, гряда грядово-мочажинного комплекса, глубина отбора 100-120 см; степень разложения 10-15 %; зольность 2,66 %). Образцы высушивали при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния, измельчали в роторно-ножевой мельнице, просеивали через сито (диаметр 3 мм), обрабатывали 0,1 моль/л раствором натрия пирофосфата в массовом соотношении 1:100, перемешивали в течение 8 часов в реакторе Р-100 при температуре 25-27°C, отделяли жидкую фазу (экстракт) ГК от твердых остатков торфа вакуумной фильтрацией (нутч-фильтр), обрабатывали экстракт кислотой хлороводородной до pH 1-2, осаждали центрифугированием, отмывали осадок водой очищенной до pH 7 и высушивали при комнатной температуре. Исследования проводили на перитонеальных макрофагах (МФ) мышей линии C57BL/6 8-10 недель (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН), которые выделяли из брюшной полости промыванием ледяным раствором хлорида натрия. Все процедуры были проведены в соответствии с ГОСТ 33215-2014 и одобрены Комиссией по гуманному отношению к животным (протокол № 98122015). Из полученной перитонеальной взвеси выделяли зрелые МФ с помощью набора EasySep™ Biotin Positive Selection Kit и антител, специфических к макрофагальным рецепторам Anti-Mouse F4/80 Antibody (Stem Cell). Далее макрофаги ($2,5-3 \times 10^6$) культивировали в 96-луночных планшетах при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и абсолютной влажности в среде, состоящей из RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) с добавлением 10% ЭТС (Hyclone), 20 мМ HEPES (Sigma-Aldrich), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich) и 2 мМ L-глутамина (Sigma-Aldrich), в присутствии образцов ГК и/или ингибитора IKK-2 в концентрации 20 нМ (Calbiochem, кат. № 401481), а также стандартного активатора - ЛПС (0,1 мкг/мл) (Sigma). Через 2 суток после инкубации из лунок собирали надосадок, смешивали с эквивалентным объемом реактива Грейсса и измеряли содержание нитритов при помощи спектрофотометра при длине волны 540 нм (Трофимова Е.С. и др., 2016). Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия. Для определения уровня NF-κB макрофаги инкубировали с исследуемыми веществами как описано выше в течение 30, 60 минут и 17 часов, затем собирали, отмывали ФСБ и разрушали RIPA буфером (Abcam), содержащим коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз. Полученные лизаты разделяли на белковые фракции с помощью SDS-PAGE. Белки из геля переносили полусухим переносом на PVDF мембрану (Immune-Blot, Bio-Rad), затем блокировали мембрану 5% раствором BSA (Sigma-Aldrich). После этого мембрану инкубировали с первичными антителами Anti-NF-κB p65 (Abcam), а затем со вторичными HRP Goat anti-Rabbit IgG (Cedarlane). В качестве контроля загрузки использовали Anti-β-Actin-Peroxidase антитела (Sigma-Aldrich). Визуализацию проводили при помощи хемилюминесцентного субстрата Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). Денситометрический анализ выполняли с использованием геледокументирующей системы G:BOX ChemiXRQ (Syngene) и программного обеспечения Gene-Tools (Syngene). Статистическую обработку проводили с помощью пакета Statistica 13.3, используя t-критерий Даннета. Проверка на нормальность распределения проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Результаты. На первом этапе была определена способность исследуемых веществ стимулировать продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами. Все исследуемые гуминовые кислоты и ЛПС после совместной инкубации в течение 48 часов их с клетками достоверно повышали концентрацию нитритов в супернатантах. Однако ингибитор ИКК-2 не оказывал влияния на ЛПС-стимулированную продукцию оксида азота, но при этом снижал стимулирующие свойства ГК (таблица 1). Для дальнейшего исследования внутриклеточной активации NF-κB с помощью иммуноблоттинга нами была выбрана гуминовая кислота ГКп-2, поскольку ингибитор ИКК-2 наиболее эффективно отменял её стимулирующее действие. Было выявлено, что ГКп-2 вызывала увеличение содержания субъединицы p65 молекулы NF-κB в макрофагах через 30 минут после совместной инкубации в 1,3 раза относительно интактных клеток. Через 60 минут уровень p65 снижался до показателей интактного контроля, а после 17 часов инкубации был в 3 раза ниже контрольного уровня. Динамика изменений уровня NF-κB после стимуляции клеток ЛПС была аналогичной (табл. 2).

Таблица 1. Влияние ингибитора ИКК-2 на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей линии C57/BL6, стимулированными гуминовыми кислотами ($X \pm m$)

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов, мкМ	
		инкубация без ингибитора	инкубация с ингибитором ИКК-2
Среда (контроль)	–	3,75±0,19	3,32±0,06
ЛПС	0,1	15,85±0,20*	16,67±0,06
ГКп-1	10	17,36±0,28*	14,45±0,13■
ГКп-2	100	14,54±0,23*	8,42±0,07■
ГКп-3	10	18,10±0,31*	13,99±0,09■

Примечание. * – различия показателя со средой без ингибитора, $p < 0,05$; ■ – различия показателя с инкубацией каждого вещества без ингибитора; $p < 0,05$. $n = 5$.

Таблица 2. Оценка содержания NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах мышей на разных сроках активации гуминовой кислотой торфа методом иммуноблоттинга, ($X \pm m$)

Продолжительность инкубации	Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Ед. опт. плотности, $\times 10^6$
30 минут	Среда (контроль)	–	35,42±2,16
	ЛПС	0,1	48,31±1,35*
	ГКп-2	100	45,72±2,10*
60 минут	Среда (контроль)	–	41,11±1,67
	ЛПС	0,1	40,03±1,52
	ГКп-2	100	39,10±0,76
17 часов	Среда (контроль)	–	11,82±1,60
	ЛПС	0,1	6,41±0,55*
	ГКп-2	100	4,06±0,45*

Примечание. * – различия показателя со средой, $p < 0,05$. $n = 3$.

При добавлении в культуру клеток ингибитора ИКК-2 после 30-минутной инкубации ингибитор не оказывал блокирующего влияния на киназу ИКК, поскольку уровень NF-κB p65 в макрофагах не только не уменьшался, но даже увеличивался под действием исследуемых веществ по сравнению с контролем. Тогда как через час совместной инкубации клеток с ингибитором и веществами наблюдалось снижение уровня NF-κB p65. Эта тенденция сохранялась и к 17 часам (табл. 3).

Таблица 3. Оценка содержания NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах мышей на разных сроках активации гуминовой кислотой торфа в присутствии ингибитора ИКК-2 методом иммуноблоттинга, ($X \pm m$)

Продолжительность инкубации	Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Ед. опт. плотности, $\times 10^6$
30 минут	Среда (контроль)	–	28,03±0,48
	ЛПС	0,1	38,25±2,81*
	ГКп-2	100	39,09±0,20*
60 минут	Среда (контроль)	–	26,08±0,69
	ЛПС	0,1	13,98±0,70*
	ГКп-2	100	19,38±0,97*
17 часов	Среда (контроль)	–	20,06±2,24
	ЛПС	0,1	17,66±0,16
	ГКп-2	100	5,14±0,17*

Примечание. *– различия показателя со средой, $p < 0,05$. $n = 3$

Заключение. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что стимулирующее действие гуминовых кислот торфа на антигенпрезентирующие клетки в большой степени реализуется за счет активации киназного комплекса ИКК-2 с дальнейшим высвобождением субъединицы р65 молекулы NF-κB. Более того, на модели мышинных макрофагов прослеживается зависимость степени активации NF-κB от срока взаимодействия клетки с активирующими агентами. Показано, что ГК осуществляют запуск внутриклеточного сигнального каскада ядерного фактора NF-κB уже в течение первых 30 минут. В отличие от ЛПС механизм стимулирующего действия ГК на макрофаги в большей степени связан с сигнальным каскадом ИКК-2/NF-κB, поскольку одновременная инкубация клеток с митогеном и ингибитором ИКК-2 не снижала выработку оксида азота.

Литература

1. Dorrington M.G., Fraser I.D.C. NF-κB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:705.
2. Зыкова М.В., Логвинова Л.А., Белоусов М.В. Высокомолекулярные соединения гуминовой природы – перспективные биологически активные соединения. *Традиционная медицина*. 2018;2(53):27-38.
3. Cagno V., Donalisio M., Civra A. et al. In vitro evaluation of the antiviral properties of Shilajit and investigation of its mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;166:129-134.
4. Radomska-Leśniewska D.M., Skopińska-Różewska E., Józwiak J. et al. Angiomodulatory properties of some antibiotics and Tołpa Peat Preparation. *Central-European Journal of Immunology*. 2016.;1(1):19-24.
5. Трофимова Е.С., Зыкова М.В., Лигачёва А.А., Шерстобоев Е.Ю., Жданов В.В., Белоусов М.В., Юсубов М.С., Кривошеков С.В., Данилец М.Г., Дыгай А.М. Влияние гуминовых кислот торфа различных способов экстракции на функциональную активность макрофагов in vitro. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016;162(12):708-713.
6. Трофимова Е.С., Зыкова М.В., Шерстобоев Е.Ю., Данилец М.Г., Лигачева А.А., Белоусов М.В. Влияние гуминовых кислот, выделенных из верхового сосново-сфагново-пушицевого торфа, на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками мышей и человека и гуморальный иммунный ответ. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019; 168(11):593-596.
7. Малышев И.Ю. Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015;59(2):99–111.
8. Zhou D., Huang C., Lin Z. et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal*. 2014;26(2): 192-197.
9. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.-C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2:17023.

Нейробиология и психофармакология

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ЛИХНИСА ХАЛЬЦЕДОНСКОГО НА ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ЭМОЦИОНАЛЬНУЮ РЕАКЦИЮ ЖИВОТНЫХ

О.Г. Афанасьева^{1*}, Т.Н. Поветьева¹, Н.И. Суслов¹, Ю.В. Нестерова¹, П.В. Кульпин¹,
Л.Н. Зибарева², С.Г. Крылова¹, Е.П. Зуева¹

¹НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ, г. Томск, Россия

²ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

e-mail: olgaafanasjeva@mail.ru

Ключевые слова: флавоноиды *Lychnis chalcedonica*, открытое поле, эмоциональная реакция.

Введение. Флавоноиды, являясь вторичными метаболитами растений, выявляются во всех частях растений, где они определяют пигментацию, запах, вкус, рост и репродукцию. Сегодня идентифицировано около 10000 флавоноидов (Зверев Я.Ф., 2017). Из всех флавоноидов апигенин является наиболее часто встречаемых в растениях и изученных фенольных соединений. Он обладает антиоксидантными, антигипергликемическими, противовоспалительными, антиапоптотическими свойствами. Проникая через ГЭБ, ингибирует МАО, проявляет антидепрессантные и седативные свойства, может быть использован для лечения болезни Альцгеймера и Паркинсона (Salehi V. et al., 2019). В флавоноидах *Lychnis chalcedonica*, показавших в эксперименте противоязвенную, противовоспалительную и анальгетическую активность, идентифицированы С-дигликозиды апигенина и С-моногликозиды - витексин, неовитексин и изовитексин (Нестерова Ю.В. и др., 2017; Крылова С.Г. и др., 2021). В свете применения флавоноидов лихниса хальцедонского для лечения хронических заболеваний представляет интерес, оказывают ли они возбуждающее или угнетающее влияние на ЦНС.

Цель. Изучение влияния флавоноидов лихниса хальцедонского на ориентировочно-исследовательское поведение и эмоциональную реакцию животных.

Материалы и методы. Фармакологические исследования проводили на 44 аутобредных мышках-самцах сток CD1 массой 26-32 г 1-й категории, конвенциональных. Животные получены из отдела экспериментального биомоделирования НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга. Флавоноиды лихниса хальцедонского для исследования были предоставлены лабораторией фитохимии Томского государственного университета. Показатели двигательной активности оценивали в установке «открытое поле», в которой течение 3 мин, у животного регистрировали количество перемещений с квадрата на квадрат (горизонтальная активность), количество вставаний на задние лапки (вертикальная активность), количество обследований отверстий (норковый рефлекс), количество умываний (груминг) и количество актов дефекации по количеству фекальных шариков (боллюсов) (Kalueff A.V., La Porte J.L., 2009). Определение эмоциональной реакции животных проводили по методу J. Brady, W. Nauta (Brady J.V., Nauta W.J.H., 1953). в модификации для мышей. Оценивали реакции животных на семь различных воздействий: реакция сопротивления захвату в клетке, где животное постоянно живет; реакция на захват рукой с поверхности металлической крышки; мышечное напряжение при взятии мыши в ладонь; реакция на приближение пинцета; реакция на толчок пинцетом; так же наличие писка, дефекации и мочеиспускания на протяжении всего периода исследования. Каждая реакция оценивалась по четырехбалльной системе. После чего все баллы суммировались и учитывалась по всем показателям для каждого животного в отдельности. Эмоциональную реакцию регистрировали после изучения ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «открытое поле». Флавоноиды лихниса хальцедонского в дозах 16, 160 и 1600 мкг/кг вводили животным курсом ежедневно в течение пяти суток однократно через зонд в желудок в объеме 0,2 мл. воды очищенной за 1 ч до тестирования. В качестве препарата сравнения использовали кофеин-бензоат натрия в дозе 100 мг/кг (оказывает возбуждающее влияние на ЦНС, увеличивая двигательную активность) (Машковский М.Д., 2012). Контрольные животные получали эквивалентное количество воды очищенной. Экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием параметрического критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

Результаты. Фармакологические эффекты флавоноидов лихниса хальцедонского оценивали по влиянию на ориентировочно-исследовательское поведение животных в условиях модели «открытое поле», дающей наиболее общую оценку состояния высшей нервной деятельности и характеризующей начальную фазу условно-рефлекторной деятельности. Горизонтальная двигательная активность, вставание на задние лапы (вертикальные стойки) и норковый рефлекс характеризуют поисковую активность, умывание (груминг) – состояние конфликта, а дефекации – вегетативную реакцию страха. В результате проведенного исследования было установлено, что курсовое введение флавоноидов лихниса хальцедонского в дозах 16, 160 и 1600 мкг/кг не вызывали изменений в поведении животных, потому что показатели достоверно не отличались от соответствующих значений двигательной активности контрольных животных (табл. 1).

Таблица 1. Влияние флавоноидов лихниса хальцедонского на ориентировочно-исследовательское поведение в тесте «открытое поле» у мышей-самцов сток CD1 ($X \pm m$)

Группа наблюдения, доза, количество животных в группе	Суммарная двигательная активность	Горизонтальная активность	Вертикальная активность	Норковый рефлекс	Груминг	Дефекация
Контроль (n=9)	125,1±13,4	63,4±7,7	8,3±2,1	24,1±6,8	0,2±0,2	1,1±0,5
КБН 100 мг/кг (n=8)	130,0±8,5	73,1±7,8	7,5±1,4	17,6±4,7	0,8±0,5	1,1±0,6
ФЛХ 16 мкг/кг (n=9)	130,4±12,4	72,6±8,0	8,1±1,6	25,3±5,7	0,1±0,1	0,8±0,5
ФЛХ 160 мкг/кг (n=9)	120,6±13,1	61,3±7,5	9,3±1,6	20,9±5,2	0,6±0,4	0,4±0,4
ФЛХ 1600 мкг/кг (n=9)	104,3±8,1#	56,8±6,0	7,7±0,9	13,3±3,7	0,2±0,2	1,3±0,5

Эмоциональная реакция по методу J. Brady и W. Nauta является результатом взаимодействия двух паттернов: актуального – реакции безусловного избегания и неспецифического – уровня тревожности (Рузляева Е.А., 1996). Флавоноиды лихниса хальцедонского не оказывали существенного влияния на уровень эмоционального реагирования у мышей (табл. 2). Исследуемые показатели находились на уровне эмоциональной реакции животных группы контроля. Препарат сравнения кофеин-бензоат натрия вызывал статистически достоверное усиление эмоционального ответа у животных за счет значений приближения и толчка пинцетом.

Заключение. Таким образом, курсовое применение суммы флавоноидов лихниса хальцедонского в дозах 16, 160 и 1600 мкг/кг в условиях модели «открытое поле» и при исследовании эмоциональной реакции по методу J. Brady, W. Nauta не оказывали наиболее распространенных побочных эффектов, присущих многим психотропным препаратам.

Таблица 2. Влияние флаваноидов лихниса халцедонского на эмоциональную реакцию мышей-самцов сток CD1 после «открытого поля» ($X \pm m$)

Группа наблюдения, доза, количество животных в группе	Величина эмоциональной реакции в баллах							
	Суммарная эмоциональная реакция	Захват в клетке	Захват на ровной поверхности	Мышечный тонус	Приближение пинцета	Толчок пинцетом	Дефекация	Вокализация
Контроль (n=9)	9,8±1,1	1,2±0,3	2,9±0,1	2,3±0,2	1,1±0,2	1,0±0,2	0,1±0,1	1,1±0,4
КБН 100 мг/кг (n=8)	13,3±1,4*	2,0±0,4	3,4±0,3	2,6±0,3	2,0±0,3*	1,8±0,3*	0±0	1,5±0,3
ФЛХ 16 мкг/кг (n=9)	8,6±0,7#	0,3±0,2* #	2,7±0,2#	2,4±0,2	1,0±0,2#	0,9±0,1#	0±0	1,2±0,4
ФЛХ 160 мкг/кг (n=9)	9,0±0,6#	0,6±0,2#	2,9±0,1	2,9±0,1*	1,3±0,2	0,8±0,2#	0±0	0,6±0,2#
ФЛХ 1600 мкг/кг (n=9)	8,7±0,7#	1,3±0,4	2,7±0,2#	2,1±0,2	1,2±0,2#	0,4±0,2*#	0±0	0,9±0,2

Примечание. $p < 0,05$ в сравнении *с контролем, # с кофеин-бензоат натрия. КБН – кофеин-бензоат натрия. ФЛХ - флавоноиды лихниса халцедонского.

Литература

1. Зверев Я.Ф. Флавоноиды глазами фармаколога. Особенности и проблемы фармакокинетики. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017;15(2):4-11. DOI: 10.17816/RCF1524-11
2. Крылова С.Г., Афанасьева О.Г., Зибарева Л.Н., Нестерова Ю.В., Рыбалкина О.Ю., Поветьева Т.Н., Зуева Е.П., Зюзьков Г.Н., Суслов Н.И. Оценка противоязвенной активности комплекса флавоноидов *Lychnis chalcidonica* L. на моделях экспериментального язвенного генеза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021;171(2):175-181. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-171-2-175-181.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна; 2012. 1216 с.
4. Нестерова Ю.В., Поветьева Т.Н., Зибарева Л.Н., Суслов Н.И., Зуева Е.П., Аксиненко С.Г., Афанасьева О.Г., Крылова С.Г., Амосова Е.Н., Рыбалкина О.Ю., Лопатина К.А. Противовоспалительная и анальгетическая активность комплекса флавоноидов *Lychnis chalcidonica* L. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017;163(2):185-189. DOI: 10.1007/s10517-019-04372-9.
5. Рузляева Е.А. Дисс. ...канд. биол. Наук. Томск: НИИ фармакологии, 1996. 148 с.
6. Brady J.V., Nauta W.J.H. Subcortical mechanisms in emotional behavior: affective changes following septal forebrain lesions in the albino rat. *Journal of comparative and physiological psychology*. 1953;46(5): 339–346. DOI: 10.1037/h0059531
7. Kalueff A.V., La Porte J.L. Experimental animal models in neurobehavioral research. New York: Nova Science Publishers; 2009. 185 p.
8. Salehi B., Venditti A., Sharifi-Rad M., Kręgiel D., Sharifi-Rad J., Durazzo A., Lucarini M., Santini A., Souto E.B., Novellino E., Antolak H., Azzini E., Setzer W.N., Martins N. The therapeutic potential of apigenin. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(6):1305. DOI: 10.3390/ijms20061305.

РОЛЬ ПРОЛОНГИРОВАННЫХ ФОРМ АНТИПСИХОТИКОВ В РАЗВИТИИ АКАТИЗИИ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

А.А. Гончарова*, Е.Г. Корнетова

ФГБ НУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья», Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

e-mail: gongcharanastasya@gmail.com

Ключевые слова: акатизия, шизофрения, пролонгированная терапия, депо-форма, антипсихотики.

Введение. Акатизия является нежелательным двигательным явлением антипсихотической терапии у больных шизофренией, что тесно связано с действием фармакологического агента. На сегодняшний день основным способом лечения шизофрении является длительная терапия препаратами группы антипсихотиков. Применение в терапии шизофрении пролонгированных форм препаратов играет важную

роль в сохранении и поддержании уровня социального функционирования и адаптации больных шизофренией в совокупности с другими методами реабилитации (Biagi E. et al., 2018). Это достигается за счет упрощения схемы приема лечения и непрерывности терапии, что улучшает терапевтическую приверженность и уменьшает стресс от ежедневного приема препарата. Однако, назначение препаратов в пролонгированной форме может провоцировать развитие транзиторных форм акатизии в последующие 3 дня после инъекции (Cunningham Owens D.G., 2014). Также известно, что на фоне приема антипсихотиков в депо-форме акатизия является частым двигательным нарушением (Sajatovic M. et al., 2013).

Цель. Оценить шанс развития акатизии у больных шизофренией, получающих антипсихотическую терапию препаратами в пролонгированной форме.

Материалы и методы. Было обследовано 58 больных с верифицированным диагнозом шизофрении в соответствии с критериями МКБ-10 (ICD-10, 1993), в возрасте 41,5 [35; 48] (Me [Q1; Q3]) года, возраст начала заболевания составил 23 [18; 30] года, длительность заболевания – 17 [9; 24] лет. Все пациенты получали базисную антипсихотическую терапию препаратом в пролонгированной форме в терапевтических дозах, одобренных Министерством здравоохранения Российской Федерации. Наличие акатизии определялось с использованием валидированной и стандартизированной шкалы оценки акатизии Барнса (Barnes Akathisia Rating Scale – BARS) (Barnes T.R. 1989), через две недели после госпитализации в стационар, что соответствует периоду возникновения острой акатизии (Cunningham Owens D.G., 2014). На основании BARS все пациенты были разделены на две группы исследования: 1 – пациенты с акатизией и 2 – пациенты без акатизии. Оценка отношения шансов (ОШ) выполнена с использованием онлайн-калькулятора MedCalc®, с указанием значения 95% доверительного интервала (ДИ). Пороговое значение достигнутого уровня значимости $p > 0,05$. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90010.

Результаты. Частота встречаемости акатизии при использовании в лечении шизофрении препаратов в пролонгированной форме оказалась равной 60,3%. На фоне приема флуфеназина деканоата акатизия не была зарегистрирована. Было установлено, что назначение зуклопентиксола деканоата повышало шанс развития акатизии у пациентов с шизофренией практически в 4 раза (ОШ = 3,85 (95 % ДИ: 1,2–12,2; $p = 0,021$)), для галоперидола деканоата различия не были обнаружены (ОШ = 2,09 (95 % ДИ: 0,71–6,12; $p = 0,178$)) (табл. 1).

Заключение. При нарушении приверженности к терапии у больных шизофренией или при других ситуациях, когда пациент не может получать лечение перорально, антипсихотические препараты в пролонгированной форме, определенно, являются препаратами выбора. В тоже время, возникновение лекарственно-индуцированной акатизии может привести к недостижимости данной цели, снижению комплаенса и эффективности реабилитационных мероприятий. Ранее было показано, что назначение зуклопентиксола и арипипразола связывают с повышением риска развития акатизии в сравнении с другими антипсихотическими препаратами (Sajatovic M. et al., 2013). Также развитие акатизии связывают с приемом палиперидона пальмитата в сравнении с галоперидолом деканоатом (Huhn M. et al., 2019). Повышение шанса развития акатизии в 4 раза при назначении зуклопентиксола деканоата может быть объяснено рецепторным профилем данного антипсихотика, что требует дальнейшего уточнения.

Таблица 1. Антипсихотическая терапия в группах исследования

Действующее вещество	Пациенты с акатизией		Пациенты без акатизии		Всего	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Галоперидол деканоат	12	34,2	12	52,1	24	43,1
Зуклопентиксол деканоат	23	65,8	7	30,4	30	51,7
Флуфеназин деканоат	0	0,0	4	17,5	4	5,2
Итого	35	100,0	23	100,0	58	100,0

Литература

1. Bäckers L., Rothe P., Cipriani A., Davis J., Salanti G., Leucht S. Comparative efficacy and tolerability of 32 oral antipsychotics for the acute treatment of adults with multi-episode schizophrenia: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet*. 2019; 394(10202):939-951. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31135-3.
2. Barnes T. R. A rating scale for drug-induced akathisia. *The British Journal of Psychiatry*. 1989; 154(5):672-676. DOI: 10.1192/bjp.154.5.672.
3. Biagi E., Capuzzi E., Colmegna F., Mascarini A., Brambilla G., Ornaghi A., Santambrogio J., Clerici M. Long-Acting Injectable Antipsychotics in Schizophrenia: Literature Review and Practical Perspective, with a Focus on Aripiprazole Once-Monthly. *Advances in Therapy*. 2017; 34(5):1036-1048. DOI: 10.1007/s12325-017-0507-x.

- Casiano E., Williams T.D. Prospective trial of customized adherence enhancement plus long-acting injectable antipsychotic medication in homeless or recently homeless individuals with schizophrenia or schizoaffective disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2013; 74(12):1249-1255. DOI: 10.4088/JCP.12m08331.
- Cunningham, Owens D. G. A Guide to the Extrapyrimal Side-Effects of Antipsychotic Drugs. Cambridge University Press; 2014. 383 p. ISBN: 9-7811-0702286-7.
- Sajatovic M., Levin J., Ramirez L.F., Hahn D.Y., Tatsuoka C., Bialko C.S., Cassidy K.A., Fuentes-Huhn M., Nikolakopoulou A., Schneider-Thoma J., Krause M., Samara M., Peter N.3, Arndt T., World Health Organization: The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders — Diagnostic Criteria for Research. Geneva: WHO, 1993.

СВЯЗЬ УРОВНЯ КАТЕХОЛ-О-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ (СОМТ) С БЕЗНАДЕЖНОСТЬЮ И СУИЦИДАЛЬНЫМ РИСКОМ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ, ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИПСИХОТИЧЕСКУЮ ТЕРАПИЮ

И.А. Меднова^{1*}, Л.А. Левчук¹, Е.Г. Корнетова¹,
В.И. Герасимова¹, А.Н. Корнетов², С.А. Иванова¹

¹ НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск, Россия

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия
e-mail: i.mednova@yandex.ru

Ключевые слова: СОМТ, шизофрения, суицидальное поведение, антипсихотическая терапия.

Введение. Среди больных шизофренией отмечается тенденция к снижению ожидаемой продолжительности жизни, что прежде всего связано с высокой распространенностью сердечно-сосудистых заболеваний и суицидов (Hjorthor C. et al., 2017; Misiak B. et al., 2015). В качестве факторов риска суицида при шизофрении рассматриваются разнообразные клинические, социальные и биологические факторы и их сочетание (Hettige N.C. et al., 2018; Fang X. et al., 2019; Корнетова Е.Г., 2018; Корнетова Е.Г., 2020). Несмотря на наличие психометрических инструментов для оценки суицидального риска (шкала безнадежности Бека, шкала депрессия Гамильтона и др.) их применение затруднено у больных шизофренией в связи с психическим состоянием больных. Данный факт диктует необходимость поиска биомаркеров суицидального риска при данном психическом расстройстве. Таким маркером может быть катехол-О-метилтрансфераза (СОМТ) – фермент, играющий важную роль в распаде катехоламинов, в том числе дофамина, адреналина, норадреналина мозга (González-Castro T.V. et al., 2016). СОМТ рассматривается как нейробиологический субстрат для гетеро- и аутоагрессии у пациентов с шизофренией и шизоаффективным расстройством (Nolan K.A. et al., 2000). По данным мета-анализов и аналитических обзоров, полиморфизм Val158Met гена *COMT* был связан с суицидальным поведением у женщин (Sadeghiyeh T. et al., 2017), а также с развитием шизофрении (González-Castro T. V. et al., 2016). Однако число исследований, посвященных изучению связи СОМТ и риском суицидального поведения при шизофрении практически нет.

Цель. Оценить ассоциацию уровня СОМТ с суицидальным риском и безнадежностью у больных шизофренией, получающих антипсихотическую терапию.

Материалы и методы. После подписания информированного согласия в исследование включили 170 пациентов с диагнозом шизофрения, находящихся на стационарном лечении и получающих базисную антипсихотическую терапию. Критериями включения были возраст пациентов от 18 до 60 лет; наличие подписанной формы информированного согласия на участие в исследовании; верифицированный диагноз шизофрения согласно МКБ-10 (F20). Критериями невключения в исследование являлись наличие коморбидных неврологических, органических и соматических заболеваний, затрудняющих объективную оценку клинического состояния, вызванного основным заболеванием; отказ больного от участия в исследовании. Наличие суицидальных попыток в анамнезе оценивали на основании клинического интервью с пациентом и его родственниками, а также на основании сведений из медицинской документации. Степень суицидального риска оценивали с помощью шкалы безнадежности Бека. Уровень СОМТ определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора (Cloud-clone corp., USA). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы SPSS Statistic (V. 23). Соответствие выборки нормальному закону распределения оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка, а статистическую значимость различий – с использованием U-критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости принимался $p \leq 0,05$.

Результаты. Для оценки связи концентрации СОМТ со степенью суицидального риска, оцениваемой психометрически по шкале безнадежности Бека, пациентов распредели в две группы: в первую группу вошли 97 пациентов с отсутствием или легкой степенью безнадежности (диапазон баллов от 0 до 8), а во вторую группу – 29 пациентов со средней или тяжелой степенью безнадежности (диапазон баллов от 9 до 20). В исследуемых группах уровень СОМТ оказался сопоставим: 11,80 (10,09; 14,05) против 12,00 (10,77; 13,56) нг/мл ($p = 0,995$). По данным клинического интервью 49 пациентов сообщали о наличии суицидальных попыток в анамнезе, и у 121 участника не было зарегистрировано парасуицидов в анамнезе.

При оценке концентрации СОМТ было обнаружено статистически значимое повышение данного маркера у пациентов, имевших в анамнезе попытки суицида: 12,90 (10,64; 14,88) против 11,7 (9,94; 13,56) нг/мл ($p = 0,026$). Известно, что длительность шизофрении может играть роль в развитии суицидальных тенденций (Duțescu M.M. et al., 2018; Clapham E. et al., 2018), в связи с чем мы проанализировали взаимосвязи между наличием суицидального риска и уровнем СОМТ в зависимости от давности заболевания. Было показано, что у пациентов с длительностью шизофрении более 5 лет, имевших в анамнезе попытки суицида, концентрация СОМТ в сыворотке крови была выше, чем у пациентов без истории парасуицидов (табл. 1).

Таблица 1. Уровень СОМТ в сыворотке крови больных шизофренией с длительностью заболевания до/после 5 лет в зависимости от наличия парасуицидов в анамнезе

Показатель нг/мл	Длительность шизофрении менее 5 лет			Длительность шизофрении более 5 лет		
	Наличие парасуицидов в анамнезе	Отсутствие парасуицидов в анамнезе	p- value	Наличие парасуицидов в анамнезе	Отсутствие парасуицидов в анамнезе	p- value
СОМТ	14,93 (11,25; 19,48)	11,80 (10,26; 15,56)	0,252	12,90 (10,51; 14,21)	11,61 (9,72; 13,54)	0,046*

В свою очередь, степень суицидального риска по шкале Бека не различалась во всех исследуемых группах. В связи с необходимостью поиска периферических маркеров суицидального поведения при шизофрении была предпринята попытка выявления диагностической ценности СОМТ в качестве такого маркера методом ROC-анализа. Площадь под кривой составила 0,602 (95% ДИ от 0,514 до 0,705, $p = 0,026$ (рис. 1)).

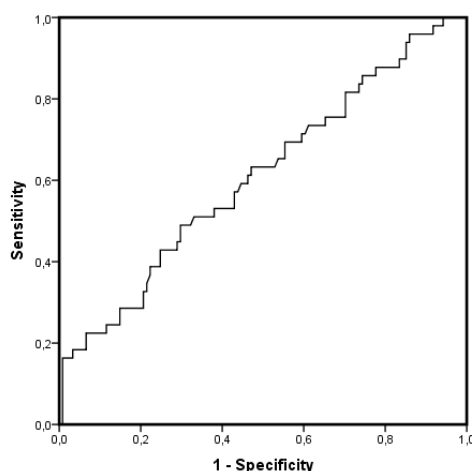


Рис. 1. ROC-кривая для определения оценки качества классификации выбранного предиктора

Заключение. Таким образом по результатам проведенного исследования было выявлено повышение уровня СОМТ у больных шизофренией с историей суицидальных попыток в зависимости от длительности заболевания.

Литература

1. Корнетова Е.Г., Гончарова А.А., Корнетов А.Н., Давыдов А.А., Дубровская В.В., Семке А.В., Бохан Н.А. Связь суицидального поведения и безнадёжности с акатизией у больных шизофренией. *Суицидология*. 2018;9(3):63-70.
2. Корнетова Е.Г., Герасимова В.И., Корнетов А.Н., Языков К.Г., Гончарова А.А., Меднова И.А., Семке А.В., Иванова С.А., Бохан Н.А. Влияние когнитивных функций на уровень суицидального риска у больных шизофренией. *Суицидология*. 2020;11(4):13-25.
3. Clapham E., Bodén R., Brandt L., Jönsson E.G., Bahmanyar S., Ekblom A., Ösby U., Reutfors J. Suicide Ideation and Behavior as Risk Factors for Subsequent Suicide in Schizophrenia: A Nested Case-Control Study. *Suicide and Life-Threatening Behavior*. 2018;49(4):996-1005.
4. Duțescu M.M., Popescu R.E., Balcu L., Duica L.C., Strunoiu L.M., Alexandru D.O., Pîrlog M.C. Social Functioning in Schizophrenia Clinical Correlations. *Current Health Sciences Journal*. 2018;44(2):151-156.
5. Fang X., Chen Y.W., Yewei Z.C. Identification of risk factors for suicidal ideation in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2019;271:195-199.
6. González-Castro T.B., Hernandez-Diaz Y., Juárez-Rojop I.E., López-Narváez M.L., TovillaZárate C.A., Fresan A. The role of a Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Val158Met genetic polymorphism in

- schizophrenia: a systematic review and updated meta-analysis on 32,816 subjects. *Neuromolecular medicine*. 2016;18(2):216-231.
7. Hallikainen T., Kotilainen I., Räsänen P., Isohanni M., Järvelin M.R., Karvonen M.K. Suicidal behavior in patients with schizophrenia is related to COMT polymorphism. *Psychiatric Genetics*. 2000;10(3):117-124.
 8. Hettige N.C., Bani-Fatemi A., Sakinofsky I., et al. A biopsychosocial evaluation of the risk for suicide in schizophrenia. *CNS Spectrums*. 2018;23(4):253-263.
 9. Hjorthøj C., Stürup A.E., McGrath J.J., et al. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Psychiatry*. 2017;4(4):295-301.
 10. Misiak B., Kiejna A., Frydecka D. Higher total cholesterol level is associated with suicidal ideation in first-episode schizophrenia females. *Psychiatry Research*. 2015;226(1):383-388.
 11. Nolan K.A., Volavka J., Czobor P., Cseh A., Lachman H., Saito T., Tiihonen J., Putkonen A., Sadeghiyeh T., Biouki FH, Mazaheri M, ZareShehneh M, Neamatzadeh H, Poursharif Z. Association between Catechol-O-Methyltransferase Val158Met (158G/A) polymorphism and suicide susceptibility: a meta-analysis. *Journal of research in health sciences*. 2017;17(2):383.

РОЛЬ CD147 И RAGE В РАЗВИТИИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ АМИЛОИДНОЙ АНГИОПАТИИ *IN VITRO*

А.И. Мосягина^{1*}, Е.Б. Бойцова², Е.Д. Хилажева¹,
Е.А. Тепляшина¹, А.В. Моргун¹, А.Б. Салмина^{1,3}

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия

²Красноярское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

³ФГБНУ «Научный центр неврологии», г. Москва, Россия

e-mail: angelina.mosiagina@gmail.com

Ключевые слова: CD147, RAGE, болезнь Альцгеймера, амилоидная ангиопатия.

Введение. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой систему высокоспециализированных типов клеток, обеспечивающих избирательный обмен элементами между кровью и головным мозгом. Четыре основных типа клеток: эндотелиальные клетки, перициты, астроциты и нейроны, - в совокупности с внеклеточным матриксом формируют так называемую нейроваскулярную единицу (НВЕ). На протяжении последних 20 лет накапливались клинические данные о том, что в патогенез болезни Альцгеймера (БА) важный вклад вносят нарушения со стороны НВЕ, включающие в себя нарушения проницаемости ГЭБ, нарушения микроциркуляции, нейрон-астроглиального метаболического сопряжения и глиоваскулярного контроля локального кровотока (van de Haar et al., 2013; Hofman et al., 2016; Liu et al., 2019). Таким образом, актуальным исследовательским вопросом является причинно-следственная связь между нейродегенерацией как таковой и амилоидной ангиопатией при БА (Biron et al., 2011). В этом контексте нами были выбраны две ключевые молекулы, активность которых может влиять на процессы генерации бета-амилоида (A β) и его транспорта через ГЭБ: CD147, модулятор активности секретазы, генерирующей A β из предшественника бета-амилоида APP, и RAGE, транспортер A β через ГЭБ (Успенская и др., 2018; Kierdorf et al., 2013).

Цель. Изучить молекулярные механизмы нарушения церебральной микроциркуляции и структурно-функциональной целостности ГЭБ в экспериментальных моделях БА *in vitro* при модуляции активности CD147 и RAGE для разработки новых подходов к терапии церебральной амилоидной ангиопатии.

Материалы и методы. Исследование было проведено на мышах линии C57BL/6. Животные были разделены на две группы: опытную (самцы в возрасте 4 месяцев, n=5) и контрольную (самцы в возрасте 4 месяцев, n=5). Мышам опытной группы вводили A β 1-42 в CA1 зону гиппокампа билатерально по 1 мкл для моделирования экспериментальной болезни Альцгеймера. Контролем служили ложно оперированные животные после введения растворителя для A β 1-42, фосфатно-солевого буфера. Далее из головного мозга мышей получали культуры эндотелиальных клеток (по модифицированному протоколу Y. Liu et al., 2013) и нейросфер с их последующей направленной дифференцировкой в астроциты и нейроны (по протоколу Morgun A.V. et al., 2013). Проводили модуляцию активности CD147 и RAGE в клетках эндотелия: для блокировки экспрессии CD147 и RAGE использовали siRNA CD147 (Santa Cruz, sc-36375) и siRNA RAGE (Santa Cruz, sc-35299), для активации CD147 использовали мышинный рекомбинантный циклофилин А (Abcam, ab202256), для активации RAGE использовали A β 1-42 (Sigma, A9810). Получение модели ГЭБ *in vitro*: смесь астроцитов и нейронов помещали на дно культурального планшета, затем устанавливали культуральную вставку (Corning-Costar, США), на которую помещали эндотелиоциты. Смесь клеток культивировали в среде, состоящей из DMEM с FBS, глутамином, смесью антибиотиков при 37°C с 5% CO₂. Было сформировано 5 экспериментальных групп: 1) контроль; 2) siRNA CD147; 3) siRNA RAGE; 4) циклофилин А; 5) A β 1-42. Далее производили оценку трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) через 1, 2, 4, 6 и 24 часа, оценку проницаемости эндотелиального монослоя для FITC-меченого декстрана с молекулярной массой 20,000 (Sigma, FD20S) через 1, 2 и 4 часа, иммуноцитохимическую регистрацию молекул-маркеров ангиогенеза, CD34 (Abcam, ab81289) и VEGFR2

(Abscam, ab2349), а также производили анализ экспрессии гена APP методом ПЦР. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Манна-Уитни, сравнение зависимых выборок осуществляли с помощью критерия Уилкоксона. Различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-6240.2018.7).

Результаты. В контрольной группе блокирование RAGE приводило к статически значимому увеличению показателей ТЭС в первые часы наблюдения с последующим уменьшением в конце суток, культивирование эндотелиальных клеток в присутствии Аβ 1-42 не оказало влияния на величину ТЭС. В модели БА *in vitro* блокирование RAGE привело к более стойкому и длительному повышению ТЭС, а Аβ 1-42 вызвал уменьшение ТЭС к концу суток. В контрольной группе блокирование CD147 приводило к снижению уровня ТЭС уже через 6 часов наблюдения, тогда как циклофилин А вызвал статически значимое повышение величины ТЭС к 6 часу наблюдения. В группе модели БА блокирование CD147 вызвало значимое увеличение показателей ТЭС в первые часы наблюдения, которое сменилось статически значимым уменьшением к концу суток. Циклофилин А вызвал однонаправленное, но менее интенсивное повышение величины ТЭС. В контрольной группе и группе экспериментальной БА использование siRNA RAGE и siRNA CD147, а также культивирование в присутствии Аβ 1-42 привело к повышению проницаемости для FITC-декстрана. Циклофилин А не оказал воздействия на проницаемость ГЭБ в контрольной группе, но вызвал снижение проницаемости ГЭБ в течение 1 часа в опытной группе, однако к 4 часу проницаемость увеличилась по сравнению с контролем. В контрольной группе было выявлено значительное увеличение количества эндотелиоцитов, экспрессирующих VEGFR2, после воздействия siRNA RAGE, siRNA CD147 и Аβ 1-42. В условиях модели БА наблюдалось значимое снижение числа эндотелиоцитов, экспрессирующих VEGFR2, при воздействии siRNA RAGE, siRNA CD147 и Аβ 1-42. В группе контроля было выявлено значительное увеличение количества эндотелиоцитов, экспрессирующих CD34, после воздействия siRNA RAGE и siRNA CD147, а действие циклофилина А и Аβ 1-42 не оказало влияния на количество CD34-иммунопозитивных клеток. В экспериментальной модели БА наблюдалось значимое снижение числа эндотелиоцитов, экспрессирующих CD34, при воздействии Аβ 1-42 и siRNA CD147, однако отмечалось увеличение числа CD34-иммунопозитивных клеток при воздействии циклофилина А. В группах контроля и экспериментальной БА блокирование экспрессии RAGE привело к статически значимому снижению экспрессии гена APP, а культивирование в присутствии Аβ 1-42 привело к значимому увеличению экспрессии данного гена. При этом было зафиксировано увеличение продукции APP при экспериментальной БА в отсутствие модуляторов. Блокирование экспрессии CD147 приводило к статически значимому увеличению экспрессии гена APP как в контроле, так и при экспериментальной БА. Культивирование в присутствии циклофилина А не оказало влияния на экспрессию APP в контрольной группе, однако в условиях БА экспрессия гена APP была статически значимо выше, чем в контроле.

Заключение. Анализируя данные оценки ТЭС и проницаемости для FITC-декстрана, можно сделать вывод, что при развитии церебральной амилоидной ангиопатии оправданным будет являться подавление экспрессии/эффектов RAGE и CD147 в клетках церебральных микрососудов для снижения их патологической проницаемости. Согласно данным иммуноцитохимического анализа, существенно возрастает количество VEGFR2-иммунопозитивных клеток на фоне подавления экспрессии RAGE или CD147 в церебральном эндотелии, что может свидетельствовать о супрессивном влиянии RAGE и CD147 на процессы ангиогенеза. Интересно, что CD147 проявляет свои эффекты в отношении экспрессии CD34 (маркера tip cells): подавление экспрессии CD147 при экспериментальной ангиопатии приводит к значительному снижению CD34-иммунопозитивных клеток, а лиганд CD147, циклофилин А, значимо увеличивает их количество в модели *in vitro*. Таким образом, нейродегенерации альцгеймеровского типа сопровождается изменением процессов неоангиогенеза, повышением проницаемости ГЭБ, патологически усиленной локальной продукцией APP клетками эндотелия. Нами было показано, что блокирование экспрессии CD147 может быть эффективно в модели амилоидной ангиопатии *in vitro* для восстановления поврежденной целостности ГЭБ и увеличения количества клеток с проангиогенным потенциалом. Однако важно отметить, что снижение экспрессии CD147 сопровождается возрастанием локальной продукции APP в клетках церебрального эндотелия и снижением количества CD34 tip cells, которые являются активными участниками ангиогенеза.

Литература

1. Успенская Ю.А., Комлева Ю.К., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Белова О.А., Салмина А.Б. Полифункциональность CD147 и новые возможности для диагностики и терапии. *Сибирское медицинское обозрение*. 2018;4:22-30.
2. Biron K.E., Dickstein D.L., Gopaul R., Jefferies W.A. Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2011;6(8):e23789. DOI: 10.1371/journal.pone.0023789.

3. Hofman P.A.M., Burgmans S., Verhey F.R.J., Backes W.H. Neurovascular unit impairment in early Alzheimer's disease measured with magnetic resonance imaging. *Neurobiol Aging*. 2016; 45:190-196. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.06.006.
4. Kierdorf K., Fritz G. RAGE Regulation and Signaling in Inflammation and Beyond. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013;94(1):55-68. DOI: 10.1189/jlb.1012519.
5. Liu X., Hou D., Lin F., Luo J., Xie J., Wang Y., Tian Y. The role of neurovascular unit damage in the occurrence and development of Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2019;30(5):477-484. DOI: 10.1515/revneuro-2018-0056.
6. van de Haar H.J., Jansen J.F.A., van Osch M.J.P., van Buchem M.A., Muller M., Wong S.M., ElAli A., Thériault P., Préfontaine P., Rivest S. Mild chronic cerebral hypoperfusion induces neurovascular dysfunction, triggering peripheral beta-amyloid brain entry and aggregation. *Acta Neuropathol Commun*. 2013;1:75. DOI: 10.1186/2051-5960-1-75.

ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ДИТЕРПЕНОВОГО АЛКАЛОИДА ЗОНГОРИНА

Ю.В. Нестерова*, Т.Н. Поветьева, Н.И. Суслов, Г.Н. Зюзьков

ФГБНУ НИИФ и РМ им. Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ СО РАН, г. Томск, Россия

e-mail: nes-yuliya@yandex.ru

Ключевые слова: зонгорин, антидепрессантная и антиамнестическая активности.

Введение. Как известно, основным психотропный эффект антидепрессантов связывают с блокадой обратного захвата тканями в синапсах нейромедиаторов: серотонина и норадреналина. Разнообразное и достаточно выраженное влияние алкалоидов на медиаторные системы организма человека и животных позволяют предполагать возможность их воздействия на обмен серотонина, тем более что нами была показана противовоспалительная активность суммы дитерпеновых алкалоидов в условиях острого серотонинового отека (Нестерова Ю.В. и др., 2008а). Поскольку серотониновые рецепторы располагаются не только в ЦНС, но также на тромбоцитах и в сосудистой стенке, была продемонстрирована четкая взаимосвязь между “поведением отчаяния” в тесте подвешивания за хвост (ТПХ) и степенью экссудации, вызванной периферическим введением серотонина (Волчегорский И.А., Тренина Е.А., 2006). Учитывая это, мы провели изучение антидепрессантной активности дитерпенового алкалоида зонгорина в условиях теста “поведенческого отчаяния” и анализ взаимосвязи этой активности с выраженностью серотонинового отека у мышей, а также оценили влияние зонгорина на холинергическую систему, поскольку большинство побочных эффектов антидепрессантов связаны с их холинолитической активностью (Порошина Е.Г., 2019).

Цель работы. изучение антидепрессантной активности дитерпенового алкалоида зонгорина в тесте подвешивания за хвост и антиамнестической активности на модели скополамин-индуцированной амнезии.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на мышах-самках CD1 и мышах-самцах линии СВА. Животные получены из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. Исследования проводили в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), Приказом МЗСР РФ №708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики», Федеральным Законом от 12 апреля 2010 г. №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Объектом исследования служил дитерпеновый алкалоид зонгорин, выделенный по стандартной методике из надземной части аконита байкальского (Погодаева Н.Н. и др., 2000). В качестве препаратов сравнения использовали ортофен (10 мг/кг) и парацетам (100 мг/кг). Зонгорин в дозах 5, 25 и 100 мкг/кг и препараты сравнения вводили животным курсом ежедневно в течение пяти дней последний раз за 1 ч до повреждающего воздействия. Животные в группе контроля получали эквивалентное количество воды очищенной. Обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t критерия Стьюдента, непараметрического U критерия Вилкоксона-Манна-Уитни и углового преобразования Фишера (φ) с помощью пакета программ Statistica 6.0. Антидепрессантную активность изучали в тесте подвешивания за хвост (ТПХ) (Steru L. et al., 1985). Критерием антидепрессантной активности служило статистически значимое снижение времени иммобилизации у опытных животных относительно контроля. По завершении тестирования моделировали острую экссудательную реакцию. Животным под апоневроз стопы вводили 0,05 мл раствора сульфатсеротонинкреатинина (“Reanal”), разведенного в 0,9% NaCl до концентрации 0,5 мг/мл. Через 60 минут после субапоневротического введения серотонина и эквивалентной инъекции 0,9% NaCl в контралатеральную стопу проводили экзартикуляцию в голеностопных суставах. Выраженность воспалительного отека оценивали гравиметрически и выражали в процентах от прироста массы стопы, в которую вводили серотонин. Дополнительно изучали влияние зонгорина на поведение мышей в тесте “открытое поле” (Буреш Я. и др., 1991). В качестве интегральных критериев оценивали: суммарную двигательную активность, ориентировочно-исследовательскую активность (число стоек и обследований норки) и эмоциональную реакцию по Brady.

Для изучения влияния зонгорина на амнезирующее действие холиноблокатора за 20 минут до выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) всем мышам, кроме интактного контроля, вводили подкожно скополамин в дозе 2,5 мг/кг, вызывая нарушение формирования памяти (Шабанов П.Д., Бородкин Ю.С., 1989). Проверку рефлекса проводили через 48 ч после выработки, а также на 9-е и 16-е

сутки эксперимента. Выработку УРПИ осуществляли по стандартной методике, основанной на подавлении врожденного безусловного рефлекса предпочтения темного пространства, имеющегося у грызунов (Миронов А.Н., 2013). Об эффекте исследуемых веществ судили по количеству животных с выработанным рефлексом.

Результаты. Установлено, что введение животным зонгорина изменяло латентный период иммобилизации и длительность “поведения отчаяния” в тесте подвешивания за хвост. Так, под действием зонгорина отмечалась устойчивая тенденция к увеличению времени до начала периода неподвижности, а время иммобилизации уменьшалось на 45,5% (табл. 1).

Таблица 1. Влияние превентивного курсового введения зонгорина на антидепрессантную активность у беспородных мышей-самок CDI в условиях ТПХ ($X \pm m$)

Группа	Латентный период иммобилизации, с	Суммарное время иммобилизации, с
1. Контроль (n=10)	62,3±17,2	118,9±13,8
2. Ортофен, 10 мг/кг (n=6)	40,3±10,5	132,3±17,5
3. Зонгорин, 25 мкг/кг (n=6)	102,7±24,5*	64,8±17,1*#

Примечание. $p < 0,05$ в сравнении *с контролем, # с ортофеном.

Периферическое введение мышам серотонина приводило к развитию воспаления у мышей. Применение исследуемых веществ способствовало уменьшению выраженности серотонинового отека. При использовании зонгорина прирост массы конечности уменьшался в 1,5 раза, а введение ортофена снижало отек в 2,3 раза относительно контроля. Продолжительность иммобилизации в ТПХ может изменяться не только под влиянием антидепрессантного эффекта исследуемых веществ, но и при наличии у них психостимулирующей или психоседативной активности. Для выяснения возможных сопутствующих психоседативного и психостимулирующего эффектов проводили исследование в тесте “открытое поле”. Было обнаружено, что зонгорин существенно не изменял эмоциональную реакцию, суммарную двигательную активность и ориентировочно-исследовательское поведение. Процесс выработки УРПИ показал, что под действием скополамина происходило нарушение когнитивных функций у мышей, выражающееся в значительном удлинении латентного времени захода в темную камеру (ТК). Назначение пиретама не приводило к коррекции латентного времени захода в ТК, а у животных, получавших зонгорин в дозах 5 и 25 мкг/кг, отмечалась отчетливая тенденция к снижению этого показателя, а в дозе 100 мкг/кг обеспечивало достоверное снижение латентного времени в 1,5 раза относительно негативного контроля. В ходе проверки сохранности рефлекса через 48 часов было установлено, что у большинства животных (88%) в интактном контроле УРПИ воспроизводился, тогда как в негативном (скополаминовом) контроле наблюдалась полное нарушение воспроизведения рефлекса – все животные в этой группе заходили в ТК. Под действием пиретама достоверно улучшалось воспроизведение условного рефлекса – у 63% животных УРПИ сохранялся (табл. 2). Превентивное внутрижелудочное введение мышам зонгорина в дозах 5, 25 и 100 мкг/кг обеспечивало воспроизведение УРПИ у 63, 38 и 50% животных соответственно (табл. 2). Оценивая сохранность УРПИ в более поздние сроки исследования (9-е сутки эксперимента), мы установили, что в группе интактного контроля воспроизведение рефлекса оставалось на прежнем уровне (88%), а у животных, получавших пиретама – только у 25% мышей (табл. 2). Применение зонгорина во всех исследуемых дозах способствовало сохранности рефлекса у 38 – 50% животных (табл. 2). На 16-е сутки тестирования сохранность рефлекса регистрировалась у 75% интактных животных (табл. 2). Назначение мышам препарата сравнения не обеспечивало достоверного воспроизведения рефлекса к этому времени. Курсовое превентивное введение дитерпенового алкалоида зонгорина в дозах 5 и 25 мкг/кг способствовало статистически значимой относительно негативного контроля сохранности УРПИ у мышей (38 и 25% соответственно) даже в столь отдаленные сроки исследования (табл 2).

Таблица 2. Влияние превентивного курсового введения зонгорина на сохранность УРПИ у мышей-самцов СВА на фоне подкожного введения холиноблокатора скополамина ($X \pm m$)

Группа	% животных с сохранившимся рефлексом		
	48 часов	9-е сутки	16-е сутки
1. Контроль интактный (n=8)	88*	88*	75*
2. Контроль + СК (n=9)	0	0	0
3. Пиретама, 100 мг/кг + СК (n=8)	63*	25*	13
4. Зонгорин, 5 мкг/кг + СК (n=8)	63*	50*	38*
5. Зонгорин, 25 мкг/кг + СК (n=8)	38*	38*	25*
6. Зонгорин, 100 мкг/кг + СК (n=8)	50*	50*	13

Примечание. $p < 0,05$ в сравнении *с контролем+ СК.

Заключение. Таким образом, в наших исследованиях выявлены выраженные антидепрессантные свойства при курсовом превентивном применении дитерпенового алкалоида зонгорина, что вероятно достигается за счет сдвигов чувствительности к серотонину. Антиамнестическая активность зонгорина на фоне введения холиноблокатора скополамина демонстрирует отчетливое корректирующее влияние алкалоида в условиях

нарушений холинергической системы. Возможно антигипоксические свойства (Нестерова Ю.В. и др., 2008б) и церебропротекторная активность зонгорина (Зюзьков Г.Н. и др., 2014), вносят свой вклад в реализацию антиамнестического действия.

Литература

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа; 1991. 398 с.
2. Волчегорский И.А., Тренина Е.А. Антидепрессивная активность р-лактамных антибиотиков и их влияние на выраженность серотонинового отека. *Бюллетень экспериментальной биологии*. 2006; 142 (7):82–85.
3. Зюзьков Г.Н., Суслов Н.И., Лосев Е.А. Ермолаева Л.А., Жданов В.В., Удут Е.В., Мирошниченко Л.А., Симанина Е.В., Демкин В.П., Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Удут В.В., Минакова М.Ю., Дыгай А.М. Церебропротекторные и регенераторные эффекты алкалоида Z77 в условиях ишемии головного мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии*. 2014; 158 (9):339–343.
4. Нестерова Ю.В., Поветьева Т.Н., Нагорняк Ю.Г., Андреева Т.И., Суслов Н.И. Влияние биологически активных веществ из живокости высокой на развитие острого воспаления разного генеза. *Бюллетень экспериментальной биологии*. 2008а; 145 (6):671–674.
5. Нестерова Ю.В., Поветьева Т.Н., Суслов Н.И., Пушкарский С.В., Нагорняк Ю.Г., Андреева Т.И., Пашинский В.Г. Создание новых лекарственных препаратов на основе алкалоидов и флавоноидов из растений Сибири. *Бюллетень экспериментальной биологии*. 2008б; прил. 2:30–36.
6. Погодаева Н.Н., Жапова Ц., Верещагин А.Л., Горшков А.Г., Семенов А.А. Изучение алкалоидного состава некоторых видов сибирских аконитов. *Растительные ресурсы*. 2000; 2: 79–84.
7. Порошина, Е. Г. Антидепрессанты в практике терапевта: учебно-методическое пособие. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова; 2019. 52 с.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2013. 944 с.
9. Шабанов П.Д., Бородкин Ю.С. Нарушения памяти и их коррекция. Л.: Наука: Ленинград. отделение; 1989. 126 с.
10. Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P. The Tail Suspension Test: A New Method for Screening Antidepressants in Mice. *Psychopharmacol.* 1985; 5:367–370.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К УПРАВЛЕНИЮ НЕЙРОГЕНЕЗОМ

А.Б. Салмина^{1,2*}, Ю.К. Комлева², О.Л. Лопатина², Ю.А. Панина², Н.А. Малиновская²

¹Научный центр неврологии, г. Москва, Россия

²Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, Россия

e-mail: allasalmina@mail.ru

Ключевые слова: нейропластичность, нейрогенез, развитие головного мозга, обучение и память

Введение. В дополнение к известным и достаточно хорошо изученным механизмам нейрогенеза во взрослом мозге, связанным с активностью нейрогенных ниш (прежде всего, субвентрикулярной и субгранулярной), накапливаются экспериментальные данные о возможной роли в поддержании процессов генерации новых нейронов из активированной астроглии (F. Casse et al., 2018) и из нейронов с пролонгированной незрелостью, которые формируются у мышей, начиная с 11 дня эмбрионального развития, и в постнатальном периоде могут дифференцироваться до зрелых нейронов (D.A. Berg et al., 2019). Эта популяция незрелых нейронов экспрессирует полисиалинированную нейрональную молекулу клеточной адгезии PSA-NCAM и даблкортин DCX, но не экспрессирует маркеры пролиферации (например, Ki-67) или маркеры зрелых нейронов (например, NeuN) (C. La Rosa et al., 2019). Существуют предположения о том, что png-INs выступают в качестве клеточного резерва, играющего существенную роль в реализации феномена нейропластичности, например, при обучении и запоминании (C. La Rosa et al., 2019), однако возможности управления этим процессом пока не изучены.

Цель. Оценить, способны ли незрелые нейроны пириформной коры грызунов трансформироваться в ГАМКергические и/или глутаматергические нейроны при действии ольфакторных стимулов и социальной (ре)когниции, и как эти механизмы могут быть утилизированы для контролируемой регуляции нейрогенеза во взрослом мозге.

Материалы и методы. Экспериментальные животные (CD1 мыши) контрольной группы, у которых были осуществлены моделирование и оценка активации пириформной коры при предъявлении обонятельных стимулов в динамике постнатального развития (P2, P21, P60), анализируемые по особенностям обучения и запоминания, социального распознавания, тревожности и гипонеефагии (через 24 часа после первого предъявления) по протоколу (H.M. Schellinck et al., 2001). У этих животных в пириформной коре иммуногистохимически были изучены закономерности экспрессии ключевых маркеров png-INs (DCX, PSA-

NCAM), пролиферации (Ki67), маркеров клеток-потомков (глутаматергические и ГАМКергические нейроны) – GAD67, VGLUT, Tbr1, NeuN, а также гена раннего реагирования (c-fos) как маркера активации клеток в результате предъявления обонятельных стимулов в динамике – через 2 часа, 24 часа, 7 суток после предъявления. Визуализация изображений осуществлялась с использованием полностью автоматизированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа с водной иммерсией Olympus FV10i-W (Olympus, Япония). Для оценки поведенческого фенотипа экспериментальных животных (P21, P60) были использованы следующие тесты: приподнятый крестообразный лабиринт, открытое поле, трехкамерный лабиринт, fear conditioning, тест на гипонеофагию. Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов описательной статистики, непараметрической статистики (критерий Манна–Уитни), дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты представлены в виде $M \pm SD$ (σ), где M – среднее значение, σ – стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ и менее. Анализ изображений проводили с применением пакета программного обеспечения ImageJ.

Результаты. Установлено, что в период до 21 дня постнатального развития продолжают процессы дифференцировки клеток пириформной коры с участием нейробластов субвентрикулярного происхождения и сохранившихся с периода эмбриогенеза нейронов с пролонгированной незрелостью, не обладающих пролиферативным потенциалом. К 60 дню постнатального развития пириформная кора демонстрирует наибольшую по сравнению с другими исследованными возрастными этапами чувствительность nng-INs к обонятельным стимулам. Предъявление обонятельного стимула у животных на 60 день постнатального развития приводит к снижению количества DCX+PSA-NCAM+Ki67- незрелых нейронов (nng-INs) и увеличению экспрессии c-fos, с последующим увеличением количества DCX+PSA-NCAM+Ki67+ нейробластов и восстановлением количества DCX+PSA-NCAM+Ki67- незрелых нейронов. В то же время, ольфакторная стимуляция имеет результатом увеличение количества ГАМКергических (GAD67+) и глутаматергических (VGLUT1+) нейронов в пириформной коре, причем преобладание глутаматергических эффектов является возможным механизмом рекрутинга клеток ассоциативной памяти. Ольфакторная стимуляция у животных группы P60 моделирует элементы социального поведения, обучения и запоминания, предварительное стимулирование обонятельной системы мышей провоцирует избегание открытых пространств, предъявление обонятельного стимула приводит к более легкому восприятию болевых стимулов и лучшему их запоминанию, что, в целом, свидетельствует о том, что 60 день постнатального развития животных характеризуется высоким потенциалом нейропластичности. Это соответствует особенностям экспрессии нейронов с пролонгированной незрелостью.

Заключение. Полученные результаты подтверждают гипотезу о вовлеченности nng-INs пириформной коры головного мозга в реализацию опыт-индуцированной пластичности. Регуляция нейрогенного потенциала nng-INs представляет собой перспективное направление в фармакологической стратегии управления нейрогенезом.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), проект № 20-015-00472.

Литература

1. Berg D.A., Su Y., Jimenez-Cyrus D., Patel A., Huang N., Morizet D., Lee S., Shah R., Ringeling FR, Jain R, Epstein JA, Wu QF, Canzar S, Ming GL, Song H, Bond AM. A Common Embryonic Origin of Stem Cells Drives Developmental and Adult Neurogenesis. *Cell*. 2019;177(3):654-668.e15. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.010
2. Cassé F., Richetin K., Toni N. Astrocytes' Contribution to Adult Neurogenesis in Physiology and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018;12:432. doi:10.3389/fncel.2018.00432
3. Heather M. Schellinck, Catherine A. Forestell, Vincent M. LoLordo, A Simple and Reliable Test of Olfactory Learning and Memory in Mice. *Chemical Senses*. 2001;26(6):663–672. <https://doi.org/10.1093/chemse/26.6.663>
4. La Rosa C., Ghibaudi M., Bonfanti L. Newly Generated and Non-Newly Generated "Immature" Neurons in the Mammalian Brain: A Possible Reservoir of Young Cells to Prevent Brain Aging and Disease? *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(5):685. doi:10.3390/jcm8050685

УРОВНИ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ, ПОЛУЧАЮЩИХ КОНВЕНЦИОНАЛЬНЫЕ И АТИПИЧНЫЕ АНТИПСИХОТИКИ

В.В. Тигунцев*, И.А. Меднова, О.А. Лобачёва, Е.Г. Корнетова, С.А. Иванова

НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

e-mail: cristall2009@live.ru

Ключевые слова: шизофрения, тиреоидные гормоны, антипсихотики.

Введение. Исследования показывают, что нарушения метаболизма тиреоидных гормонов могут проявляться в виде психопатологических симптомов, включая депрессию, тревогу и психозы (Feldman A.Z. et al., 2013). По данным литературы, тиреоидные гормоны способны регулировать активность тирозингидроксилазы (Chaube R., Joy K.P., 2003), лимитирующего фермента в биосинтезе катехоламинов, а

дофамин способен ингибировать секрецию тиреотропного гормона (ТТГ). В других публикациях показано влияние уровней серотонина на уровни тиреоидных гормонов и ТТГ (Caye A. et al., 2020).

Действие антипсихотиков (АП), которые являются основным методом лечения шизофрении, направлено на снижение активности дофаминергической и серотонинергической систем. У конвенциональных и атипичных антипсихотиков несколько различается механизм действия: нейролептики первого поколения в основном являются антагонистами дофаминовых рецепторов, тогда как антипсихотики второго поколения также оказывают значительное влияние на различные подтипы серотониновых и других рецепторов. Таким образом, приём антипсихотических препаратов может повлиять на уровень гормонов гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси в сыворотке крови.

Цель. Сравнить сывороточные уровни свободного трийодтиронина (Т3св), тироксина (Т4св) и ТТГ у больных шизофренией, принимающих конвенциональные и атипичные антипсихотики в качестве базовой терапии.

Материал и методы. Было обследовано 156 пациентов с установленным диагнозом шизофрения, проходивших стационарное лечение в клиниках НИИ психического здоровья Томского НИМЦ и Томской клинической психиатрической больницы и получавших антипсихотическую терапию не менее одного года. Уровни Т3св, Т4св и ТТГ в сыворотке крови у больных шизофренией определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ELISA, АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия). Статистический анализ проводился с использованием пакета программ Statistica for Windows (версия 10.0). Статистическая обработка данных по уровням гормонов, длительности заболевания и базовой терапии проводилась с помощью U-критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Описательная статистика представлена в виде медианы (Me) с квартилями 25% и 75% (Q1; Q3). Уровень значимости был принят равным 0,05.

Результаты. Обнаружены статистически значимые различия между уровнями Т3св ($p = 0,007$) и Т4св ($p = 0,027$) в сыворотке крови в группах пациентов, получавших конвенциональные и атипичные нейролептики в качестве базовой терапии (табл. 1).

Таблица 1. Показатели тиреоидных гормонов у пациентов с шизофренией, принимающих конвенциональные и атипичные антипсихотики

Группа/показатель	Конвенциональные АП	Атипичные АП
Т3св, пкмоль/л (Me (Q1, Q3))	3,30 (2,84; 3,75)	3,60 (3,11; 5,63)*
Т4св, пкмоль/л (Me (Q1, Q3))	11,03 (9,88; 12,62)	12,15 (10,21; 15,59)*

Значимых статистических различий между длительностью заболевания и базовой терапией в исследуемых группах не было ($p = 0,13$ и $p = 0,051$ соответственно). Также не было статистически значимых различий между уровнями ТТГ в сыворотке крови в исследуемых группах.

Заключение. Наши результаты показывают, что класс принимаемых антипсихотиков вносит вклад в формирование сывороточного уровня гормонов щитовидной железы. Поскольку Томская область характеризуется повышенной частотой эндемического зоба (Kornetova E.G. et al., 2020), дальнейшие исследования по этой теме, в том числе проспективные, могут способствовать разработке программ индивидуального лечения больных шизофренией с учётом данных эндокринологического обследования.

Литература

1. Caye A., Pilz L.K., Maia A.L., Hidalgo M.P., Furukawa T.A., Kieling C. The impact of selective serotonin reuptake inhibitors on the thyroid function among patients with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *European Neuropsychopharmacology*. 2020;33:139–145. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2020.01.011.
2. Chaube R., Joy K. P. Thyroid hormone modulation of brain in vivo tyrosine hydroxylase activity and kinetics in the female catfish *Heteropneustes fossilis*. *Journal of Endocrinology*. 2003;179(2):205–215. DOI: 10.1677/joe.0.1790205.
3. Feldman A.Z., Shrestha R.T., Hennessey J.V., 2013. Neuropsychiatric manifestations of thyroid disease. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2013;42(3):453–476. DOI: 10.1016/j.ecl.2013.05.005.
4. Kornetova E.G., Kornetov A.N., Mednova I.A., Lobacheva O.A., Gerasimova V.I., Dubrovskaya V.V., Tolmachev I.V., Semke A.V., Loonen A.J.M., Bokhan N.A., Ivanova S.A. Body Fat Parameters, Glucose and Lipid Profiles, and Thyroid Hormone Levels in Schizophrenia Patients with or without Metabolic Syndrome. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(9):683. DOI: 10.3390/diagnostics10090683.

ВЛИЯНИЕ КОФЕИНА НА КРАТКОВРЕМЕННУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА ПРИ СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ АТАКСИИ 1 ТИПА

А.Н. Шуваев^{1*}, О.С. Белозор¹, Я.В. Фрицлер², А.Н. Шуваев²

¹НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Россия

²Базовая кафедра медико-биологических систем и комплексов, Сибирский Федеральный Университет, г. Красноярск, Россия

e-mail: shuvaevanton@hotmail.com

Ключевые слова: атаксия, синаптическая пластичность, кофеин, нейродегенерация мозжечка.

Введение. Спиноцеребеллярная атаксия 1 типа (СЦА1) это неуклонно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое манифестирует, как нарушение координации. В последствии присоединяются такие осложнения, как нарушение дыхания и глотания, что является непосредственной причиной смерти таких больных. Молекулярной основой данного состояния является мутация в гене AXN1, приводящая к экспрессии мутантного белка Атаксина 1 (Ort et al., 2012). Такой белок неспособен взаимодействовать с регулятором транскрипции генов RoR α и вызывает выраженное нарушение транскрипции генов, участвующих в важных процессах жизнедеятельности клетки. Так происходит подавление генов, mGluR и IP3R – ключевых звеньев в Ca²⁺ пути передачи сигналов, важных для развития синаптической пластичности в нейронах мозжечка (Serra et al., 2006). Для изучения функциональных нарушений в данных синапсах при СЦА1, мы использовали классическую трансгенную «knock inn» мышиную модель (Watase et al., 2002) и обнаружили нарушение Ca²⁺ сигнализации в клетках Пуркинье (КП) мозжечка. Следствием этого нарушения мы наблюдали сокращение кратковременной синаптической пластичности, такой как DSE. Изучение сложной Ca²⁺ сигнализации позволило выявить молекулы-мишени, восстанавливающие DSE в обход классических патогенетических механизмов, имеющих место при СЦА1. Мы выявили, что кофеин, блокатор аденозиновых A1 рецепторов, косвенно усиливает поступление Ca²⁺ через NMDA рецепторы, расположенные на мембране КП и вызывает увлечение DSE. Нами были показаны новые патогенетические механизмы при СЦА1 и потенциальные терапевтические средства, восстанавливающие синаптическую пластичность нейронов мозжечка – молекулярных процессов, которые лежат в основе памяти и обучения двигательным навыкам.

Цель. Выявить и усилить новые пути Ca²⁺ передачи сигналов в обход классическим нарушениям при СЦА1.

Материалы и методы. Исследование было проведено на 12 мышах трансгенной СЦА1 модели, экспрессирующей 154 CAG повтор в гене ATX1 (SCA1 KI) (Watase et al., 2002) и на 48 их однопомётных родственных животных дикого типа. В эксперименте использовались мыши в возрасте 12 недель. Регистрация DSE производилась с помощью метода локальной фиксации потенциала (метод patch clamp) со стандартными внутри- и внеклеточными растворами (Shuvaev et al., 2021). Для этого в режиме whole cell производилась регистрация контрольного уровня возбуждающих постсинаптических токов КП при раздражении параллельных волокон (ПВ ВПСТ). После глубокой деполяризации КП (0мВ в течение 5 сек) происходило уменьшение амплитуды ПВ ВПСТ относительно контрольных значений. Для изучения путей передачи Ca²⁺ использовались следующие блокаторы во внутриклеточной жидкости: EGTA 10mM и МК801 1mM; во внеклеточной жидкости: кофеин 20 mM и нифедипин 10 μ M. Все препараты фирмы Sigma Aldrich. Статистическая обработка парных выборок производилась с помощью t-теста с поправкой Бонферрони. Обработка выборок с тремя рядами данных производилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one way ANOVA post hoc test). Статистическая достоверность была значима при p<0.05. Исследование выполнено при финансовой поддержке регионального конкурса на лучшие проекты междисциплинарных фундаментальных научных исследований, проводимого совместно РФФИ и правительством Красноярского края в рамках (р_мк Красноярск) научного проекта № 20-415-242905.

Результаты. У трансгенных СЦА1 мышей нормированный к контрольному уровню амплитуд ПВ ВПСТ непосредственно после деполяризации (DSE) составил 84.6 \pm 4.2% относительно животных дикого типа 43.3 \pm 5.8%, p<0.001 (рисунок 1А). Данное состояние моделируется уменьшением концентрации свободного внутриклеточного Ca²⁺ с помощью хелатора EGTA. В его присутствии первая нормированная амплитуда ПВ ВПСТ составила 74,2 \pm 4,8% и значительно отличалась от контрольных значений (p<0.001) (Рис. 1В). Нарушение поступления Ca²⁺ в КП при деполяризации было смоделировано посредством добавления нифедипина, блокатора L типа потенциал зависимых Ca²⁺ каналов (VGCC). В его присутствии первая нормированная амплитуда ПВ ВПСТ составила 70,6 \pm 6,6% и значительно отличалась от контрольных значений (p<0.05). Последующее введение кофеина полностью нивелировало данный негативный эффект (p>0.05 относительно контрольной группы) (рисунок 2А). Нарушение поступления Ca²⁺ через NMDA рецепторы КП удалось достигнуть посредством внутриклеточного введения МК801. В его присутствии первая нормированная амплитуда ПВ ВПСТ составила 65,8 \pm 5,0% и значительно отличалась от контрольных значений (p<0.01). Последующее введение кофеина не влияло на данный негативный эффект (p>0.05 относительно выше указанной группы) (рис. 2В).

Заключение. При отсутствии патогенетической терапии СЦА1, фармакологические препараты, широко используемые в повседневной практике, такие как кофеин, могут безопасно частично компенсировать нарушение функции мозжечка. Нами было выявлено нарушение кратковременной синаптической

пластичности, вызванной деполяризацией КП (DSE) в модели трансгенных СЦА1 животных (рисунок 1). Данный тип синаптической пластичности вызывается исключительно моногенным фактором (деполяризацией) и не зависит от других дополнительных факторов, таких как активация метаботропных рецепторов и содружественное перераздражение пресинаптических волокон (Lüscher and Huber, 2010; Ohtsuki et al., 2009). Однако даже такие «идеальные» условия, как изолированное потенциальное поступление Ca^{2+} в КП обусловлено работой сразу нескольких ионотропных рецепторов. Мы показали, что увеличить свободный Ca^{2+} в КП можно в присутствии кофеина опосредованно активируя NMDA рецепторы (рисунок 2). Связь между аденозиновыми A1 и NMDA рецепторами была описана ранее в других зонах мозга (Manzoni et al., 1994), но в СЦА1 модели была описана впервые нами. Полученные данные позволяют изучить нарушение более сложных форм синаптической пластичности в клетках мозжечка, лежащих в основе формирования двигательных функций.

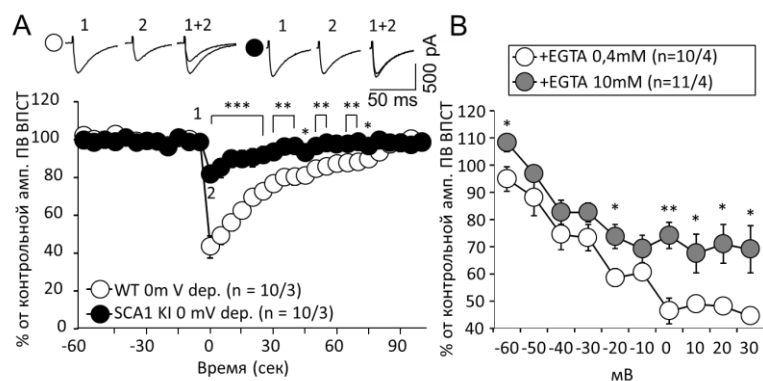


Рис. 1. Нарушение DSE в КП трансгенных СЦА1 мышей. (А) Усреднённый график нормированных амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации в 0мВ (DSE). На верхней вкладке представлены репрезентативные кривые ПВ ВПСТ животных дикого типа (WT – белый круг) и СЦА1 (SCA1 KI – чёрный круг). (В) Усреднённый график зависимости амплитуд ПВ ВПСТ от степени деполяризации от -60 до +30мВ в присутствии низкой (0,4mM) (белые круги) и высокой (10mM) (серые круги) концентрации EGTA

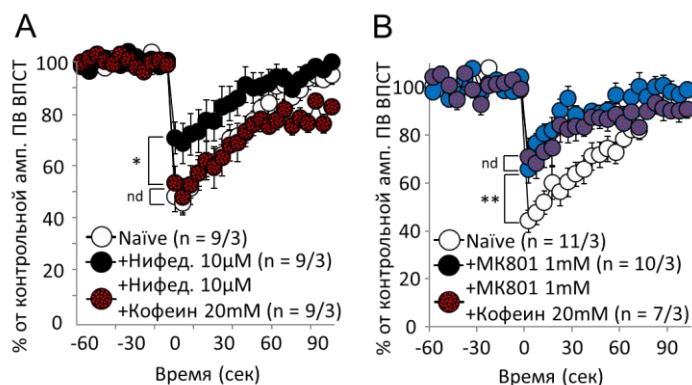


Рис. 2. Кофеин вызывает усиление поступления Ca^{2+} в КП в ответ на деполяризацию её мембраны при инициации DSE. (А) Усреднённый график нормированных амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации 0мВ (DSE) у контрольных животных (Naïve – белые круги), в присутствии нифедипина (чёрные круги) и кофеина (чёрные круги с красными вкраплениями). Добавление кофеина полностью нивелирует эффект блокады L-типа VGCC. (В) Усреднённый график нормированных амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации 0мВ (DSE) у контрольных животных (Naïve – белые круги), в присутствии МК801 (синие круги) и кофеина (фиолетовые круги с красными вкраплениями). Добавление кофеина отсутствует на фоне блокады NMDA рецепторов КП

Литература

1. Lüscher C., Huber K.M. Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease. *Neuron*. 2010;65(4):445-459. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.016
2. Manzoni O.J., Manabe T., Nicoll R.A. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science*. 1994;265(5181):2098-101. doi: 10.1126/science.7916485. PMID: 7916485.
3. Ohtsuki G., Piochon C., Hansel C. Climbing fiber signaling and cerebellar gain control. *Front Cell Neurosci*. 2009;3:4. doi:10.3389/neuro.03.004.2009
4. Orr H.T. SCA1-phosphorylation, a regulator of Ataxin-1 function and pathogenesis. *Prog Neurobiol*. 2012;99(3):179-85. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.04.003. Epub 2012 Apr 16. PMID: 22531670; PMCID: PMC3408849

5. Serra H.G., Duvick L., Zu T., Carlson K., Stevens S., Jorgensen N., Lysholm A., Burrig E., Zoghbi H.Y., Clark H.B., Andresen J.M., Orr H.T. RORalpha-mediated Purkinje cell development determines disease severity in adult SCA1 mice. *Cell*. 2006;127(4):697-708. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.036. PMID: 17110330
6. Shuvaev A.N., Belozor O.S., Mozhei O., Yakovleva D.A., Potapenko I.V., Shuvaev A.N., Smolnikova M.V., Salmin V.V., Salmina A.B., Hirai H., Teschemacher A.G., Kasparov S. Chronic optogenetic stimulation of Bergman glia leads to dysfunction of EAAT1 and Purkinje cell death, mimicking the events caused by expression of pathogenic ataxin-1. *Neurobiol Dis*. 2021;154:105340. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105340. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33753288.
7. Watase K., Weeber E.J., Xu B., Antalffy B., Yuva-Paylor L., Hashimoto K., Kano M., Atkinson R., Sun Y., Armstrong D.L., Sweatt J.D., Orr H.T., Paylor R., Zoghbi H.Y. A long CAG repeat in the mouse Scn1l locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron*. 2002;34(6):905-19. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00733-x. PMID: 12086639.

Регенеративная медицина и клеточные технологии

CALCIUM PHOSPHATE COATINGS TO IMPROVE BIOCOMPATIBILITY OF POLYETHERETHERKETONE WITH BONE TISSUE

I.O. Akimchenko*, G.E. Dubinenko, S.I. Tverdokhlebov

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

e-mail: akimchenko.igor@gmail.com

Key words: polyetheretherketone, hydroxyapatite, titanium, coatings, surface modification.

Abstract. Polyetheretherketone (PEEK) is a high temperature, biocompatible, radiolucent semi-crystalline polymer. PEEK has outstanding mechanical and chemical properties. Compared to titanium (Ti) PEEK has a lower density and elasticity and it is similar in biomechanical properties to cortical bone. However, PEEK is chemically inert and does not allow protein adsorption and promote cell adhesion and bone contact. In order to improve the bioactive properties, studies are underway on the volume and surface modification of PEEK. One of the most common modification materials for PEEK is hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). The chemical composition of HA corresponds to the inorganic phase of the bone, therefore, it has bioactive and osteoconductive properties, can form a direct chemical bond with human bone, and widely used for bone tissue regeneration. In this work, ion-plasma coating methods were used to modify the surface (direct current magnetron sputtering, DC; radio frequency magnetron sputtering, RFMS). Two series of coatings were produced on the PEEK surface: a single layer calcium phosphate (CaP) coating and a CaP coating with a Ti intermediate layer to improve adhesion between the PEEK and CaP coating.

Aim of Research. Determination of the sputtering modes for the formation of coatings on the PEEK surface by ion-plasma sputtering methods.

Materials and Methods. PEEK samples (TECAPEEK, Ensinger, Nufringen, Germany) with a diameter of 10 mm and a height of 3 mm were used as substrates for coating. The substrates were ground on abrasive paper of grit P2000 and polished with diamond suspension at a speed of 250 rpm for 30 minutes. Then they were cleaned with ultrasound (PSB-5735-05 Ultrasonic equipment, PSB-Gals, Moscow, Russia) in acetone (extra high purity, EKOS-1, Moscow, Russia) and isopropyl alcohol (extra high purity, EKOS-1, Moscow, Russia) for 10 minutes and washed in distilled water. After cleaning, the samples were placed for 12 hours in a vacuum oven (VTS-K24-250, Aktan, Moscow, Russia) at 70°C and a pressure of 0.5 Pa. For the coatings deposition we used a “Cathode-1M” magnetron system containing direct current (DC) magnetron and radio frequency magnetron sputtering (RFMS) magnetron. The installation allows the formation of multilayer coatings without opening (de-evacuating) the chamber. Titanium target was “cleaned” in DC mode in an argon atmosphere and a current of 2 A for 2 minutes. The Ti coating was formed by the DC Ti target method at a current of 1 A in an argon atmosphere and a pressure of 0.9 Pa. CaP films were fabricated by RFMS method of pressed target made of hydroxyapatite (HAP). Chamber pressure was 0.5 Pa. The distance from the substrate to the target was 40 mm, the erosion zone was 190 cm². The thickness of the coatings were evaluated on silicon samples of witnesses using the spectral ellipsometric complex “Ellips-1891 SAG” (NPK “Nanotechnology Center”, Novosibirsk, Russia). Surface topography and elemental composition were studied by scanning electron microscopy (SEM) on a Quanta 200 3D microscope (FEI Company, Hillsboro, USA) equipped with an energy dispersive X-ray spectroscope (EDX; JSM-5900LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Before studying the surface topography, the samples were coated with a layer of gold using a Jeol Smart Coater magnetron system (Jeol Ltd., Tokyo, Japan). The wettability experiments were done using a Krüss Drop Shape analyzer unit in a laboratory conditions. For each sample, 3 different points were examined using 3 µl drop of one polar liquid – water. The drop was allowed to sit for 1 min before recording the contact angle. Ca/P ratio was determined using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (iCAP 6300 Duo, Thermo Fisher Scientific, Cambridge, England).

Results. The value of the RFMS power was determined at 400 W at which the PEEK substrate does not overheat above the glass transition temperature (143°C). In this work, two series of coatings were made: the first is a single-layer CaP coating (hereinafter SCaP), the second is a CaP coating with a Ti intermediate layer (TiCaP). In both series, CaP coatings were formed in three time intervals: 30 min, 60 min, and 120 min. The thicknesses of the CaP coatings with sputtering times of 30, 60, and 120 min were 6.5 ± 0.1 , 8.0 ± 0.2 , and 8.7 ± 0.1 nm, respectively, and the thickness of the titanium sublayer was 11.3 ± 0.1 nm.

Figure 1 shows the topography of the polished PEEK surface and the fabricated CaP coatings. The surface of the polished sample (Figure 1a) has minor scratches due to the abrasion of the surfaces. SCaP and TiCaP coatings are different. SCaP coatings (Figure 1b-d) are represented by a system of micrograins, without cracks and delamination. As the deposition time of the coatings increases, the amount of micrograins increases. Visually, the coatings are matte. Micrograins of the coating were removed even with a slight tangential impact. The surface of TiCaP coatings (Figure 1e-g) is smoother, without visible micro-grains. Visually, the coatings are glossy and do not deteriorate under tangential mechanical stress.

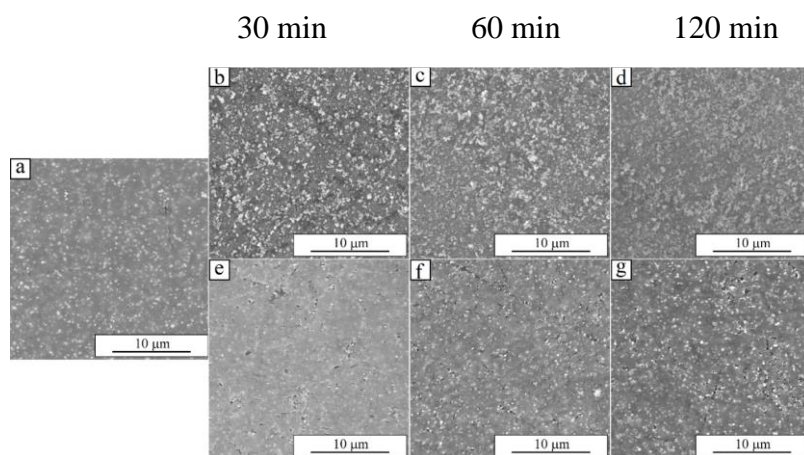


Fig. 1. SEM images of, (a) polished PEEK, (b-d) SCaP and (e-g) TiCaP coatings

Figure 2 shows the results of measurements of the water contact angle (CA). The highest CA corresponds to polished PEEK. Within a minute of measurement, the wettability value did not change. On samples with coatings, the CA value decreases with increasing coating time. The smallest value at 0° was observed on samples with a single layer of CaP coating, formed within 2 hours. Compared to single-layer coatings, two-layer coatings have less hydrophilic properties. Comparing these two groups, CA of wetting on TiCaP coatings is on average 9.8° higher.

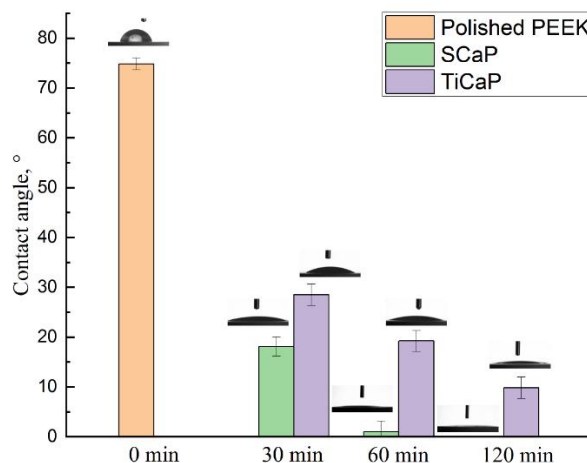


Fig. 2. Contact angle of water on polished PEEK, SCaP and TiCaP coatings

Table 1 shows the results of optical emission spectroscopy. TiCaP coatings have a higher Ca/P ratio than SCaP. This effect can be explained by the build-up of a negative charge on the insulation PEEK surface prevented re-sputtering of the P species on the surface (Hussain S. et al., 2020).

Table 1. Element composition of SCaP and TiCaP coatings and Ca/P ratio

№	Sample	Ca, mg/l	P, mg/l	Ca/P
1	SCaP 30 min	0,42 ± 0.05	0,27 ± 0.01	1,56
2	SCaP 60 min	0,62 ± 0.02	0,12 ± 0.02	5,07
3	SCaP 120 min	0,44 ± 0.03	0,15 ± 0.01	2,94
4	TiCaP 30 min	0,15 ± 0.02	0,02 ± 0.01	7,79
5	TiCaP 60 min	0,39 ± 0.03	0,05 ± 0.01	7,98
6	TiCaP 120 min	0,24 ± 0.03	0,01 ± 0.01	18,62

Conclusion. In this work, surface modification of PEEK was carried out using vacuum-plasma methods. modification of the PEEK surface has a huge effect on the wettability, the hydrophobic polymer surface turns into a more hydrophilic one, which will have a beneficial effect on the behavior of osteoblasts.

This research was supported by TPU development program.

References

1. Hussain S., Rutledge L., Acheson J.G., Meenan B.J., Boyd A.R. The Surface Characterisation of Polyetheretherketone (PEEK) Modified via the Direct Sputter Deposition of Calcium Phosphate Thin Films. *Coatings*. 2020;10(11): 1088.

ГИБРИДНЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ ПОКРЫТИЯ ОСТЕОСТИМУЛИРУЮЩИХ ИМПЛАНТАТОВ ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ

К.Н. Верзунова*, А.И. Козельская, С.И. Горенинский, Е.А. Солдатова, С.И. Твердохлебов

Томский политехнический университет, г. Томск, Россия

e-mail: shumskaya_k@mail.ru

Ключевые слова: кальций-фосфатные покрытия, микродуговое оксидирование, имплантат, остеопороз.

Введение. Остеопороз – наиболее распространенное возрастное хроническое заболевание скелета, при котором происходит уменьшение его плотности (массы костной ткани в единице ее объема), сопровождающееся нарушением его структуры. Остеопоротические переломы обуславливают большие материальные затраты в области здравоохранения и приводят к высокому уровню нетрудоспособности, включая инвалидность и смертность (Mackey P.A., Whitaker M.D., 2015). В свою очередь, операция соединения отломков костей с помощью специальных накостных и внутрикостных имплантатов у пациентов с остеопорозом, связана с большим риском развития осложнений вследствие нестабильной внутренней фиксации имплантата, что вызвано ослаблением связи между имплантатом и костью из-за резорбции кости на границе раздела (Giro G., 2015; Corcuera-Flores J.R. et al., 2016). Поэтому, во многих случаях, пациентам с остеопорозом требуется повторное хирургическое вмешательство. Чтобы улучшить фиксацию и заживление переломов костей, а также способствовать регенерации естественных тканей у пациентов с остеопорозом, в течение многих лет развиваются новые стратегии в области тканевой инженерии для разработки функциональных заменителей поврежденных или пораженных тканей посредством сложных конструкций с живыми клетками, биоактивными молекулами и трехмерными каркасами, которые могут поддерживать прикрепление, пролиферацию и дифференцировку клеток (Ong K.L. et al., 2010; Sowjanya J.A. et al., 2013).

Цель. Целью данной работы являлось разработка гибридных покрытий на основе фосфатов кальция и слоя биоразлагаемого полимера, содержащего анти-остеопорозные препараты, способных эффективно интегрироваться в костную ткань, предотвращая развитие остеопороза.

Материалы и методы. В качестве подложек для нанесения покрытий были использованы титановые диски марки ВТ6 (Ti6Al4V) диаметром 10 мм и толщиной 1 мм. Перед нанесением покрытий поверхность образцов подвергалась химическому травлению в водном растворе азотной и плавиковой кислот, взятых в объемных отношениях $\text{HNO}_3:\text{HF}:\text{H}_2\text{O}=1:2,5:2,5$, при температуре 15-20°C в течение 10-15 секунд с последующей нейтрализацией в 1 % водном растворе гидроксида натрия и многократной промывкой дистиллированной водой. Формирование кальций-фосфатных покрытий методом микродугового оксидирования (МДО) проводилось на установке «Комплекс микродугового оксидирования» (КМДО), разработанной в Лаборатории плазменных гибридных систем НОЦ Б.П. Вейнберга ИЯТШ ТПУ. В качестве электролита использовали раствор ацетата кальция одноводного и фосфата натрия однозамещенного одноводного в количестве 36,8 г/л и 15,6 г/л, соответственно. Фосфаты стронция и магния были добавлены в состав электролита в количестве 4,5 г/л и 2,6 г/л, соответственно. Параметры формирования пористых

кальций-фосфатных покрытий методом МДО были следующими: напряжение – 500 В, скорость подъема напряжения – 3 В/сек, частота следования импульсов – 500 Гц, длительность импульса 400 мкс, время формирования покрытий – 5 минут. В качестве материала полимерной матрицы использовали поливинилпирролидон (ПВП) и сополимер молочной и гликолевой кислот. В качестве противоостеопоротических препаратов, в полимерные покрытия были добавлены: золендроновая кислота (в покрытие на основе ПВП) и ловастатин (в покрытие на основе сополимера молочной и гликолевой кислот) в концентрациях 0,1, 0,5 и 1 масс. %. Полимерные покрытия на основе ПВП и сополимера молочной и гликолевой кислот наносили из 5 мл 2,5% растворов полимеров (по массе) в смеси этанол/вода (1/1) и в гексафторизопропанол, соответственно, в течение 10 минут под воздействием ультразвука в ультразвуковой ванне «Сапфир УЗВ 4,0/1» (Сапфир, Россия). По прошествии 10 минут, образцы промакивали фильтровальной бумагой. После этого, образцы сушили в течение 2 дней над хлоридом кальция. Исследование толщины покрытий проводилось вихретоковым методом с использованием прибора КОНСТАНТА 5, (Constanta, Россия). Исследование шероховатости покрытий осуществлялось с использованием профилометра «Talysurf 5-120» (Taylor-Hobson, Англия). Численная оценка шероховатости поверхности оценивалась по параметрам (Ra) и (Rz), по среднему арифметическому отклонению профиля поверхности и высоте неровностей профиля по десяти точкам, соответственно. Исследование морфологии материалов проводили на электронном микроскопе JCM-6000 (JEOL, Япония), в режиме низкого вакуума с использованием детектора обратно отраженных электронов, с предварительно нанесенным на образцы тонким слоем золота на установке SmartCoater (JEOL, Япония). Элементный состав покрытий определяли методом энергодисперсионного анализа (EDS) на приборе Quanta 200 3D (FEI Company, США). Фазовый состав покрытий был исследован методом рентгенодифракционного анализа на рентгеновском дифрактометре Shimadzu XRD 6000 (Shimadzu, Япония) на CuK α -излучении. Исследование выхода противоостеопоротических препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили на хроматографе Agilent 1100 (Agilent, США). **Результаты.** Средняя толщина кальций-фосфатных покрытий, сформированных с помощью МДО, составляет ~ 15 мкм. Элементный состав образцов представлен в таблице 1. Как видно из таблицы, покрытия содержат элементы, входящие в состав электролита и титановой подложки. Следует отметить, что соотношение Ca/P МДО покрытий составляет ~ 1,6.

Таблица 1. Элементный состав покрытий, сформированных методом МДО

С	О	Mg	Al	Sr	P	Ca	Ti
5,65±0,78	49,03±0,71	1,39±0,12	2,12±0,72	1,11±0,17	8,99±2,00	14,09±2,37	17,63±4,03

Морфология поверхности МДО-покрытий представлена большим количеством пор, размер которых варьируется от 0,5 до 5 мкм (рисунок 1а). Поры расположены равномерно по всей поверхности образцов. Методика нанесения полимерных покрытий с инкорпорированными в них лекарственными препаратами была разработана таким образом, чтобы сохранить исходную шероховатость образцов. Поэтому, как видно из рисунков 1б, в нанесение на поверхность полимерного материала не приводит к значительному изменению ее морфологии.

Сохранение пористой морфологии будет способствовать усилению связывания имплантата с костной тканью. Кроме того, относительно большая поверхность покрытий обеспечит большое количество точек крепления для роста клеток на их поверхности (Akin F.A. et al., 2001).

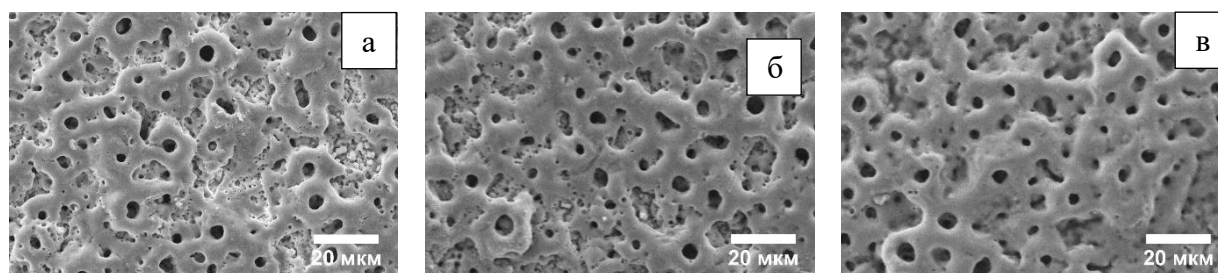


Рис. 1. СЭМ-изображение поверхности КФ-покрытия, сформированного методом МДО на поверхности титановой подложки (а), и гибридных покрытий с ПВП (б) и сополимером поли(молочной) и поли(гликолевой) кислот (в)

Исследования фазового состава МДО-покрытий продемонстрировали их рентгеноаморфную природу. Известно, что рентгеноаморфные покрытия характеризуются более высокой скоростью растворения (Махian S.H. et al., 1993). Это будет способствовать интенсивному образованию фосфатов кальция на поверхности материала, что особенно важно в первые 3 недели после имплантации. Предварительные

исследование выхода противостоепоротических препаратов методом ВЭЖХ показали, что высвобождение лекарственного препарата из полимерной матрицы на основе ПВП происходит быстрее вследствие растворимости данного полимера в воде.

Заключение. В работе разработаны гибридные покрытия на основе фосфатов кальция и полимерной матрицы с инкорпорированными лекарственными препаратами для предотвращения развития остеопороза. Исследованы их физико-химические свойства и выход противоостоепоротических препаратов из полимерной матрицы.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и Национального научного фонда Болгарии № 20-53-18003.

Литература

2. Akin F.A., Zreiqat H., Jordan S, Wijesundara M.B.J., Hanley L. Preparation and analysis of macroporous TiO₂ films on Ti surfaces for bone-tissue implants. J. Biomed. Mater. Res. 2001;57(1): 588–596. doi:10.1002/1097-4636(20011215)57:4.
3. Corcuera-Flores J.R., Alonso-Domínguez A.M., Serrera-Figallo M.Á., Torres-Lagares D., Castellanos-Cosano L., Machuca-Portillo G. Relationship Between Osteoporosis and Marginal Bone Loss in Osseointegrated Implants: A 2-Year Retrospective Study. J. Periodontol. 2016;87:14–20. doi:10.1902/jop.2015.150229.
4. Giro G. Impact of osteoporosis in dental implants: A systematic review. World J. Orthop. 2015;6:311. doi:10.5312/wjo.v6.i2.311.
5. Mackey P.A., Whitaker M.D. Osteoporosis: A Therapeutic Update. J. Nurse Pract. 2015;11:1011–1017. doi:10.1016/j.nurpra.2015.08.010.
6. Maxian S.H., Zawadsky J.P., Dunn M.G. Mechanical and histological evaluation of amorphous calcium phosphate and poorly crystallized hydroxyapatite coatings on titanium implants. Journal of biomedical materials research. 1993;27(6):717-728. DOI:10.1002/jbm.820270604.
7. Ong K.L., Villarraga M.L., Lau E., Carreon L.Y, Kurtz S.M., Glassman S.D. Off-Label Use of Bone Morphogenetic Proteins in the United States Using Administrative Data. Spine. 2010;35:1794–1800. doi:10.1097/BRS.0b013e3181ecf6e4.
8. Sowjanya J.A., Singh J., Mohita T., Sarvanan S., Moorthi A., Srinivasan N., Selvamurugan N. Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2013;109:294–300. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.04.006.

ОСОБЕННОСТИ СКРИНИНГА ДОНОРОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

М.А. Водякова*, Е.В. Мельникова

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, г. Москва, Россия

e-mail: yod-marina@mail.ru

Ключевые слова: донор биологического материала, биомедицинский клеточный продукт, контроль качества.

Введение. Риск передачи инфекции является серьезной проблемой для применения биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и их аналогов. Одним из ключевых этапов обеспечения безопасности готового продукта является проведение соответствующего скрининга донорского материала для предотвращения передачи возбудителей инфекционных заболеваний. Качество биологических материалов доноров обеспечивает стабильность, безопасность, эффективность и чистоту продуктов на основе клеток человека.

Цель. Целью данного исследования являлось сравнение международных и национальных требований к биологическим материалам донора, используемым при производстве БМКП и продуктов на основе клеток и тканей человека (аналогов БМКП).

Результаты. В исследовании были рассмотрены нормативно-правовые документы России (Минздрав России. 2018), ЕС (The European Parliament and the Council. 2001, 2004, 2006), США (The Federal Government of the United States. 2004, Food and Drug Administration. 2007), Австралии (Therapeutic Goods Administration. 2014) и Канады (Health Canada, 2007), а также Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (World Health Organization. 2010), которые регулируют требования к пригодности донора, перечень необходимого тестирования (табл.) и перечень противопоказаний.

Таблица. Перечень минимально необходимого тестирования донора на инфекционные заболевания в разных странах

Возбудитель	Россия	ЕС	США ¹	Австралия	Канада
ВИЧ-1	+	+	+	+	+
ВИЧ-2	+	+	+	+	+
Вирус гепатита В	+	+	+	+	+
Вирус гепатита С	+	+	+	+	+
Сифилис (<i>Treponema pallidum</i>)	+	+	+	+	+
Т-лимфотропный вирус человека I типа	-	+	+ ³	+	+ ³
Т-лимфотропный вирус человека II типа	-	-	+ ³	-	+ ³
Цитомегаловирус	-	-	+ ³	-	+ ³
<i>Chlamydia trachomatis</i> ²	-	+	+	+	+
<i>Neisseria gonorrhoea</i> ²	-	-	+	-	-
Прионы	+	+	+	+	+
<i>Примечания</i>					
¹ Только для аллогенного донорского материала					
² Только для репродуктивных клеток и тканей					
³ Только для донорского материала, содержащего лейкоциты					

Необходимо отметить, что перечень необходимого тестирования для России, ЕС и США значительно отличается, при этом он совпадает для ЕС и Австралии; США и Канады. Согласно рекомендациям ВОЗ, в некоторых странах также рекомендуется проводить скрининг и на другие гемотрансмиссивные инфекции:

– в эндемичных районах: малярия, болезнь Шагаса, Т-лимфотропный вирус человека, лихорадка Западного Нила, геморрагическая лихорадка Эбола;

– в неэндемичных районах доноров, проживавших или посещавших территории, которые являются эндемичными по малярии, болезни Шагаса, Т-лимфотропному вирусу человека, лихорадкам Западного Нила и Эбола;

– другие возникающие и возвращающиеся инфекции (например, болезнь Крейтцфельда-Якоба, лихорадки денге и чикунгунья) или представляющие угрозу определенным группам реципиентов (например, цитомегаловирус).

В результате проведенного исследования можно выделить следующие общие подходы к тестированию доноров в различных странах:

– тестирование всех доноров: гепатиты В, С, ВИЧ-1, ВИЧ-2, сифилис (*Treponema pallidum*), трансмиссивная губчатая энцефалопатия (включая болезнь Крейтцфельда-Якоба);

– дополнительное тестирование – по показаниям, например, цитомегаловирус (для целых органов и доноров аллогенного костного мозга), токсоплазма (для доноров сердца, печени и костного мозга) и другие;

– тестирование по расширенному перечню для доноров клеток и тканей, обогащенных лейкоцитами, – Т-лимфотропный вирус I и II типов, вирус гепатита С и цитомегаловирус, которые рассматриваются как клеточно-ассоциированные вирусы; вирусы гепатитов А и Е также включены в перечень групп риска передачи от донора реципиенту;

– дополнительное тестирование для доноров репродуктивных клеток и тканей: *Neisseria gonorrhoeae* и *Chlamydia trachomatis*.

Заключение. Таким образом, главным требованием к донорам биологического материала в различных странах является всестороннее изучение анамнеза донора с целью выявления инфекционных заболеваний, среды его обитания, выявления критериев исключения для обеспечения безопасности лиц, участвующих в процессе забора, производства и применения, а также пациентов (реципиентов), которые будут получать лечение препаратами на основе донорского материала.

Литература

1. Приказ Минздрава России от 27 марта 2018 N 125н «Об утверждении порядка медицинского обследования донора биологического материала и перечня противопоказаний (абсолютных и относительных) для получения биологического материала», 2018. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_299045/.
2. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Eligibility Determination for Donors of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps), 2007. URL: <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/tissue/ucm091345.pdf>.

3. Health Canada. Safety of Human Cells, Tissues and Organs for Transplantation Regulations (SOR/2007-118), 2007. URL: <http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/SOR-2007-118/index.html>.
4. The European Parliament and the Council. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use, 2001. URL: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_en.pdf.
5. The European Parliament and the Council. Directive 2004/23/EC of 31 March 2004 of the European Parliament and of the Council on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells, 2004. URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:102:0048:0058:en:PDF>.
6. The European Parliament and the Council. Commission Directive 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells, 2006. URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:038:0040:0052:EN:PDF>.
7. The Federal Government of the United States. Code of Federal Regulations – Title 21 – Part 1271 Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products. Subpart C – Donor Eligibility, 2004. URL: <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=428e72a3d0597b53c2f1061dd1ba434b&mc=true&node=pt21.8.1271&rgn=div5#sp21.8.1271.c>.
8. Therapeutic Goods Administration. ARGB Appendix 4: Guidance on TGO 88 - Standards for donor selection, testing and minimising infectious disease transmission via therapeutic goods that are human blood and blood components, human tissues and human cellular therapy products, 2014. URL: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/argb-appendix-4-guidance-tgo-88.pdf>.
9. World Health Organization. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations, 2010. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44202/9789244547885_rus.pdf;jsessionid=A3FA5E01653F4335009414E51B5FF0C3?sequence=8.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ НА КРЕМНИЙ-УГЛЕРОДНЫЕ ПОКРЫТИЯ

А.С. Гренадёр*, А.А. Соловьёв, В.В. Малащенко, Л.С. Литвинова,
О.Г. Хазиахматова, Н.Д. Газатов, И.А. Хлусов

¹ФГБУН Институт сильноточной электроники СО РАН, г. Томск, Россия

²ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, Россия

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Томск, Россия

⁴ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия
e-mail: 1711Sasha@mail.ru

Ключевые слова: кремний-углеродное покрытие (а-С:H:SiO_x), биосовместимость, износостойкость, антикоррозионные свойства, титановый сплав ВТ6.

Введение. Титан и сплавы на его основе (например, ВТ6, зарубежный аналог Ti-6Al-4V) широко используются в медицине для создания имплантатов. Интерес к титановым материалам обусловлен их высокой коррозионной стойкостью, низкой плотностью и хорошей механической прочностью. Несмотря на это, титановым материалам присущи низкие трибологические свойства, в частности, высокий коэффициент трения и скорость износа с которыми приходится бороться (Peteghem B. et al., 2011; Ding H.N. et al., 2019). Для улучшения трибологических свойств титановых материалов используют модификацию поверхности, за счет нанесения тонких плёнок и покрытий. Одним из кандидатов являются алмазоподобные углеродные плёнки (DLC), сочетающие высокую твердость, износостойкость и биосовместимость. Ранее было показано, что включение в углеродную матрицу кремния Si или оксида кремния SiO_x способствует улучшению адгезионной прочности, снижению воспалительных реакций, снижению адгезии тромбоцитов (Koshigan K. et al., 2015; Wociaga D. et al., 2016; Wociaga D. et al., 2017).

Цель. Исследование цитотоксичности и провоспалительного ответа мононуклеарных клеток на кремний-углеродные покрытия, полученные с использованием нового подхода плазмохимического метода с использованием импульсного биполярного смещения подложки.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования выступали образцы титанового сплава марки ВТ6 (диаметр 10 мм и толщина 1 мм) с нанесенным а-С:H:SiO_x покрытием. Формирование а-С:H:SiO_x покрытия осуществлялось методом плазмохимического осаждения с использованием импульсного биполярного смещения подложки в смеси аргона и паров полифенилметилсилоксана. При оптимально подобранных условиях нанесения а-С:H:SiO_x покрытия обладают высокой твердостью (15±2 ГПа), низкими коэффициентом трения (0,08±0,02) и скоростью износа (менее 10⁻⁶ мм³/Н·м). Более подробно технологические условия нанесения описаны в работе (Grenadyorov A.S. et al., 2021). Исследование цитотоксичности мононуклеарных клеток крови в отношении полученных образцов осуществляли методом проточной цитофлуориметрии. Сокультивирование клеток с тестируемыми образцами проводилось в

течение 24 ч при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В исследовании участвовало 2 группы образцов: 1. Титановый сплав ВТ6, 2. Титановый сплав ВТ6 с двухсторонним нанесением а-С:Н:SiO_x покрытия. Количество образцов в каждой группе составляло по 5 штук. Исследование провоспалительного ответа мононуклеарных клеток на полученные образцы проводили методом проточной флуориметрии с использованием коммерческой панели Bio-Plex Pro Human Cytokine Panel, 27-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты. Изучение *in vitro* цитотоксичности мононуклеарных клеток при прямом 24-ч контакте с полученными образцами, не показало статистически значимого снижения общего количества, живых и мертвых клеток, как в сравнении с культурой клеток крови без тестируемых образцов (Control), так и с соответствующими образцами из титана (Т1) и образцами из титана с двухсторонним нанесением а-С:Н:SiO_x покрытия (Т2). Доля жизнеспособных клеток в исследуемых группах образцов составляла более 90 %. Согласно международному стандарту ISO 10993-5-2009, это свидетельствует в пользу отсутствия цитотоксичности образцов из титана и, разумеется, а-С:Н:SiO_x пленки в отношении мононуклеарных лейкоцитов крови человека. В рамках исследования влияния а-С:Н:SiO_x покрытия на жизнеспособность культуры МНК проводилась оценка её секреторной активности. При сокультивировании с титановыми образцами Т1 (контроль токсичности материала), наблюдалась неспецифическая активация МНК, что сопровождалось усилением продукции провоспалительных цитокинов IL-17, TNF-а, снижением концентрации хемокина IL-8 и RANTES (таблица 1). Способность поверхности титана индуцировать секрецию клеточными культурами провоспалительных цитокинов *in vitro* установлена ранее (Gazatova N.D., Khlusov I.A., 2021). Помимо иммунорегуляторных свойств, изученные цитокины/хемокины обладают способностью модулировать состояние стенки кровеносных сосудов (Huang Q. et al., 2016). В связи с этим, провоспалительные и ангиомодуляторные эффекты титановых поверхностей, опосредованные продукцией цитокинов/хемокинов-иммунными клетками, могут приводить к мало предсказуемым побочным эффектам со стороны изделий для сердечно-сосудистой хирургии.

Таблица 1. Концентрация цитокинов и хемокинов (пг/мл) в супернатантах при 24-ч контакте МНК с образцами, Me(Q1-Q3), n=5 (количество образцов в каждой группе)

Группа	Цитокины		Хемокины		
	IL-17	TNF-a	IL-8	RANTES	MCP-1 (MCAF)
С	9 (5-17)	39 (33-69)	1436 (1055-1725)	1035 (636-1166)	164 (162-167)
Т1	21* (18-22)	209* (183-311)	1395* (1242-1570)	433* (363-659)	1445* (1324-1570)
Т2	12** (9-18)	58** (34-81)	803** (591-1152)	220** (170-598)	168** (125-177)

Примечание. С – клетки без образцов (контроль), Т1 – клетки с титановыми образцами, Т2 – клетки с титановыми образцами с двухсторонним нанесением а-С:Н:SiO_x покрытия.

*p<0,05 по сравнению с клетками на пластике без образцов (С).

**p<0,05 по сравнению с титановыми образцами (группа Т1)

Из таблицы 1 можно заметить, что образцы с нанесенной а-С:Н:SiO_x пленкой (группа Т2) в целом способствуют модулирующему влиянию на концентрации изученных цитокинов и хемокинов. Концентрации изученных биомолекул статистически значимо снижаются в сравнении с титановой поверхностью Т1. Следует отметить, что а-С:Н:SiO_x пленка значительно подавляет секрецию МНК хемокина MCP-1 (MCAF), по сравнению с образцами титана Т1 отмечаются 9-кратные различия показателя. Моноцитарный хемоаттрактантный протеин (MCP-1/CCL2) является одним из ключевых хемокинов, который участвует в развитии различных заболеваний и вызывает миграцию лейкоцитов в зону воспаления. Полученные результаты означают, что тестируемое покрытие оказывает противовоспалительное действие. Нанесение такого покрытия на медицинские имплантаты и устройства, контактирующие с кровью, будет способствовать торможению потенциальной воспалительной реакции.

Заключение. В работе представлены результаты биологических исследований а-С:Н:SiO_x пленок, нанесенных на титан марки ВТ6, методом плазмохимического осаждения, с использованием импульсного биполярного смещения. Показано, что а-С:Н:SiO_x пленки не являются цитотоксичными по отношению к МНК при прямом 24-ч контакте, а также способствуют снижению их секреторной активности. Максимальное снижение концентраций провоспалительных цитокинов IL-17, TNF-а и хемокинов IL-8, RANTES и MCP-1 (MCAF) в супернатантах клеточных культур было отмечено при толщине а-С:Н:SiO_x плёнки около 1.5 мкм. Это предполагает ограничение *in vivo* побочных воспалительных и сосудистых реакций при контакте с лейкоцитами крови титановых изделий с нанесенной а-С:Н:SiO_x пленкой.

Литература

1. Ali K Refai, Marcus Textor, Donald M Brunette, J Douglas Waterfield. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004;70(2):194-205. DOI: 10.1002/jbm.a.30075.
2. Bociaga D., Kaminska M., Sobczyk-Guzenda A. Surface properties and biological behaviour of Si-DLC coatings fabricated by a multi-target DC-RF magnetron sputtering method for medical applications. *Diamond and Related Materials*. 2016;67:41-50. DOI: 10.1016/j.diamond.2016.01.025.
3. Bociaga D., Sobczyk-Guzenda A., Szymanski W. Mechanical properties, chemical analysis and evaluation of antimicrobial response of Si-DLC coatings fabricated on AISI 316 LVM substrate by a multi-target DC-RF magnetron sputtering method for potential biomedical applications. *Applied Surface Science*. 2017;417:23-33. DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.03.223
4. Ding H.H., Fridrici V., Guillon G., Sao-Joao S., Geringer J., Fontaine J., Kapsa Ph. Investigation on mechanical properties of tribofilm formed on Ti-6Al-4V surface sliding against a DLC coating by nano-indentation and micro-pillar compression techniques. *Wear*. 2019;432-433:202954. DOI: 10.1016/j.wear.2017.04.017.
5. Grenadyorov A.S., Zhulkov M.O., Solovyev A.A., Oskomov K.V., Semenov V.A., Chernyavskiy A.M., Sirota D.A., Karmadonova N.A., Malashchenko V.V., Litvinova L.S., Khaziakhmatova O.G., Gazatova N.D., Khlusov I.A. Surface characterization and biological assessment of corrosion resistant a-C:H:SiOx PACVD coating for Ti-6Al-4 V alloy. *Materials Science & Engineering C*. 2021;123:112002. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112002.
6. Huang Q., Duan L., Qian X., Fan J., Lv Z., Zhang X., Han J., Wu F., Guo M., Hu G. IL-17 promotes angiogenic factors IL-6, IL-8, and Vegf production via Stat1 in lung adenocarcinoma. *Scientific Reports*. 2016;6:36551. DOI:10.1038/srep36551.
7. Koshigan K., Mangolini F., McClimon J.B. Understanding the Hydrogen and Oxygen Gas Pressure Dependence of the Tribological Properties of Silicon Oxide-Doped Hydrogenated Amorphous Carbon Coatings. *Carbon*. 2015;93:851-860. DOI: 10.1016/j.carbon.2015.06.004.
8. Peteghem B., Fouvry S., Petit J. Effect of variable normal force and frequency on fretting wear response of Ti-6Al-4V contact. *Wear*. 2011;271:1535-1542. DOI: 10.1016/j.wear.2011.01.060.

СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРА ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ С ТОНКИМ АЗОСОДЕРЖАЩИМ ТИТАНОВЫМ ПОКРЫТИЕМ

П.В. Марьин*, С.И. Твердохлебов

*Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
г. Томск, Россия*

E-mail: mpbullet@mail.ru

Ключевые слова: биорезорбируемые скаффолды, полимер поли-L молочной кислоты, титановые азотосодержащие тонкие покрытия.

Введение. Полимеры полимолочной кислоты (PLLA) в настоящее время широко используются для изготовления скаффолдов для тканевой инженерии благодаря своим физико-химическим и прочностным свойствам, а также широкому спектру способов переработки, среди которых наиболее распространен метод электроспиннинга. Однако использование полимеров полимолочной кислоты, сформированных методом электроспиннинга, ограничено высокой гидрофобностью поверхности, которая препятствует клеточной адгезии и пролиферации. Нанесение тонких азотосодержащих пленок титана на поверхность скаффолдов позволяет изменять физико-химические свойства их поверхности. DC реактивное магнетронное напыление является одним из наиболее перспективных и универсальных методов формирования азотосодержащих покрытий титана (Kelly P.J., Arnell R.D., 2000).

Цель. Таким образом, целью работы являлось исследование влияния тонкого азотосодержащего покрытия титана, сформированного в среде различных рабочих газов, на морфологию и биологические характеристики PLLA скаффолдов.

Материалы и методы. Скаффолды были сформированы из 3 (масс%) прядильного раствора поли-L – молочной кислоты (PLLA) марки PL-18 (Purac, Нидерланды) в трихлорметане (CHCl₃) (ЭКПОС, Россия). Формирование титанового азотосодержащего покрытия осуществляли из плазмы DC магнетронного разряда, возникающего при распылении твердотельной титановой мишени (99,99 %) в атмосфере чистого азота (N₂), а затем в смеси азота с различными инертными газами: гелием (He), неоном (Ne), аргоном (Ar), криптоном (Kr) и ксеноном (Xe) в соотношении 50%:50%. Площадь распыляемой мишени составляла 224 см². Для формирования покрытия использовали универсальную магнетронную распылительную систему, описанную ранее в работе (Volbasov E.N. et al., 2016). Морфологию биорезорбируемого PLLA скаффолда исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на Raith-150TWO (Raith, Германия). В качестве клеточной линии использовали фибробласты мыши (3Т3), полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Оценку токсического действия образцов на клетки оценивали с помощью МТТ-теста. Оценку проводили на 1, 3 и 5 сутки после

посева клеток. Каждая проба была проведена в триплетах. Оценку клеточной адгезии проводили методом флуоресцентной окраски клеток непосредственно на исследуемых образцах. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica 6.0.

Результаты. На рисунке 1 представлены изображения PLLA скаффолдов (при различных увеличениях) в зависимости от используемой смеси рабочих газов.

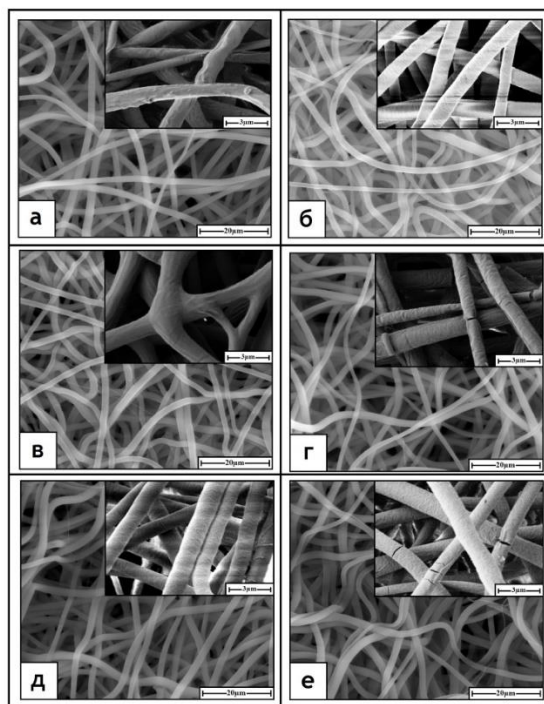


Рис. 1. СЭМ изображения PLLA скаффолдов, модифицированных в смеси различных газов: а – чистая атмосфера N_2 , б – смесь $N_2 + He$, в – смесь $N_2 + Ne$, г – смесь $N_2 + Ar$, д – смесь $N_2 + Kr$, е – смесь $N_2 + Xe$

Морфология скаффолда, до и после модифицирования, представляет собой совокупность хаотично переплетенных волокон, которые имеют цилиндрическую форму, местами отличную от правильной, с наличием впадин и неровностей. На поверхности волокон не обнаруживается дефектов в виде оплавлений, прожогов, капель, свидетельствующих о разрушении скаффолда. Однако, отмечается наличие поперечных трещин, образование которых связано с разницей в эластичности полимерного волокна и сформированного покрытия. Морфология не зависит от выбранной газовой атмосферы. Результаты оценки клеточной адгезии через 1 и 5 суток инкубации, относительно контрольной группы, представлены на рисунке 2а. Показано, что значение пролиферативной активности статистически значимо увеличивалось уже на 1 сутки после начала культивирования клеточной культуры: более 90% в группе N_2 и N_2+Xe ; более 80% в группах N_2+He , N_2+Ne , N_2+Kr и на 75% в группе N_2+Ar . На 3 сутки пролиферативная активность клеток выросла еще сильнее, более чем на 170% во всех исследуемых группах. При этом максимальное значение наблюдалось в группе N_2+Ar . Однако к 5 суткам уровень клеточной пролиферации снижался для всех исследуемых групп (Perez R.A., Mestres G., 2015). Уровень пролиферативной активности фибробластов крысы представлен на рисунке 2б.

Визуальная оценка количества клеток на поверхности образцов показала, что во всех исследуемых группах отмечается статистически значимое увеличение клеточной массы по сравнению с группой контроля уже на 1 сутки после посева клеток. Наибольшее количество адгезированных фибробластов наблюдается на поверхности скаффолдов, обработанных в газовой среде чистого N_2 . К 5 суткам численность колоний фибробластов увеличивается более чем в полтора раза относительно 1 суток культивирования и в 2 раза относительно контрольной группы. Максимальную площадь фибробласты занимают на поверхности скаффолда, обработанного в газовой среде N_2+Ar , что соответствует данным с МТТ-тестом.

Заключение. Таким образом, в работе показана возможность использования смеси рабочих газов для модифицирования PLLA скаффолдов, сформированных методом электроспиннинга, в плазме DC магнетронного разряда, возникающего при распылении титановой мишени. Установлено, что выбранные технологические параметры достоверно не изменяют морфологию скаффолдов, при этом позволяют придать их поверхности гидрофильные свойства. Наблюдается увеличение концентрации титана при распылении в смеси N_2+He ($0,022 \pm 0,001$ wt%), относительно распыления в атмосфере чистого N_2 ($0,019 \pm 0,001$ wt%). Установлено, что модифицирование поверхности скаффолдов в смеси рабочих газов улучшает взаимодействие клеток как с поверхностью PLLA скаффолда так и между собой. Оптимальным выбрано

сочетание рабочих газов N_2+Ar , поскольку оно обеспечивает наибольшее количество адгезированных фибробластов при высоком уровне межклеточного взаимодействия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-32-90133\20

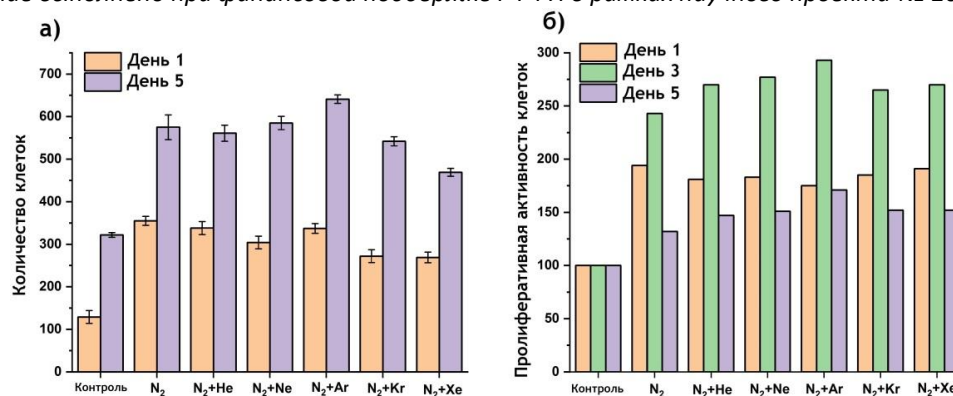


Рис. 2. Уровень пролиферативной активности фибробластов на поверхности скаффолда и количество адгезированных клеток до и после модифицирования

Литература

1. Bolbasov E.N., Antonova L.V., Stankevich K.S., Ashrafov A., Matveeva V.G., Velikanova E.A., Barbarash L.S. The use of magnetron sputtering for the deposition of thin titanium coatings on the surface of bioresorbable electrospun fibrous scaffolds for vascular tissue engineering: A pilot study. *Applied Surface Science*. 2016;398:63–72. doi: 10.1016/j.apsusc.2016.12.033].
2. Kelly P.J., Arnell R.D. Magnetron sputtering a review of recent developments and applications. *Vacuum*. 2000;56(3):159-172.
3. Perez R.A., Mestres G. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration. *Materials Science and Engineering*. 2016;61:922-939. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.087>.

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КОМПОЗИЦИОННЫХ ПОКРЫТИЙ С ФУНКЦИЕЙ ДЕПО ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Г.М. Медетова^{1*}, А.А. Волохова²

¹НИ ТПУ, г. Томск, Россия

²НИ ТГУ, г. Томск, Россия

e-mail: gaukhar_medetova@mail.ru

Ключевые слова: композиционные материалы, поли (ϵ -капролактон), адресная доставка лекарств, хлорамфеникол.

Введение. В настоящее время для восстановления живых тканей всё чаще применяются металлические имплантаты с модифицированной поверхностью (Narayanan R. et al, 2008; Liu Y. et al., 2020). Кальций-фосфатные покрытия на основе гидроксиапатита ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$; ГА), имеющего состав, близкий к человеческой кости, являются перспективными для применения в травматологии и ортопедии (Arcos D., Vallet-Regí M., 2020). Для нанесения кальций-фосфатных покрытий применяется метод микродугового оксидирования (МДО). Метод МДО позволяет получить пористые, шероховатые покрытия требуемого химического состава. Однако, МДО покрытия имеют хрупкость, выше, чем у кортикальной кости, поэтому при моделировании и установке имплантата целостность покрытия может нарушаться (Komlev V.S. et al., 2003). Кроме того, при операции возможно инфицирование области хирургического вмешательства (ИОХВ). Локальная доставка лекарственных средств (ЛС), прежде всего антибактериальных, позволяет предотвратить осложнения, связанные с ИОХВ. Предлагаемый в работе метод локальной доставки ЛС заключается в насыщении пористого кальций-фосфатного МДО покрытия биodeградируемым композитом на основе полимера – поли (ϵ -капролактона) и антибактериального лекарственного вещества – хлорамфеникола (ХФ). Таким образом, можно обеспечить не только адресную доставку ЛС, но и уменьшить хрупкость кальций-фосфатного покрытия за счет пропитки его полимерным связующим.

Целью работы является изучение морфологии и элементного состава сформированных биоактивных покрытий, а также исследование выхода антибактериального лекарственного средства из покрытий.

Материалы и методы. Формирование кальций-фосфатных покрытий осуществлялось на дисках из титана марки ВТ-6 диаметром 10 мм и толщиной 2-3 мм методом микродугового оксидирования на установке, разработанной в ТПУ. Для пропитки образцов были приготовлены растворы полимера поликапролактона (ПКЛ) (Sigma Aldrich, Германия) с лекарственным средством хлорамфениколом (Фармстандарт, Россия) в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол (ГФИП) (ЭКОС - 1, Россия). Морфология покрытий была оценена с помощью сканирующего электронного микроскопа VEGA 3 (TESCAN, Чехия). Изучение химического

состава поверхности имплантатов проводилось методом энергодисперсионного анализа с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6000 (JEOL, Япония), оснащенного встроенным энергодисперсионным анализатором. Профиль выхода хлорамфеникола в фосфатно-солевой буфер был исследован с помощью жидкостного хроматографа Милихром А-02 (Милихром, Россия), оснащенного УФ-детектором.

Результаты. СЭМ изображения образцов, а также энергетические спектры для различных покрытий титановых образцов представлены на рисунке 1.

МДО-покрытия характеризуются выраженной пористостью. Добавление полимера способствует сглаживанию поверхности. Во всех полученных спектрах были обнаружены пики, характерные для титана (Ti), кислорода (O), кальция (Ca), фосфора (P), углерода (C) и хлора (Cl). Содержание элементов в покрытиях приведено в таблице 1.

Таблица 1. Содержание различных химических элементов в образцах, масс. %

Образец	Содержание элементов, масс. %					Ca/P
	C	O	Ca	P	Cl	
Ti МДО	3,53 ± 0,22	57,27 ± 0,09	9,61 ± 0,12	15,22 ± 0,15	–	0,63 ± 0,01
Ti МДО PCL	53 ± 3	36,5 ± 1,7	9,61 ± 0,12	4,7 ± 0,7	–	0,56 ± 0,01
Ti МДО PCL Chl 5%	63 ± 5	33,0 ± 0,7	1,03 ± 1,22	1,9 ± 2,1	0,24 ± 0,11	0,52 ± 0,05
Ti МДО PCL Chl 15%	30 ± 5	46,6 ± 2,3	5,7 ± 0,8	9,71 ± 1,13	0,06 ± 0,03	0,59 ± 0,01
Ti МДО PCL Chl 25%	62,3 ± 0,8	33,4 ± 0,4	0,33 ± 0,09	0,63 ± 0,17	2,4 ± 0,6	0,53 ± 0,01

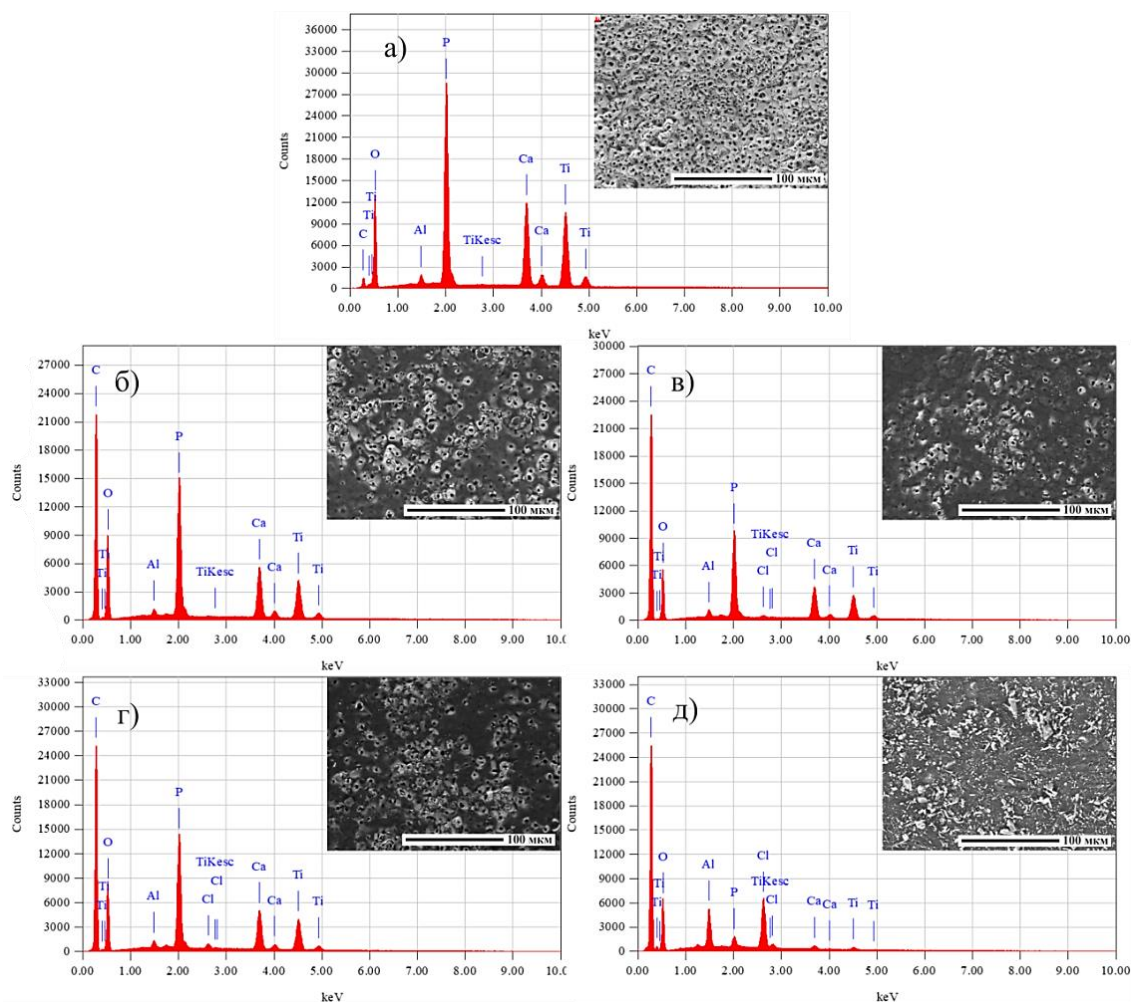


Рис. 1. СЭМ-изображения и энергетические спектры покрытий, сформированных методом МДО (а), МДО покрытия с поликапролактоном (б) и с добавлением хлорамфеникола: 5 масс. % (в), 15 масс. % (г), 25 масс. % (д)

Профили выхода хлорамфеникола из покрытий представлены на рисунке 2.

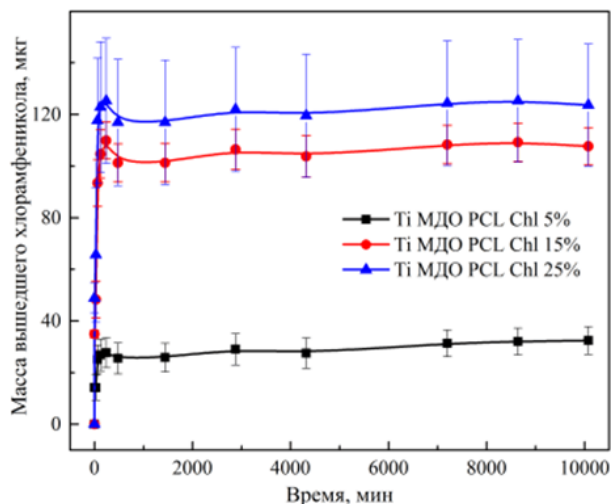


Рис. 2. Профили выхода хлорамфеникола из композиционных покрытий в течение 7 суток

Количество вышедшего лекарства из образцов с 15 и 25 масс. % значительно превосходит количество лекарства, вышедшего из образца с 5 масс.% хлорамфеникола. Выход препарата из покрытия происходил в течение всего рассмотренного промежутка времени.

Заключение. В результате работы получены титановые образцы с кальций-фосфатными покрытиями, депонированными хлорамфениколом. Исследованы их морфология, элементный состав, а также высвобождение хлорамфеникола из покрытий. Морфология кальций-фосфатных покрытий характеризуется выраженной пористостью, нанесение полимерного композита сохраняет пористую структуру покрытия. Соотношение кальция к фосфору для всех покрытий составляет в среднем.

Литература

1. Arcos D., Vallet-Regí M. Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(9):1781-1800.
2. Komlev V.S., Barinov S.M., Rustichelli F. Strength enhancement of porous hydroxyapatite ceramics by polymer impregnation. *Journal of materials science letters*. 2003;22(17):1215-1217.
3. Liu Y., Rath B., Tingart M., Eschweiler J. Role of implants surface modification in osseointegration: A systematic review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2020;108(3):470-484.
4. Narayanan R., Seshadri S.K., Kwon T.Y., Kim K.H. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*. 2008;85(1):279-299.
5. Volokhova A.A. Chloramphenicol loaded PCL/calcium phosphate composite coatings for bone replacement applications // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник научных трудов XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, г. Томск, 21-24 апреля 2020 г. Т. 2: Химия. — Томск, 2020. — Изд-во ТУСУР, 2020;2:216-218.

РОЛЬ ГЕПАРИНА В РЕГУЛЯЦИИ ОСТЕОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ММСК IN VITRO

И.К. Норкин*, К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, Е.С. Мелашенко,
В.В. Малащенко, Е.О. Шунькин, И.А. Хлусов, Л.С. Литвинова

¹Центр иммунологии и клеточных биотехнологий

Балтийского федерального университета им. И. Канта, г. Калининград, Россия;

e-mail: norkin_igor@mail.ru

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, гепарин, гены остеодифференцировки, *in vitro*.

Введение. Имплантируемые искусственные материалы и конструкции, применяемые в регенеративной медицине при остеосинтезе, индуцируют развитие воспалительной реакции при контакте с тканями организма. Развитие локального воспаления является необходимым процессом для эффективной регенерации повреждённой костной ткани (Labarge A. et al., 2020). Контакт имплантируемого материала с тканями реципиента усиливает этот процесс и сопровождается осаждением на его поверхности слоя белков, инициирующих систему комплемента, компонентов врождённого иммунитета, что индуцирует активацию коагуляционного гемостаза и формирование фибринового сгустка (гематомы) (Gorbet M.B., Sefton M.V., 2004). Костная мозоль, образующаяся на поверхности имплантата и состоящая первоначально из молекул фибрина, коллагена и эластина, обеспечивает основу для формирования тканевой структуры костного регенерата посредством миграции и адгезии стволовых клеток. Происходит образование стабильной связи между костной тканью реципиентного ложа и поверхностью имплантата с его дальнейшей

остеоинтеграцией (Chen Q., 2007). Искусственные поверхности активируют систему гемостаза и процессы гиперкоагуляции, создают угрозу тромбозам магистральных артерий. Для предотвращения развития постоперационных осложнений, вызванных гиперкоагуляционным синдромом, используют терапевтические стратегии с применением противосвертывающих лекарственных препаратов, в том числе, антикоагулянтов (гепарин, варфарин) (Labaree A. et al., 2020). Следует отметить, что использование прямых антикоагулянтов (в частности, гепарина) ограничивает нормальное образование сгустка фибрина *in vivo*, что замедляет миграцию мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) в структуру формирующейся костной мозоли, а также способствует нарушению процессов остеоинтеграции имплантатов и остеорепарации. Возможно влияние гепарина на процессы дифференцировки ММСК *in situ*.

Цель. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния гепарина в фармакологических концентрациях на способность ММСК человека к дифференцировке в остеогенном направлении в условиях культивирования *in vitro*.

Материалы и методы. ММСК были получены из липоасpirата человека (Разрешение № 7 от 09.12.2015 локального этического комитета Инновационного парка БФУ имени И. Канта) и соответствовали минимальным критериям, предъявляемым к ММСК: жизнеспособность клеток более 95%; адгезия к поверхности культурального пластика; экспрессия мембранных маркеров CD105, CD73 и CD90 в сочетании с отсутствием на клеточной поверхности CD45/CD34; способность к дифференцировке в трех ортодоксальных направлениях (остео-, хондро- и адипогенном) (Шахпазян Н.К. и др., 2012). Для оценки морфофункционального состояния клеток, культивируемых в присутствии гепарина, было сформировано 2 экспериментальные группы: 1) культивирование ММСК в присутствии гепарина в терапевтической концентрации (1,3 МЕ/мл); 2) культивирование ММСК в присутствии гепарина в токсической концентрации (13 МЕ/мл). Контролем служила модель культивирования ММСК в полной питательной среде на основе DMEM/F12. Для оценки реакции клеток в присутствии гепарина («Белмедпрепараты», Беларусь), ММСК (1×10^5 кл/мл) культивировали в 12-луночных стерильных пластиковых культуральных плоскодонных планшетах («Orange Scientific», Бельгия) в 2 мл полной питательной среды (ППС) (90% DMEM/F12 (1:1) («Gibco Life Technologies», США), 10% FBS («Sigma Aldrich», США), 50 мг/л гентамицина («Invitrogen», Великобритания), 280 мг/л L-глутамин («Sigma Aldrich», США) в течение 14 суток при температуре 37°C, влажности 100% в атмосфере 5% CO₂ со сменой среды каждые 3-4 дня. Определение антигенных детерминант ММСК проводили с использованием MSC Phenotyping Kit human – 130-095-198 («Miltenyi Biotec», США) согласно протоколу фирмы-производителя, после чего клетки подвергали анализу на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия). Обработку полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США). Из клеток выделяли тотальную РНК с использованием водного раствора фенола и гуанидин-изотиоцианата (ExtractRNA kit «Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Для определения уровней относительной экспрессии генов проводили мультиплексный анализ ПЦР с использованием специфичных зондов TaqMan («Бигль», Россия). ПЦР проводили с использованием реагентов qPCRmixHS («Евроген», Россия) и праймеров в концентрации 10 пМ. В качестве матрицы использовали 4 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген RPLPO. Относительную экспрессию мРНК генов оценивали методом 2^{-ΔΔCT} для количественного анализа данных полимеразной цепной реакции (кПЦР) в реальном времени с использованием пороговых циклов (Ct) между образцом и контрольной группой (2D-культура клеток в стандартной среде). Уровень экспрессии исследуемых генов в контрольной группе приняли за 1 усл. ед. Статистический анализ результатов был проведен с использованием пакета программ Graph Pad Prism version 8.0.1 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, USA). Различия считались статистически достоверными при уровне значимости P<0,05.

Результаты. Установлено, что при добавлении гепарина в терапевтической концентрации (1,3 МЕ/мл), в культуре ММСК достоверно повышался (относительно контрольной культуры без гепарина) уровень относительной экспрессии мРНК гена *BMP2*; экспрессия мРНК *RUNX2* оставалась на уровне контрольных значений (таблица 1). Гепарин в концентрации 13 МЕ/мл статистически значимо увеличивал экспрессию мРНК генов *RUNX2* и *BMP2* (табл. 1). Jang W. (2011) показал, что *BMP2* активирует передачу сигналов Smad1/5/8 и, тем самым, регулирует транскрипцию остеогенных генов, инициируя экспрессию *RUNX2* (Jang W). Таким образом, повышение уровней относительной экспрессии мРНК генов *BMP2* и *RUNX2* в присутствии гепарина в терапевтической и токсической концентрациях (1,3 МЕ/мл и 13 МЕ/мл соответственно), может свидетельствовать о возможном участии гепарина в ранних этапах инициации остеогенной дифференцировки ММСК *in vitro*.

Заключение. Таким образом, гепарин в терапевтических (1,3 МЕ/мл) и высоких (13 МЕ/мл) концентрациях приводит к увеличению экспрессии мРНК генов дифференцировки ММСК человека в остеобластном направлении. Полученные данные свидетельствуют в пользу сложных отношений свертывающей/противосвертывающей систем в формировании гематомы и регуляции процессов остеорепарации.

Таблица 1. Уровни относительной экспрессии мРНК генов *BMP2* и *RUNX2*, ассоциированных с дифференцировкой и созреванием ММСК в остеогенном направлении, после 14 суток культивирования. * - достоверные различия относительно контрольной группы

	Контрольная группа	2D (+ гепарин 1,3 МЕ/мл)	2D (+ гепарин 13 МЕ/мл)
BMP2	0,91 (0,58-1,83)	2,06 (1,82-2,56)	3,71 (2,44-5,78) *P=0,002
RUNX2	0,9 (0,8-1,25)	1,07 (0,72-1,78)	1,84 (1,54-5,24) *P=0,004

Литература

1. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. *Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия*. 2012;7(1): 23-33. eLIBRARY ID: 17676982.
2. Chen Q. Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(36):26418–26430. DOI: 10.1074/jbc.M703341200.
3. Gorbet M.B., Sefton M.V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004;25(26):5681–5703. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.023.
4. Jang W., Kim E., Kim D. BMP2 Protein Regulates Osteocalcin Expression via Runx2-mediated Atf6 Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;287(2):905-915. DOI: 10.1074/jbc.M111.253187.
5. Labarrere A., Dabiri A.E., Kassab G.S. Thrombogenic and Inflammatory Reactions to Biomaterials in Medical Devices. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8(123). DOI: 10.3389/fbioe.2020.00123.

СВОЙСТВА КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ ПОКРЫТИЙ, СФОРМИРОВАННЫХ МЕТОДОМ РЕАКТИВНОГО ВЧМР В АЗОТСОДЕРЖИХ ГАЗОВЫХ СМЕСЯХ

А.Ю. Федоткин*, П.В. Марьин
 ФГАОУ ВО НИ ТПУ, г. Томск, Россия
 e-mail: fedotkin_sasha@mail.ru

Ключевые слова: реактивное высокочастотное магнетронное распыление, кальций-фосфатные покрытия, гидроксиапатит.

Введение. Металлы и их сплавы ввиду высокой механической прочности наиболее часто применяются для изготовления имплантатов, применяемых для восстановления дефектов структуры костной ткани. Однако, данный класс материалов обладает рядом существенных недостатков, в частности, низкой биосовместимостью, биоактивностью и могут быть подвержены коррозии. Решением данной проблемы является формирование на поверхности имплантатов тонких кальций-фосфатных (КФ) покрытий. Одним из наиболее распространенных материалов, используемых для этих целей, является гидроксиапатит (ГАП, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Исследование свойств ГАП-покрытий, осаждаемых методом высокочастотного магнетронного распыления (ВЧМР), ведется несколько десятилетий и сохраняет актуальность и в настоящее время. В частности, ведутся исследования влияния различных ионных замещений и примесей в структуре покрытий на их свойства (Graziani et al., 2017). Оксид азота (NO) оказывает важнейшее регуляторное воздействие на кровеносную систему организма человека (Leitinger et al., 1995). Наличие данного соединения в составе КФ покрытия должно способствовать ангиогенезу и благотворно сказываться на остеосинтезе. **Цель.** Формирование NO-содержащих КФ покрытий на поверхности титановых образцов методом реактивного ВЧ-магнетронного распыления ГАП в различных азотсодержащих газовых смесях, а также исследование их физико-химических и биологических свойств.

Материалы и методы. В ходе работы проводилось распыление твердотельной ГАП-мишени в различных газовых средах инертный газ/азот. На первом этапе КФ покрытия формировались при различных соотношениях Ar/N_2 с целью выявления оптимального значения данного параметра и его учета при осаждении покрытий с различными инертными газами. Влияние объемной доли азота в камере на свойства покрытий и содержание NO оценивалось по пяти газовым смесям Ar/N_2 при различных объемных соотношениях: $\text{Ar}/\text{N}_2=100/0$ ($\text{Ar}100$), $\text{Ar}/\text{N}_2=75/25$ ($\text{Ar}75/\text{N}_225$), $\text{Ar}/\text{N}_2=50/50$ ($\text{Ar}50/\text{N}_250$), $\text{Ar}/\text{N}_2=25/75$ ($\text{Ar}25/\text{N}_275$) и $\text{Ar}/\text{N}_2=100/0$ (N_2100). Осаждение проводилось на универсальной магнетронной распылительной системе «Катод-1М» при следующих параметрах: расстояние мишень-образец – 33 мм, предварительное давление в камере – $3 \cdot 10^{-3}$ Па, рабочее давление в камере – 0,5 Па, время напыления составило 3 часа при плотности мощности 6,32 Вт/см². Влияние инертного газа на свойства КФ покрытий оценивалось по группам покрытий, осажденных в смесях неона и азота ($\text{Ne}+\text{N}_2$), аргона и азота ($\text{Ar}+\text{N}_2$), а также ксенона и азота ($\text{Xe}+\text{N}_2$) при равных объемных концентрациях. Формирование покрытий проводилось на установке УВН-74 при следующих параметрах: рабочее давление – 0,1 Па, плотность мощности – 2,6 Вт/см², расстояние мишень-подложка – 45 мм, время – 3 ч, соотношение объемов инертный газ/азот – 1:1. В качестве подложек использовались диски из титана марки ВТ6 диаметром 10 мм и толщиной 1 мм. Титановые диски полировались на установке Unipol-802 (Zhengzhou TCH Instrument Co., Ltd, Китай). Для измерения толщины исследуемых покрытий использовался образец из полированного

кремния. Исследования образцов проводили методами контактной профилометрии, атомно-силовой микроскопии, энерго-дисперсионной и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, рентгеноструктурным анализом, краевой угол смачивания водой был рассчитан методом «сидячей капли». Клеточные исследования проводились по договору в БФУ им. И. Канта.

Результаты. Исследование скорости осаждения покрытий не выявило корреляции между данным параметром и соотношениями газов. Для групп покрытий Ar100, Ar75/N₂25, Ar50/N₂50, Ar25/N₂75 и N₂100 скорости осаждения составили $0,167 \pm 0,003$ мкм/ч, $0,123 \pm 0,005$ мкм/ч, $0,211 \pm 0,004$ мкм/ч, $0,160 \pm 0,014$ мкм/ч, $0,199 \pm 0,018$ мкм/ч. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия показала наличие пиков на спектрах азота и кислорода, которые можно отнести к NO, при исследовании покрытий, осажденных в азотсодержащих средах (рис. 1). Спектры покрытий, осажденных в чистом аргоне, не содержат данных пиков. При этом, интенсивность пиков увеличивается по мере увеличения парциального давления азота в камере из чего следует, что количество NO в покрытии можно регулировать содержанием азота в камере.

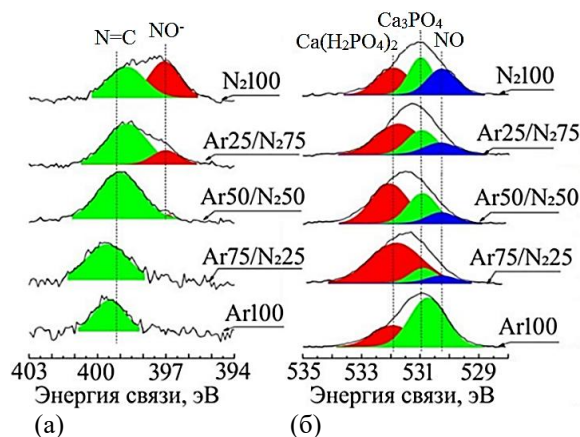


Рис. 1. XPS-спектры образцов: а – 1s спектр азота, б – 1s спектр кислорода

Рентгеноструктурный анализ всех покрытий показал отсутствие каких-либо фаз, нехарактерных материалу подложки. Анализ клеточности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), полученных из липоасpirата человека, показал, что общее количество клеток, культивированных на поверхности покрытий, увеличивается по мере увеличения содержания азота в камере до достижения объемного соотношения Ar/N₂ = 1/1. Для групп Ar100, Ar75/N₂25, Ar50/N₂50 значение данного параметра составляют $0,24 \pm 0,01 \times 10^6$ кл/мл, $0,36 \pm 0,01 \times 10^6$ кл/мл и $0,52 \pm 0,03 \times 10^6$ кл/мл, соответственно. При дальнейшем увеличении содержания азота в камере количество клеток постепенно снижается и составляет $0,31 \pm 0,02 \times 10^6$ кл/мл и $0,26 \pm 0,02 \times 10^6$ кл/мл для групп Ar25/N₂75 и N₂100. Исследование жизнеспособности показало аналогичную динамику: количество живых клеток увеличивается по мере увеличения азота в камере до достижения объемного соотношения Ar/N₂ = 1/1 в камере и снижается при дальнейшем увеличении содержания азота. Для групп Ar100, Ar75/N₂25, Ar50/N₂50, Ar25/N₂75 и N₂100 количество живых клеток ММСК, культивированных на поверхности покрытий, составляет $0,19 \pm 0,01 \times 10^6$ кл/мл, $0,27 \pm 0,01 \times 10^6$ кл/мл, $0,40 \pm 0,02 \times 10^6$ кл/мл, $0,17 \pm 0,01 \times 10^6$ кл/мл и $0,22 \pm 0,02 \times 10^6$ кл/мл, соответственно. Таким образом, наилучшими показателями клеточности и жизнеспособности ММСК характеризуются покрытия группы Ar50/N₂50. На основании этого, для исследования свойств покрытий, осажденных в атмосфере смесей различных инертных газов с азотом (Ne+N₂, Ar+N₂ и Xe+N₂), было выбрано объемное соотношение инертный газ/азот = 1/1. Исследование скоростей осаждения покрытий, сформированных в смесях инертных газов с азотом, не выявило достоверных различий между группами, а скорости осаждения покрытий составляют ~0,067 мкм/ч. Анализ изображений, полученных методом атомно-силовой микроскопии, показал, что по мере увеличения атомной массы инертного газа в смеси с азотом уменьшается размер зерен. Для групп Ne+N₂, Ar+N₂ и Xe+N₂ площадь зерен составляла 0,067 мкм², 0,012 мкм² и 0,010 мкм². Средняя шероховатость R_a, напротив, увеличивается и ее значения расположились в следующем порядке: 1,03 нм, 1,47 нм и 1,91 нм. Соотношения Ca/P было рассчитано для групп Ne+N₂, Ar+N₂ и Xe+N₂ методом энерго-дисперсионной спектроскопии. Значения данного параметра снижались по мере увеличения атомной массы инертного газа и составляли $1,52 \pm 0,15$, $1,21 \pm 0,17$ и $0,89 \pm 0,14$. Рентгеноструктурный анализ покрытий, сформированных в смеси инертных газов с азотом, показал, что все покрытия характеризуются аморфной структурой. Исследование краевого угла смачивания показало, что группы образцов Ne+N₂ и Xe+N₂ характеризуются большей смачиваемостью по сравнению с группой Ar+N₂, из чего следует, что данные группы покрытий являются более перспективными. Высокая смачиваемость способствует более интенсивному формированию клеточного матрикса (Lampin et al., 1997), однако для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение биологических исследований.

Заключение. В ходе работы было доказано, что КФ покрытия, формируемые методом реактивного ВЧМР ГАП в газовой смеси аргона и азота, характеризуются наличием NO в своем составе. При этом, по мере

увеличения объемной доли азота в камере наблюдается увеличение содержания NO. С увеличением содержания азота в камере и, соответственно, концентрации NO наблюдается увеличение клеточности и жизнеспособности ММСК, культивируемых на поверхности покрытий, до достижения соотношения Ar/N₂ в камере, однако дальнейшее увеличение азота в камере и NO в покрытии ведет к снижению данных параметров. Это подтверждается литературными источниками (Leitinger et al., 1995), в которых утверждается, что большие концентрации NO могут приводить к цитотоксичным реакциям. Выбор инертного газа в смеси с азотом также оказывает влияние на свойства покрытий. С его помощью можно регулировать морфологию покрытий и соотношение Ca/P. Результаты исследования смачиваемости групп покрытий Ne+N₂ и Xe+N₂ косвенно свидетельствуют, что покрытия, осажденные в этих смесях газов, могут обладать лучшими биологическими свойствами, чем сочетание Ar+N₂, однако подтверждение данной гипотезы требует проведения дополнительных исследований. Предложенные композитные покрытия могут использоваться в качестве биоактивного слоя, допированного NO, гибридных имплантатов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-32-90133\20. Авторы благодарят Л.С. Литвинову и сотрудников БФУ им. И. Канта за проведение клеточных исследований.

Литература

1. Graziani G., Bianchi M., Sassoni E., Russo A., Maracci M. Ion-substituted calcium phosphate coatings deposited by plasma-assisted techniques: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;74:219–229.
2. Lampin M., Warocquier-Clérout R., Legris C., Degrange M., Sigot-Luizard M.F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997;36(1):99-108.
3. Leitinger N., Oguogho A., Rodrigues M., Sinzinger H. The effect of NO/EDRF and monocytes/macrophages on LDL-oxidation. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 1995;46(4):385–408.

Научное издание

**Международная
научно-практическая конференция**

**РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ –
ТРАДИЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ**
(г. Томск, 13-16 сентября 2021 г.)

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

Под реакцией

д-ра фарм. наук М.В. Белоусова и д-ра мед. наук А.И. Венгеровского.

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8(3822) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 01.09.2021 г.
Формат 60x84_{1/8}. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. л. 42,37 Авт. л. 29,58
Тираж 100 экз. Заказ № 30

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru

Мария Зыкова, руководитель НИР, заведующий кафедрой химии, доктор фармацевтических наук в рамках научной программы конференции презентует успешные итоги доклинических испытаний свойств гуминовых веществ, на основе которых разработаны продукты линии Sib.Balance.

Научно-исследовательская работа "Химико-фармакологическое и токсикологическое исследование гуминовых веществ" проводилась с апреля 2020 года на базе Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск).

При токсикологических исследованиях гуминовых веществ в культуре клеток *in vitro* установлено, что они не обладают цитотоксическим действием в широком диапазоне доз, в экспериментах *in vivo* (острая и 28-дневная токсичность) установлено, что при внутрижелудочном введении они не оказывают токсического влияния на органы и системы экспериментальных животных и относятся к V классу опасности – вещества малоопасные (согласно ГОСТ 32644-2014).

Итоги испытаний, проведенных на базе СибГМУ (г. Томск), будут презентованы в рамках конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы».

При оценке раздражающего действия и сенсбилизации установлено, что гуминовые вещества не обладают алергизирующими свойствами. При изучении специфической фармакологической активности гуминовых веществ установлены антиоксидантные и иммуностропные свойства.

Заключение исследования подтверждает безопасность гуминовых веществ, входящих в состав продуктов линии Sib.balance и возможность рекомендовать их для применения в составе пищевых продуктов и биологически активных добавок в пищу.



СКИДКА 30% на всю продукцию Sib.balance до 30.09.2021г. на сайте **по промокоду «ТОМСК»**

Подарок **AQUASIEVE** при покупке любого продукта на стенде компании в главном корпусе СибГМУ только в дни конференции 13-16.09.2021г.

AQUASIEVE

Домашний очиститель воды на основе «умного» природного минерала цеолит. При использовании в чайнике или ёмкости с водой, очищает воду и минерализует ее до оптимального уровня, делает воду по свойствам и вкусу близкой к «живой родниковой».

FITOX

Активатор здоровья на основе гуминовых веществ. Работая на клеточном уровне, восстанавливает поврежденные клетки организма, обеспечивает их защиту от окислительного стресса, облегчает течение инфекционных и вирусных заболеваний, помогает быстрому восстановлению, обладает протекторным и антистрессовым действием, эффективен в профилактике возрастных изменений в организме.

UP&UP

Активатор энергии на основе цеолитовой воды, пантов марала, прополиса и комплекса сибирских трав оказывает мягкое тонизирующее действие, стимулирует работоспособность, налаживает режим сна.

Milli-Q®

MERCK

Lab Water Solutions

СИСТЕМЫ ОЧИСТКИ ВОДЫ Milli-Q®

Основные преимущества:

- высокое качество
- удобство пользования
- надёжность
- прогнозируемая замена расходных материалов
- высокий КПД обратного осмоса
- сертификаты калибровки на все датчики и мониторы
- доступность
- со склада в Москве



Системы получения сверхчистой воды (тип I)

Milli-Q® IQ 7000
Milli-Q® Reference
Super-Q®
Simplicity®

Системы получения сверхчистой воды (тип II)

RiOs-Di
Elix® Advantage, Elix® Essential
Milli-Q® HX 7000, Milli-Q HX 7000 SD
(высокопроизводительные системы до 9000 л/день)

Системы получения сверхчистой воды (тип III)

RiOs™ Essential
Milli-Q® HR 7000

Комбинированные системы очистки воды

Milli-Q® Direct 8/16
Milli-Q® IQ 7003/5/10/15



Все для Вашей лаборатории

ГАЛАХИМ

andresyuk@gmail.com

+7 (495) 151-01-50
www.galachem.ru



Идеально сбалансированное дозирование с Tacta®

- Удобно держать благодаря эргономичному корпусу
- Малые усилия при дозировании, а также нажатии на рычаг сбрасывания наконечника уменьшают риск возникновения профессиональных заболеваний (WRULD)
- Уникальная система Sartorius Optilock делает удобными регулирование и фиксацию объёма. Контролируемое и мягкое сбрасывание благодаря новой технологии Sartorius Optiject. Регулируемая калибровка для обеспечения точных результатов при дозировании различных видов жидкостей
- Легко очистить: дозатор состоит только из трёх частей. Надёжные результаты даже после продолжительных периодов дозирования

www.sartorius.com

Simplifying Progress

SARTORIUS



Arium® Mini –

является оптимальным решением для лабораторий с повседневным потреблением ультрачистой воды до 10 л в день.

Эта компактная система обеспечивает неизменно высокое качество воды для получения надежных и воспроизводимых результатов, является простой в эксплуатации и максимально надежной.

www.sartorius.com

Simplifying Progress

SARTORIUS

Передовая продукция для вас.
Со склада в Москве и под заказ.

Millipore®

Preparation, Separation,
Filtration & Monitoring Products

Продукция для пробоподготовки

Устройство для
фильтрации
Stericup®



Шприцевые фильтры Millex®



Ультрацентри-
фужные пробирки
Amicon®



Продукты для разделения и фильтрации

Микрофильтра-
ционные и
ультрафиль-
трационные
мембраны



Фильтры Durapore®



Кассеты Pellicon®, глубинные фильтры
Clarisolve®, фильтры Viresolve® Pro и
хроматографические сорбенты Eshmuno®



Системы Mobius®
для приготовления
и розлива стериль-
ных растворов с
использованием
материалов одно-
кратного приме-
нения



Система для
масштабирован-
ия процессов
тангенциальной
фильтрации
Cogent®



Продукция для детектирования и мониторинга

ELISA, RIA и мультиплексный
анализ MILLIPLEX® map



Фильтроэлементы
Steritest™ NEO
для испытания на
стерильность



Сухие гранулированные
питательные среды
GranuCult®



Продукция EZ Family для
мембранной фильтрации



Система SMCxPRO™
и панели SMC™
для анализа для
высокочувствительного
определения белков



Это тот опыт, который позволяет нам решать ваши
технические проблемы, чтобы вы были готовы к
изменениям и всегда оставались впереди.

MERCK



Все для Вашей лаборатории

ГАЛАХИМ

+7 (495) 151-01-50
andresyuk@gmail.com

www.galachem.ru

- ИМПОРТНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ
- ОСОБО ЧИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА
- РАСТВОРИТЕЛИ
- АНАЛИТИЧЕСКИЕ СТАНДАРТЫ
- РАСТВОРИТЕЛИ ДЛЯ ЯМР
- СО СКЛАДА В МОСКВЕ И ПОД ЗАКАЗ

MERCK

Sigma-Aldrich®

Lab & Production Materials

TH.GEYER
SUPPLYING YOUR IDEAS

DASITGROUP

CARLO ERBA
REAGENTS

Supelco®
Analytical Products

SAFC®
Pharma & Biopharma Raw
Material Solutions

chemPUR
Ihr Partner für Chemie & Physik

fluorochem

Alfa Aesar

abcr

AmBeed

CHEM
IMPEX

Toronto Research Chemicals
products for innovative research



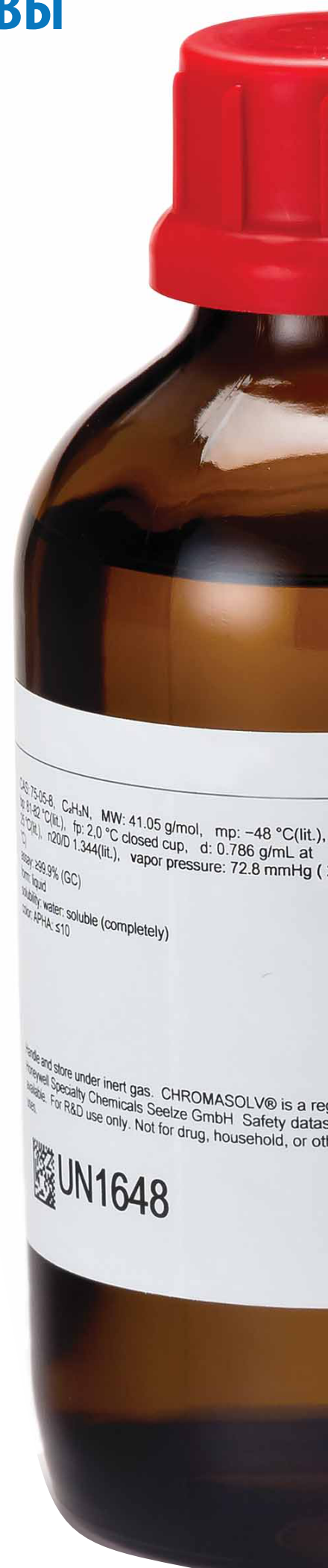
Все для Вашей лаборатории

ГАЛАХИМ

+7 (495) 151-01-50

andresyuk@gmail.com

www.galachem.ru



ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР



sib·balance

philosophy of health

СПОНСОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ

materia medica



ФЛП
ФизЛабПрибор

SARTORIUS



ВИСТЕРРА

 **РУСМЕДТОРГ**

Все для Вашей лаборатории
ГАЛАХИМ

andresyuk@gmail.com

+7 (495) 151-01-50
www.galachem.ru