

ISSN 2587-7836 (print)
ISSN 2686-8830 (online)

ФАРМАКО КИНЕТИКА и ДИНАМИКА

Включен в перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ



№4.2023

АЛЛАФОРТЕ®

таблетки

новая пролонгированная форма лаптаконитина
гидробромида с уменьшенным количеством
побочных неврологических действий

ПОКАЗАНИЯ:

- ✓ наджелудочковая и желудочковая экстрасистолия;
- ✓ пароксизмы мерцания и трепетания предсердий;
- ✓ пароксизмальная наджелудочковая тахикардия,
в том числе и при синдроме Вольфа-Паркинсона-Уайта;
- ✓ пароксизмальная желудочковая тахикардия.



АО «Фармцентр ВИЛАР»

123458, г. Москва, ул. Маршала Прошлякова, д.30

+7 (499) 519-30-88; www.allaforte.ru; www.vilar.su

Здоровье в гармонии с природой®



Издательство
ОКИ

Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора

Смирнов Валерий Валерьевич

д. фарм. н., Москва

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д. б. н., Москва

Редакционная коллегия

**Бондарева
Ирина Борисовна**
д. б. н., Москва

**Воронина
Татьяна Александровна**
заслуженный деятель науки
РФ, д. м. н., профессор, Москва

Громова Ольга Алексеевна
д. м. н., профессор, Москва

Дорофеев Владимир Львович
д. фарм. н., профессор, Москва

Ковалёв Георгий Иванович
д. м. н., профессор, Москва

Колик Лариса Геннадьевна
д. б. н., профессор РАН, Москва

**Колыванов Геннадий
Борисович**, д. б. н., Москва

Мирзоян Рубен Симонович
заслуженный деятель науки
РФ, д. м. н., профессор, Москва

**Мирошниченко Игорь
Иванович**
д. м. н., Москва

Рудакова Алла Всеволодовна
д. фарм. н., профессор,
Санкт-Петербург

**Раменская
Галина Владиславовна**
д. фарм. н., профессор, Москва

Спасов Александр Алексеевич
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Волгоград

**Стародубцев
Алексей Константинович**
д. м. н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Алексеевич
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Москва

Тюрников Иван Николаевич
член-корр. РАН, д. м. н.,
профессор, Волгоград
д. б. н., профессор РАН, Москва

Хохлов Александр Леонидович
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Ярославль

Выпускающая группа

Белоусов Дмитрий Юрьевич
Ответственный за выпуск журнала
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

**Афанасьева
Елена Владимировна**
Генеральный директор
ООО «Издательство ОКИ»
подписка
+7 (916) 986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
сайт: www.izdat-ok.ru

Жук Елена Владимировна
Дизайн и верстка
e-mail: elenazuk7@mail.ru

Подписано в печать 30.12.2023 г. Тираж 400 экз.

Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com

115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Тел./Факс: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Сайт журнала: www.Pharmacokinetics.ru Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 04.02.2021 года свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-80349. ISSN 2587-7836. Журнал включен в перечень ВАК. Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.MyRWD.ru
www.Patient-Oriented.ru
www.Pharmacogenetics-Pharmacogenomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Реальная клиническая практика: данные и доказательства
Пациентоориентированная медицина и фармация
Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru
www.izdat-Ok.ru

Центр Фармакоэкономических Исследований
Издательство ОКИ

ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Систематический анализ фармакологии стандартизированных экстрактов плаценты человека
Богачева Т. Е., Торшин И. Ю., Громова О. А. 3

Пептиды плаценты: антибактериальные эффекты
Торшин И. Ю., Богачева Т. Е., Громова О. А. 15

Изучение эффективности препарата Лаеннек при повреждении печени пальмовым маслом у крыс
Богачева Т. Е., Калачева А. Г., Громова О. А., Торшин И. Ю., Гришина Т. Р., Демидов В. И. 23

Изучение антацидного действия лекарственного препарата Антарейт® у здоровых добровольцев
Захаров К. А., Василюк В. Б., Гончаров А. С., Гончаров И. С., Лосевич А. В., Григорьев А. В., Вербицкая Е. В., Глобенко А. А., Капашин А. В., Пасько М. А. 32

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Фармакокинетика димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 у крыс. Часть 2. Кинетика распределения в органах и тканях
Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бочков П. О., Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Поварнина П. Ю., Жердев В. П. 41

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Оценка фармакокинетики тиозонида при его многократном приёме пациентами с диагнозом туберкулёз лёгких с множественной или широкой лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*
Савченко А. Ю., Кукес В. Г., Буренков М. С., Раменская Г. В. 48

Особенности влияния антиоксиданта этилметилгидроксипиридина малата и лекарственного средства убидекаренон на плазменные концентрации убихинона, убихинола и редокс-статус коэнзима Q10
Зозина В. И., Кондратенко С. Н., Ших Е. В., Красных Л. М., Мельников Е. С., Кукес В. Г. 55

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование острой токсичности нового производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на мышах
Алексеева С. В., Сорокина А. В., Волкова А. В., Мирошкина И. А., Качалов К. С., Алексеев И. В., Захаров А. Д., Дурнев А. Д. 63

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительная оценка лекарственных препаратов с действующим веществом фебуксостат различных производителей, представленных на рынке РФ, на основании исследования теста кинетики растворения
Денькина С. В., Гадаев М. Ю., Гребенкин Д. Ю., Рябова А. В., Кисляков И. В. 70

МЕТОДЫ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Разработка оптимальной схемы синтеза дипептидного лиганда TSP0, амида N-фенилпропионил-L-триптофан-1-лейцина (ГД-102), потенциального анксиолитика
Деева О. А. 83

Определение состава фармацевтической субстанции, используемой в средстве, обладающем антиаритмическим действием
Рогов А. В., Мокров Г. В. 95

НЕКРОЛОГ

ПАМЯТИ Абрека Куангалиевича Сариева 110



Chief editor

Vladimir P. Zherdev

Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor

Valery V. Smirnov

Ph.D., Moscow

Executive secretary

Alexander A. Litvin

Ph.D., Moscow

EDITORIAL BOARD

Irina B. Bondareva

Ph.D., Moscow

Tatiana A. Voronina

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Olga A. Gromova

Ph.D., Professor, Ivanovo

Vladimir L. Dorofeev

Ph.D., Professor, Moscow

Georgiy I. Kovalev

Ph.D., Professor, Moscow

Larisa G. Colic

Ph.D., Professor, Moscow

Gennady B. Kolyvanov

Ph.D., Moscow

Ruben S. Mirzoyan

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Igor I. Miroshnichenko

Ph.D., Moscow

Alla V. Rudakova

Ph.D., Professor, St. Petersburg

Galina V. Ramenskaya

Ph.D., Professor, Moscow

Alexander A. Spasov

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Moscow

Alex K. Starodubtcev

Ph.D., Professor, Moscow

Dmitry A. Sychev

Academician RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Ivan N. Tyurenkov

Corresponding Member PAS,
Ph.D., Professor, Volgograd

Alexander L. Khokhlov

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Yaroslavl

ISSUING GROUP

Dmitry Yu. Belousov

Managing Editor
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

Elena V. Afanaseva

CEO in LLC «Publishing OKI»
subscription
+7(916)986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
site: www.izdat-ok.ru

Elena V. Zhuk

Design and layout
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 30.12.2023 г. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com
115093, Moscow, Partiyinyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiskaya, 8 Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies
Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Website: www.PharmacoKinetica.ru The journal was registered with the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) on 02/04/2021, the certificate of registration of the mass media PI No. FS 77-80349. ISSN 2587-7836. **The journal is included in the list of Higher Attestation Commission (HAC) of Russian Federation.** Copying material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.MyRWD.ru
www.Patient-Oriented.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy
Good Clinical Practice
Real-World Data & Evidence
Patient-Oriented Medicine and Pharmacy
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru
www.izdat-Ok.ru

Center of Pharmacoeconomics Research
Publisher OKI

PHARMACODYNAMICS STUDIES

- Systematic analysis of the pharmacology of standardized extracts of human placenta
Bogacheva TE, Torshin IYu, Gromova OA 3
- Placenta peptides: antibacterial effects
Torshin IYu, Bogacheva TE, Gromova OA 15
- Study of the effectiveness of the drug Laennek in case of liver damage by palm oil in rats
Bogacheva TE, Kalacheva AG, Gromova OA, Torshin IYu, Grishina TR, Demidov VI 23
- Study of antacid effect of the drug Antareit® in healthy volunteers
Zakharov KA, Vasilyuk VB, Goncharov AS, Goncharov IS, Losevich AV, Grigorev AV, Verbitskaya EV, Globenlo AA, Kapashin AV, Pasko MA 32

PRECLINICAL PHARMACOKINETIC STUDIES

- Pharmacokinetics of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor GK-2 in rats. Part 2. Kinetics of distribution in organs and tissues
Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Kravtsova OYu, Gribakina OG, Povarnina PYu, Zherdev VP 41

CLINICAL PHARMACOKINETIC RESEARCH

- Evaluation of the multiple doses thiozonide's pharmacokinetics in patients diagnosed with pulmonary tuberculosis with multidrug-resistant or extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis
Savchenko AYu, Kukes VG, Burenkov MS, Ramenskaya GV 48
- Features of the influence of the antioxidant ethylmethylhydroxypyridine malate and the drug ubidecarenone on plasma concentrations of ubiquinone, ubiquinol and the redox state of coenzyme Q10
Zozina VI, Kondratenko SN, Shikh EV, Krasnykh LM, Melnikov ES, Kukes VG 55

TOXICOLOGY STUDY

- Acute toxicity study of a new dibenzofuran oxime derivative GZH-272 in mice
Alekseeva SV, Sorokina AV, Volkova AV, Miroshkina IA, Kachalov KS, Alekseev IV, Zakharov AD, Durnev AD 63

BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

- In-vitro* dissolution profiles comparison of various drugs with the active ingredient Febuxostat commercially available on the Russian market
Denkina SV, Gadaev MY, Grebenkin DYu, Ryabova AV, Kislyakov IV 70

METHODS FOR DEVELOPING NEW DRUGS

- Development of the optimal scheme for the synthesis of the dipeptide TSPO ligand, N-phenylpropionyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide (GD-102), a potential anxiolytic drug
Deeva OA 83
- Determination of the composition of pharmaceutical substances used in drugs with antiarrhythmic activity
Rogov AV, Mokrov GV 95

OBITUARY

- In Memory of Abrek K. Sariev* 110

Систематический анализ фармакологии стандартизированных экстрактов плаценты человека

© Богачева Т. Е.¹, Торшин И. Ю.², Громова О. А.²

¹ — ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново Российская Федерация

² — ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН» (ФИЦ ИУ РАН), Москва, Российская Федерация

Аннотация. В настоящее время продолжается изучение перспективных «биогенных стимуляторов», проявляющих патогенетические эффекты по отношению к различным заболеваниям. Первые результаты исследований пептидных «биогенных стимуляторов» на основе экстрактов плаценты человека (ЭПЧ) были получены проф. Филатовым В.П. в тридцатые годы 20-го века. В настоящее время, посредством современных методов постгеномной фармакологии (в т. ч. высокоточной масс-спектрометрии, иммуноферментного анализа и секвенирования), становится возможным получить новые данные о структуре и функциях пептидных экстрактов, что указывает на молекулярно-фармакологические механизмы их действия. Анализ пептидных фракций отдельных стандартизированных ЭПЧ и результаты клинических исследований этих ЭПЧ указывают на широкий спектр клинических применений ЭПЧ: (1) заболевания печени; (2) вирусные заболевания — COVID-19 и др.; (3) заболевания, сопровождающиеся перегрузкой железом и гиперферритинемией; (4) синдром хронической усталости; (5) заболевания кожи; (6) патологии суставов; (7) ускорение заживления ран; (8) заболевания, связанные с женской репродуктивной сферой.

Ключевые слова: фармакология пептидов плаценты; Лаеннек; анализ публикаций; болезни печени; регенерация; протеомные исследования

Для цитирования:

Богачева Т. Е., Торшин И. Ю., Громова О. А. Систематический анализ фармакологии стандартизированных экстрактов плаценты человека. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):3–14. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-3-14>

Поступила: 24.10.2023. **В доработанном виде:** 04.11.2023. **Принята к печати:** 14.11.2023. **Опубликована:** 30.12.2023.

Systematic analysis of the pharmacology of standardized extracts of human placenta

© Tatiana E. Bogacheva¹, Ivan Yu. Torshin², Olga A. Gromova²

¹ — FSBEI HE "Ivanovo State Medical Academy" MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

² — FRC "Computer Science and Control" RAS, Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently, the study of promising “biogenic stimulants” that exhibit pathogenetic effects in relation to various diseases continues. The first results of studies of peptide “biogenic stimulants” based on human placenta extracts (HPE) were obtained by Prof. Filatov VP in the thirties of the 20th century. Currently, through modern methods of postgenomic pharmacology (including high-precision mass spectrometry, enzyme-linked immunosorbent assay and sequencing), it becomes possible to obtain new data on the structure and functions of peptide extracts, which indicates the molecular pharmacological mechanisms of their action. Analysis of peptide fractions of individual standardized ENPs and the results of clinical studies of these ENPs indicate a wide range of clinical applications of ENPs: (1) liver diseases; (2) viral diseases — COVID-19, etc.; (3) diseases accompanied by iron overload and hyperferritinemia; (4) chronic fatigue syndrome; (5) skin diseases; (6) joint pathologies; (7) acceleration of wound healing; (8) diseases associated with the female reproductive system.

Keywords: pharmacology of placental peptides; Laennec; analysis of publications; liver diseases; regeneration; proteomic studies

For citations:

Bogacheva TE, Torshin IYu, Gromova OA. Systematic analysis of the pharmacology of standardized extracts of human placenta. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):3–14. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-3-14>

Received: 24.10.2023. **Revision received:** 04.11.2023. **Accepted:** 14.11.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

Профессор Филатов В.П. — основоположник изучения многокомпонентных пептид-содержащих экстрактов природного происхождения, т. е. «биогенных стимуляторов». В работах Филатова В. П. показано, что биогенные стимуляторы могут быть получены из тканей в виде стерилизованных водных экстрактов, содержат дикарбоновые кислоты, гормоны, пептиды, ферменты, действуют на весь организм «в целом» и одновременно проявляют более специфическое воздействие на активность определённых ферментов в биологических тестах [1, 2]. В рамках данного научного направления были разработаны ноотропные препараты кортексин (экстракт пептидов мозга крупного рогатого скота), церебролизин (экстракт мозга свиней), цере-

бромедин (экстракт тканей мозга телят и молодых свиной), тималин (экстракт вилочковой железы крупного рогатого скота), солкосерил и актовегин (экстракты крови), раверон (на основе экстрактов предстательной железы), экстракты плаценты человека (ЭПЧ) и др.

Получение эффективных и безопасных полипептидных препаратов из природного сырья стало возможным после стандартизации состава экстрактов при использовании методов современной биохимии, молекулярной биологии, постгеномной фармакологии (транскриптомика, протеомика, метаболомика) и обработки собираемых данных посредством методов интеллектуального анализа данных, развиваемых в математической школе академика РАН Журавлёва Ю.И. (см. ресурсы www.bigdata-mining.ru и www.pharmacoinformatics.ru). Результаты подобных

исследований, включающих анализы пептидного, аминокислотного [3, 4], микроэлементного и витаминного аспектов состава ЭПЧ [5], позволили получить фундаментальные данные о составе полипептидных препаратов ЭПЧ.

Результаты клинических исследований стандартизированного ЭПЧ указывают на широкий спектр применений: полипептидная терапия заболеваний печени, вирусные заболевания (COVID-19 и др.), заболевания, сопровождающиеся перегрузкой железом и гиперферритинемией, повышение адаптационных резервов организма, терапия заболеваний кожи и суставов, а также применение препаратов ЭПЧ в лечении заболеваний, связанных с репродуктивной сферой [6].

В настоящей статье систематизированы результаты фундаментальных и клинических исследований ЭПЧ. В анализируемый массив литературы вошли 5476 публикаций, найденных в базе данных PUBMED по запросу «(placenta extract*) OR (placental extract*) OR (placenta* hydrolysate*)». Анализ данного массива научных публикаций был проведён с использованием современных подходов к машинному обучению, развиваемых в рамках топологического подхода к распознаванию [7].

Лечение заболеваний печени / Treatment of liver diseases

Стандартизированные ЭПЧ оказывают комплексное регенераторное воздействие на структуру и функцию печени и применяются для лечения стеатогепатитов [8], вирусных заболеваний печени [9], для улучшения моторной функции билиарного тракта. ЭПЧ способствуют развитию цитопротективного эффекта, восстановлению текучести мембран гепатоцитов, стимулируют процессы желчеобразования и желчеотделения, нормализуют моторику сфинктеров и моторику желчного пузыря [10]. ЭПЧ улучшают эффективность противовирусной терапии хронических гепатитов в стадии цирроза и устраняют резистентность к противовирусным препаратам, снижая их побочные эффекты (гипертермия, мышечная слабость, панцитопения) [11, 12].

Гепатопротекторные эффекты ЭПЧ связаны с компонентами препарата, в т. ч. биологически активными фрагментами фактора роста гепатоцитов (HGF, стимулирует деление гепатоцитов и оказывает фибринолитическое воздействие на соединительную ткань), инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1, осуществляет эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма, стимулирует регенерацию клеток, блокирует развитие апоптоза, снижает инсулинорезистентность).

Аминокислоты, входящие в состав Лаеннек: валин, лейцин, изолейцин, метионин, треонин, фенилаланин, выступают в роли гепатопротекторов. Являясь

структурными компонентами печени, аминокислоты модулируют её деятельность, нормализуют синтез белков и нуклеотидов, препятствуют отложению жиров, снижают показатели ЛПНП, триглицеридов, коэффициента атерогенности, способствуют нормализации процесса обмена аммиачных соединений [11–13]. Напомним, что аммиак индуцирует окислительный стресс, эндотериальную дисфункцию, апоптоз гепатоцитов, активирует звездчатые клетки, способствуя прогрессированию фиброза печени и портальной гипертензии. Нормализация уровня аммиака крови имеет важное клиническое значение в терапии НАЖБП и НАСГ, способствуя снижению риска фиброза печени [14].

Пептиды в составе ЭПЧ Лаеннек поддерживают инозитолфосфат-зависимые сигнальные пути регенерации гепатоцитов, активируют таргетные белки RARA, AMPK; ингибируют таргетные белки Notch1, GSK-3, PAK1 и TLR4 [9], способствуют торможению апоптоза клеток в условиях хронического воспаления за счёт активации антиапоптотического белка Bcl-2, ингибирования MAP-киназ, активации NF- κ B. Противовоспалительный механизм ЭПЧ связан с нормализацией уровней провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- α , и значительным снижением активности АСТ, АЛТ [3, 4].

Комплексное антиапоптотическое, фибринолитическое, антиоксидантное воздействие препарата способствует снижению воспалительного процесса в ткани печени, предотвращая прогрессирование фиброза печени, что было подтверждено в клиническом исследовании. Курсовое применение ЭПЧ (по 6 мл внутривенно 3 раза в неделю, затем по 6 мл внутримышечно 1 раз в 10 дней до 24 недель) у пациентов со стеатогепатитами смешанной этиологии с наличием биохимической активности, ожирением, дислипидемией, инсулинорезистентностью, имеющих стеатоз печени и фиброз печени не менее 1 стадии (определялся на фибросканировании печени), вызвало достоверные изменения ($p < 0,05$) по оцениваемым параметрам: снижение активности воспалительного процесса: АЛТ — 21 %, АСТ — 24 %, СРБ — 21 %; синдрома холестаза ГГТП — 26 %; индекс инсулинорезистентности — 13 %; коррекция дислипидемии ЛПНП — 17 %, триглицериды — 17 %, КА — 18 %; стеатоз печени — 20 %. Регресс клинической симптоматики, синдрома цитолиза и холестаза при лечении хронических диффузных заболеваниях печени сохранялся после окончания терапии [15].

Экспериментальные исследования токсического поражения печени крыс тетрахлохлоруглеродом (модель НАЖБП без фиброза, используемая для оценки эффектов препарата Лаеннек для защиты печени от ожирения, включала введение гепатотоксина тетрахлохлоруглерода СС14 подкожно в течение 4 последовательных дней в дозе 0,2 мл/кг, после чего животным вводили ЭПЧ подкожно в течение 5 последовательных дней

в дозе 3,6 мл/кг; модель НАЖБП с фиброзом включала введение 1 мл/кг СС14 подкожно 2 раза в неделю, 12 недель, затем вводили Лаеннек в дозе 3,6 мл/кг в течение 5 недель, 3 раза в неделю) показали нормализацию размеров печени, липидного обмена (в т. ч. общего холестерина) и торможение развития фибротических изменений ткани печени при отсутствии каких-либо неблагоприятных эффектов (на центральную нервную систему, функцию дыхания, артериальное давление, работу сердца) терапии ЭПЧ по сравнению с группой контроля. Гепатопротекторный эффект развился через 2 недели и сохранялся через 6 недель после прекращения введения ЭПЧ [16].

В контролируемом исследовании пациентов с НАЖБП в форме ранней стадии (фиброз отсутствует или незначительный) применение ЭПЧ (в дозе 2 мл/сут внутримышечно, курс 20 инъекций) приводило к достоверному улучшению клинической картины НАЖБП (снижение ощущений вздутия и боли в области печени, усталости, улучшение аппетита) на фоне нормализации биохимических показателей дисфункции печени (АСТ, АЛТ, ГГТ) по сравнению с группой контроля (пациенты с НАЖБП в форме ранней стадии, не получающие ЭПЧ). При этом наибольший эффект терапии развивался к концу второй недели терапии ЭПЧ (снижение уровней АСТ — на 58 ± 4 Ед/л, АЛТ — на 32 ± 6 Ед/л, ГГТ — на 202 ± 21 МЕ/л во всех случаях). Однако уже к концу 1-й недели в группе, получавших ЭПЧ, зарегистрировано достоверное снижение уровней АСТ, АЛТ и ГГТ. На момент окончания исследования (3-я неделя) снижение концентраций в сторону интервала нормы было ещё более выражено для всех трёх биомаркеров [16].

В контролируемом исследовании в группе терапии больные с НАЖБП и с циррозом печени получали стандартизированный ЭПЧ ежедневно внутривенно 5 раз в неделю в течение 2 недель (две ампулы — 4 мл препарата смешивались с 500 мл 5 % раствора глюкозы, весь объём раствора вводился путём внутривенной капельной инфузии через локтевую вену в течение 1,5–2 ч.) Затем больные наблюдались в течение ещё 1 недели (40 мл на курс). К концу 1-й недели терапии в группе получавших ЭПЧ зарегистрировано существенное снижение уровней АСТ (–35 Ед/л), АЛТ (–45 Ед/л) и ГГТ (–23 Ед/л), а через 3 нед. результаты были ещё более выраженными. Субъективная симптоматика НАЖБП (утомляемость, анорексия, вздутие живота, запор, тошнота и боль в подреберье) улучшилась через 2–3 нед. наблюдения. На момент окончания исследования (3-я неделя) снижение концентраций в сторону интервала нормы было ещё более выражено для всех трёх биомаркеров. Нежелательных явлений зарегистрировано не было [17].

В клинических исследованиях показано влияние ЭПЧ на моторную функцию билиарного тракта у пациентов с жировой дистрофией печени [10]. Лечение ЭПЧ пациентов с жировым гепатитом, не откликаясь

на модификацию диеты и других факторов образа жизни, приводило к значительному снижению уровней АСТ, АЛТ и к улучшению гистологической картины печени [18].

ЭПЧ снижал гепатотоксическое действие метотрексата в эксперименте. В течение 2 недель животным (крысы) вводили метотрексат внутрь в дозе 5 мг/кг. Опытной группе вводили инъекции ЭПЧ внутривентально в дозе 10 мг/кг, животные контрольной группы не получали инъекций ЭПЧ. У животных, получавших метотрексат, отмечены достоверно ($p < 0,01$) повышенные уровни ферментов печени: АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы (ЩФ), общего билирубина, общего холестерина и уровня триглицеридов. Введение ЭПЧ достоверно снижало повышенные уровни АСТ, АЛТ, ($p < 0,001$). Кроме того, введение ЭПЧ снижало уровень МД, повышало уровень антиоксиданта глутатиона и активность антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в печени. Высокий уровень провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-6 и ИЛ-10, вызванный приёмом метотрексата, снижался в группе животных, принимающих ЭПЧ. Гистопатологические исследования показали, что метотрексат вызывает выраженные повреждения структуры клеток и провоспалительные повреждения структуры тканей печени, тогда как введение ЭПЧ вызывало снижение этих нарушений (рис. 1) [19].

Установлен эффект снижения апоптоза гепатоцитов при применении ЭПЧ у крыс при поражении печени, вызванном бактериальными липополисахаридами (ЛПС). Животным вводили ЛПС (15 мг/кг), D-галактозамин (D-GalN из расчёта 700 мг/кг) совместно с ЭПЧ в разной дозе (1,2; 2,4 и 3,6 мл/кг) либо без ЭПЧ (контроль). При введении ЛПС у животных наблюдаются выраженные проявления апоптоза гепатоцитов, поражение области дольки, содержащей раздутые гепатоциты, и гепатоциты, увеличенные жировыми вакуолями. По сравнению с контролем, применение ЭПЧ снижало повреждаемость клеток печени от апоптоза, приводя к снижению показателей АЛТ, АСТ, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), ИЛ-6 и ФНО- α при одновременном повышении уровня внутриядерного антигена пролиферирующих клеток (белок PCNA). ЭПЧ стимулировал экспрессию антиоксидантных ферментов СОД1/СОД2, глутатионпероксидазы и каталазы, что вызвало уменьшение содержания активных форм кислорода в цитозоле и в митохондриях. PCNA-положительные клетки были достоверно менее многочисленны в группе, получавшей D-GalN/ЛПС, чем в контрольной группе; добавление ЭПЧ приводило к значительной сверхэкспрессии PCNA в печени по сравнению с лечением только D-GalN/ЛПС. В группе, получавшей только D-GalN/ЛПС, TUNEL-положительных клеток было больше по сравнению с контрольной группой. Однако индукция апоптоза с помощью D-GalN/ЛПС была дополнительно снижена в группах, получавших 1,2; 2,4 и 3,6 мл/кг ЭПЧ (рис. 2) [20].

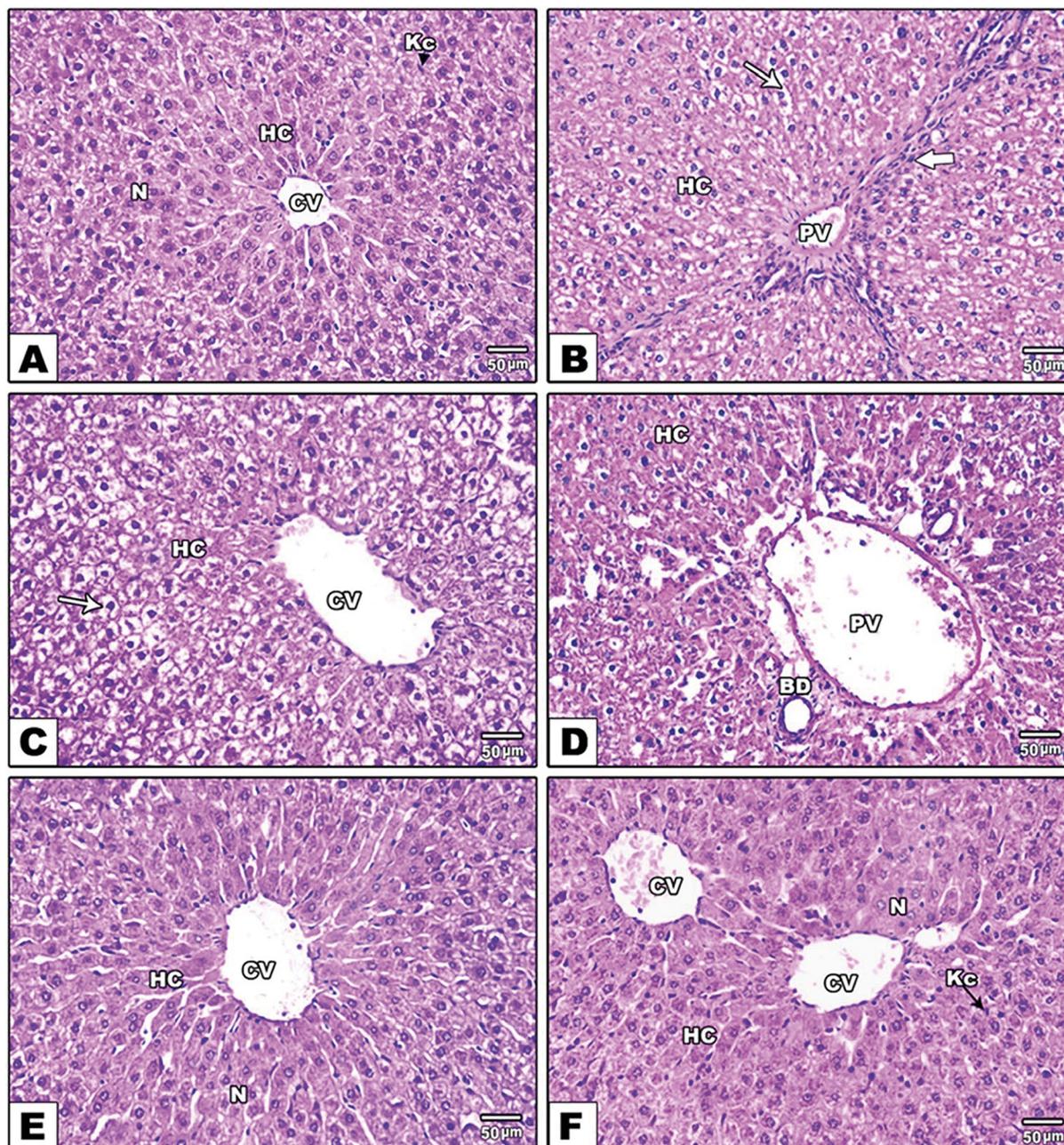


Рис. 1. Гистопатологический анализ влияния ЭПЧ на гепатотоксичность, вызванную метотрексатом у крыс. Увеличение $\times 200$. А — Неповреждённый контроль, показывающий нормальную гистологическую архитектуру гепатоцитов (HC); центральная вена (CV); и ячейка Купфера (Kc). В, С, D — Группа крыс обработанных метотрексатом, демонстрирующая гепатоциты (HC) с цитоплазматической вакуолизацией (тонкая стрелка); дилатация центральной вены (CV) и воротной вены (PV); воспалительные лейкоцитарные инфильтраты (толстая стрелка); и гиперплазия желчных протоков (Bd). Е — Крысы, получавшие как метотрексат, так и ЭПЧ показали гепатоциты (HC) с нормальными ядрами (N) и центральной веной (CV). F — Крысы, получавшие ЭПЧ, показали нормальные гепатоциты (HC) с круглыми базофильными ядрами (N) и нормальные клетки Купфера (Kc)

Fig. 1. Histopathological analysis of the effect of EPC on hepatotoxicity caused by methotrexate in rats. Magnification $\times 200$. A — Intact control showing normal histological architecture of hepatocytes (HC); central vein (CV); and Kupfer cell (Kc). B, C, D — Group treated with methotrexate, demonstrating hepatocytes (HC) with cytoplasmic vacuolation (thin arrow); dilation of the central vein (CV) and portal vein (PV); inflammatory leukocyte infiltrates (thick arrow); and bile duct hyperplasia (Bd). E — Rats treated with both methotrexate and EPC showed hepatocytes (HC) with normal nuclei (N) and central vein (CV). F — Rats treated with EPC showed normal hepatocytes (HC) with round basophilic nuclei (N) and normal Kupfer cells (Kc)

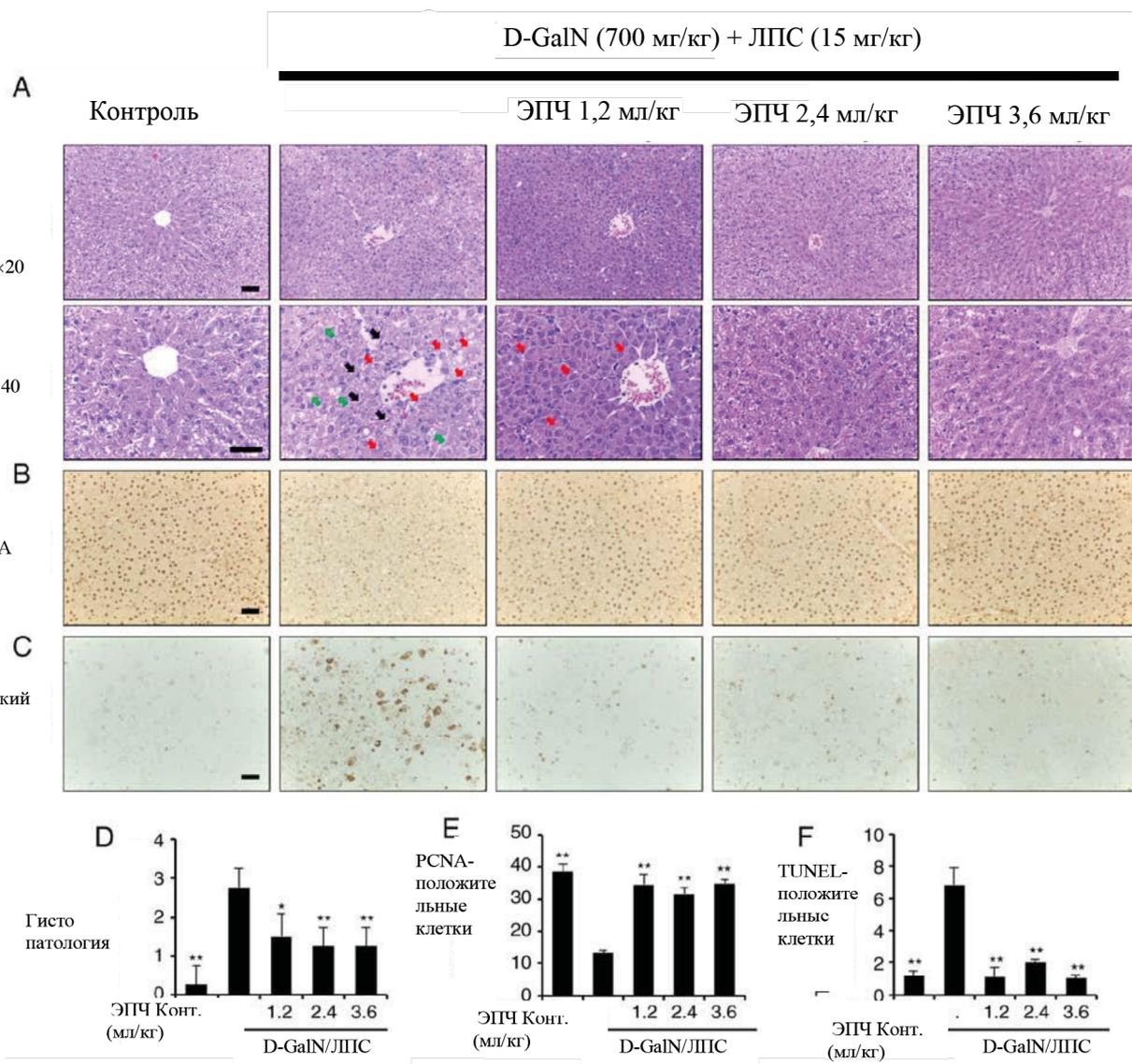


Рис. 2. Влияние лечения ЭПЧ на острую печёночную недостаточность, вызванную D-GalN/ЛПС, при дегенерации тканей и апоптозе. (A) Гистопатологическое окрашивание. Верхняя панель (увеличение×20), нижняя панель (увеличение×40). Масштабная линейка = 100 мкм. Стрелки указывают апоптотические гепатоциты (чёрные), сильно поражённую область дольки, содержащую раздутые гепатоциты (красные) и гепатоциты, увеличенные жировыми вакуолями (зелёные). (B) Изображения, показывающие окрашивание PCNA. Масштабная линейка 100 мкм. (C) Апоптотический ответ на D-GalN/ЛПС в ткани печени крыс исследовали с помощью окрашивания TUNEL. Масштабная линейка = 100 мкм. (D) Окрашенные срезы оценивали по гистопатологии с использованием 4-балльной шкалы (0–3), где 0, 1, 2 и 3 означают отсутствие повреждений, лёгкое повреждение, среднее повреждение и серьёзное повреждение, соответственно. (E) PCNA-положительные клетки. (F) TUNEL-положительные клетки.

Fig. 2. The effect of EPC treatment on acute liver failure caused by D-GalN/LPS in tissue degeneration and apoptosis. (A) Histopathological staining. Upper panel (magnification×20), lower panel (magnification×40). Scale ruler = 100 microns. The arrows indicate apoptotic hepatocytes (black), a severely affected area of the lobule containing swollen hepatocytes (red), and hepatocytes enlarged by fatty vacuoles (green). (B) Images showing PCNA staining. A scale ruler of 100 microns. (C) The apoptotic response to D-GalN/LPS in rat liver tissue was studied using TUNEL staining. Scale ruler = 100 microns. (D) Stained sections were evaluated by histopathology using a 4-point scale (0–3), where 0, 1, 2 and 3 mean no damage, light damage, medium damage and serious damage, respectively. (E) PCNA-positive cells. (F) TUNEL-positive cells

Примечания: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению с группой D-GalN/ЛПС. ЭПЧ — экстракт плаценты человека; D-GalN — D-галактозамин; ЛПС — липополисахарид; PCNA — ядерный антиген пролиферирующих клеток [20].

Notes: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ compared to the D-GalN/LPS group. EPC — human placenta extract; D-GalN — D-galactosamine; LPS — lipopolysaccharide; PCNA — nuclear antigen of proliferating cells [20].

В эксперименте у животных с моделью НАСГ (мыши линии dB/dB, для которых характерно ожирение и инсулинорезистентность, вызванная дефицитом метионина и холина) отмечено развитие атрофии печени с фиброзом синусов печени. Стандартизированный ЭПЧ снижал фиброз печени у мышей. ЭПЧ дозозависимо снижал периваскулярный фиброз и экспрессию профибротических генов *Acta2* (актин), *Colla1* (коллаген) и *Tgfb1* (трансформирующий фактор роста) в звёздчатых клетках печени, также ингибируя сигнальный каскад Smad-белков (передача сигналов от рецептора *Tgfb1*). ЭПЧ повышал экспрессию генов, кодирующих антиоксидантные ферменты каталазу (ген *Cat*), СОД1 (ген *Sod1*), хинон редуктазу (ген *Nqo1*), гемоксидазу (ген *Hmox1*). Также ЭПЧ повысил экспрессию гена транскрипционного фактора *NRF2*, регулирующего гены антиоксидантного ответа [21]. Применение ЭПЧ в модели неалкогольного стеатогепатита также снижает уровни ФНО- α и металлопротеиназы-9, повышая экспрессию синтетазы азота и антиапоптотических факторов *bcl-2* и *bcl-xL* [22].

Об использовании ЭПЧ для протекции других внутренних органов / About the use of HRP for the protection of other internal organs

Стандартизированные ЭПЧ вызывают протективные эффекты в лёгких, почках, сердце, мозге, мышцах и других органах. Известно, что введение ЭПЧ уменьшало структурные изменения лёгких, вызванные амиодароном [23], показало протекторное действие на сердце на модели адреналинового повреждения [24], снижало гипертрофию и фиброз тканей сердца на модели кахексии [25], может способствовать снижению саркопении [26], нейропротекции [27] и защите органов от гемосидероза [28].

Основной гормон гомеостаза железа — гепсидин, определяющий содержание ферритина, который синтезируется в печени и отвечает за всасывание, транспортировку, биотрансформацию, депонирование железа в организме. При хронических заболеваниях печени на фоне системного воспалительного

ответа увеличение уровня гепсидина и ферритина способствует ПОЛ биологических мембран и цитотоксическому эффекту, токсическому повреждению белков и аминокислот. В составе ЭПЧ определены 19 пептидов, важных для регулировки гомеостаза железа. Регулируя уровни гепсидина, снижается синтез ферритина, одновременно с противовоспалительным и иммуномодулирующим эффектами эти пептиды способствуют устранению нарушений обмена железа [29]. В эксперименте применение ЭПЧ на модели хронической перегрузки железом у крыс, которая была воспроизведена двухмесячным приёмом $FeSO_4$ или полимальтозного железа, вызывало снижение повреждения клеток печени и увеличение элиминации гемосидероза — избыточных отложений неорганического железа в печени, почках и головном мозге [28].

В эксперименте показано влияние стандартизированного ЭПЧ на обмен железа у мышей линии C57BL/6 с моделью перегрузки железом, вызванной диетой с дефицитом метионина и холина на фоне повышенного содержания железа в пище (2 % вместо ~0,00001 %). У животных через 7 дней приёма диеты с избытком железа наблюдается гемосидероз вокруг воротной вены печени, что связано с повышением уровня гепсидина в сыворотке (который ускоряет выведение железа из организма), накопление активированных макрофагов в синусах печени, повышенная экспрессия в печени генов, связанных с воспалением и окислительным стрессом. Применение ЭПЧ привело к уменьшению отложения железа в печени и повышению экскреции железа с желчью, снижению накопления активированных макрофагов, воспаления и окислительного стресса [30].

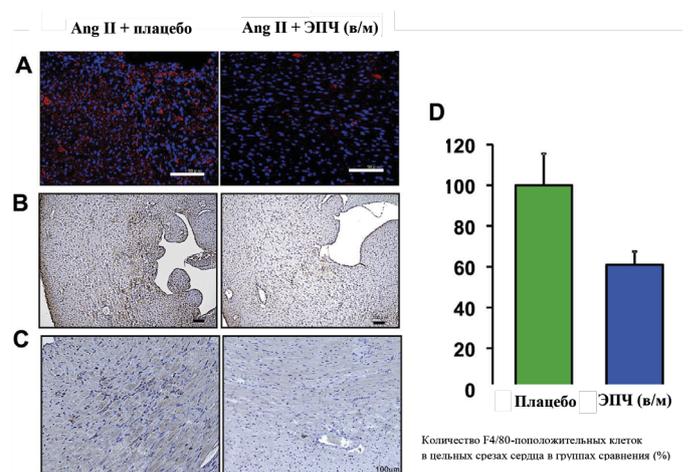
Введение ЭПЧ подавляет гипертрофию и фиброз тканей сердца на модели кахексии у мышей, индуцированной ангиотензином II (*Ang II*) в течение 7 суток. ЭПЧ не изменял массу тела, процент жировых отложений, мышечную массу тела без какого-либо воздействия на количество потребляемой пищи. Применение *Ang II* вызывало гипертрофию и фиброз сердца, а ЭПЧ подавлял эти эффекты, снижая воспаления и окислительный стресс в митохондриях (рис. 3) [25].

Рис. 3. Влияние ЭПЧ на инфильтрацию воспалительными клетками сердца

Fig. 3. The effect of EPF on infiltration by inflammatory cells of the heart

Примечания: Иммуноокрашивание маркеров воспалительных клеток в срезах левого желудочка мышей, которым в течение 7 дней вводили *Ang II*, с ЭПЧ и без него. А) CD45 (пан лейкоцитарный маркер). В) F4/80 (маркер макрофагов). С) CD3 (маркер Т-клеток). Шкала 100 мкм. Д) Относительное число F4/80-положительных клеток. Подсчитывали количество F4/80-положительных клеток в целых срезах сердца. Количество клеток в группе *AngII* + физ. р-р было присвоено значение 100 %.

Notes: Immunocoloration of inflammatory cell markers in sections of the left ventricle of mice that were injected with *Ang II* for 7 days, with and without EPF. A) CD45 (pan leukocyte marker). B) F4/80 (macrophage marker). C) CD3 (T-cell marker). Scale of 100 microns. D) The relative number of F4/80-positive cells. The number of F4/80-positive cells in whole sections of the heart was calculated. The number of cells in the *AngII* + phys.r-r group was assigned a value of 100 %.



В экспериментах на культурах эндотелиоцитов (линии HUVEC и EA.hy926) было показано, что добавление экстракта плаценты свиней снижает нарушения функции эндотелиоцитов, вызванные высоким содержанием глюкозы. Под воздействием экстракта отмечено значительное увеличение жизнеспособности и миграции клеток в условиях глюкозного стресса, связанное с уменьшением расщепления каспазы-9 и каспазы-3, повышением уровня антиапоптотического белка Bcl-2 и с восстановлением активации каскадов PI3K/Akt/ERK1/2 [31].

Антиоксидантное действие стандартизированного ЭПЧ исследовано на клеточной модели саркопении. Мышечные клетки линии C2C12, предварительно обработанные H_2O_2 , достоверно увеличивали жизнеспособность при добавлении ЭПЧ (+15 %). ЭПЧ восстанавливал морфологию миоцитов до состояния клеток, культивируемых в нормальных условиях. Сниженная гибель миоцитов при добавлении ЭПЧ была связана со снижением экспрессии миостатина — белка, который подавляет рост и дифференцировку мышечной ткани [26].

При воздействии на культуру первичных культивируемых кортикальных нейронов, обработанных амилоидным белком, стандартизированный экстракт плаценты лошади (JBP-F-02) усиливал нейрогенез, дозозависимо увеличивая количество нервных стволовых клеток и длину дендритов [32].

Стандартизированный ЭПЧ ослаблял неврологические симптомы в экспериментальном рассеянном склерозе на модели аутоиммунного энцефаломиелита (АИЭ), вызванного инъекцией гликопротеина миелиновых олигодендроцитов MOG. Лечение ЭПЧ начинали с 4-го дня после инъекции MOG путём внутрибрюшинного введения 0,2 мг/кг ЭПЧ (через день, 4 нед.). Введение ЭПЧ достоверно снижало среднее значение балла клинической тяжести течения АИЭ у мышей, уменьшало системное воспаление и ослабляло демиелинизацию. Концентрация ИЛ-23 (активирует провоспалительные Т-клетки типа Th17) достоверно снижалась в сыворотке крови, а концентрация ИЛ-27 (поддерживает баланс провоспалительных и противовоспалительных процессов) достоверно увеличивалась [27].

Воздействие ЭПЧ на заживление ран и состояние кожи / The effect of HRP on wound healing and skin condition

Пептиды, входящие в состав стандартизированных ЭПЧ, вызывают стимуляцию рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR), что определяет его регенераторные эффекты [33]. При применении ЭПЧ в эксперименте были получены данные по улучшению ранозаживления в модели лоскутной раны [34], эпителизации ран роговицы [35], нормализации пигментации кожи [36]. ЭПЧ также способствует нормализации

роста волос [37]. В клинической практике возможны перспективы применения ЭПЧ для лечения рубцовых изменений кожи [38] и при диффузной аллопеции у женщин в послеродовой период [39]. ЭПЧ применяются для лечения подслизистого фиброза полости рта [40]. Разработан способ лечения хронического воспаления при воспалительных заболеваниях слизистой оболочки рта с элементами гиперкератоза [41].

Антистрессовые эффекты / Anti-stress effects

Перспективными являются использования ЭПЧ при реабилитации и лечении пациентов с синдромом хронической усталости, т. к. специфические пептиды в составе ЭПЧ вызывают модуляцию функции митохондрий [42, 43]. Кроме того, на модельном организме *Caenorhabditis elegans* условиях теплового, токсического и оксидативного стресса было показано, что добавление ЭПЧ увеличивало продолжительность жизни *Caenorhabditis elegans* на 92 % по сравнению с контролем (геропротекция) [44, 45]. Геропротекторные эффекты ЭПЧ связаны с наличием в его составе фрагментов проэнкефалина А и пептидов — ингибиторов таргетных белков CDK1, IKKB, mTOR [46]. Эти эффекты ЭПЧ могут быть полезны в терапии синдрома хронической усталости.

Лечение заболеваний суставов и костной ткани / Treatment of diseases of joints and bone tissue

В эксперименте показано влияние стандартизированного ЭПЧ Лаеннек на заживление связок у крыс ($n = 99$). ЭПЧ поддерживал количество активированных макрофагов, аналогичное интактной группе. В результате применения ЭПЧ отмечены более низкие уровни дегенеративных изменений через 4 недели после лечения, повышенная экспрессия коллагена I типа и теномодулина в хондроцитах ($p < 0,05$) [47]. Интересно также отметить, что ЭПЧ поддерживает дифференциацию и ангиогенез в ткани пульпы зубов, способствуя образованию дентина, одонтобластических слоев и дентинальных канальцев [48].

Результаты экспериментальных исследований препаратов на основе ЭПЧ показывают перспективность их применения в терапии остеоартрита. Например, показан эффект инъекций ЭПЧ у пациентов с остеоартритом коленного сустава: после 5-недельного курса лечения ЭПЧ состояние пациентов улучшалось по шкале Келлгрена—Лоуренса на фоне снижения отёчности коленного сустава [49].

О применении ЭПЧ в терапии atopического дерматита / About the use of EPC in the treatment of atopic dermatitis

В многочисленных исследованиях показана эффективность использования стандартизированных ЭПЧ atopического дерматита (АтД). Наличие в составе

ЭПЧ пептидов с противовоспалительным действием (фрагменты проэнкефалина, пептиды—ингибиторы каскада NF- κ B) и высокая степень стандартизации и очистки от примесей [4–6] (которые могут вызывать аллергические реакции) указывают на перспективность использования стандартизированных ЭПЧ в терапии аллергии и атопического дерматита (АтД). Например, применение ЭПЧ Лаеннек в комплексной терапии АтД у пациентов 18–52 лет приводило к выраженному уменьшению основных клинических симптомов АтД по шкалам SCORAD и IGA по сравнению с применением стандартной терапии [50].

Антибактериальные и противовирусные свойства ЭПЧ / Antibacterial and antiviral properties of EPC

Анализ ЭПЧ позволил выделить 14 пептидов, характеризующихся потенциальным противовирусным действием на всех стадиях жизненного цикла вирусов. Пептиды ЭПЧ могут тормозить активацию вирусов (ингибирование белка HCFC1), слияние вирусной оболочки с плазматической мембраной на стадии инфицирования вирусом клетки-хозяина (ингибирование белка CD4), репликацию вируса (ингибирование белка STBP1), созревание вириона (ингибирование белков CRM1, VPS4B, TPR, пролин изомеразы), отпочковывание вирусных частиц от клеточной мембраны (ингибирование белка NEDD4) [51].

Показана эффективность стандартизированных ЭПЧ в терапии генитальной рецидивирующей герпесвирусной инфекции 1-го и 2-го типов. Дополнение терапии ацикловиром ЭПЧ приводило к снижению длительности проявления повышенной температуры тела, озноба, головной боли, зуда и жжения [52].

Показано прямое противовирусное действие ЭПЧ Лаеннек против SARS-CoV-2. В эксперименте *in vitro* ЭПЧ дозозависимо ослаблял репликацию вируса в культуре клеток линии Vero (клетки инфицировали SARS-CoV-2 и далее культивировали с ЭПЧ в течение 72 часов). В эксперименте *in vivo* на хорьках применение ЭПЧ приводило к снижению потерь массы тела и количества вирусов в смывах из носа, в носовых раковинах и в лёгких. ЭПЧ усиливал экспрессию генов интерферонов I и II типа, что указывает на системную противовирусную эффективность ЭПЧ [53].

ЭПЧ эффективен для лечения пациентов с тяжёлым течением COVID-19 на фоне гиперферритинемии. Как известно, гиперферритинемия при COVID-19 ассоциирована с дисфункцией печени и с повышенным риском т. н. цитокинового шторма. Применение ЭПЧ (6 мл на 350 мл 0,9 % р-ра NaCl, внутривенно капельно первые 3 дня, с 4 дня — 6 мл на 250 мл 0,9 % р-ра NaCl) у пациентов 39–86 лет с длительным, застойным течением COVID-19 приводило к положительной клинической динамике: снижению уровней ферритина (у мужчин на — 282 мкг/л, у женщин на — 80 мкг/л, $p = 0,039$), увеличению оксигенации крови

до диапазона физиологической нормы ($p = 0,0029$), снижению объёма повреждения лёгких по данным КТ (в среднем — 10 %, $p = 0,0027$), повышению относительного содержания лимфоцитов (+8 %, $p = 0,04$), нормализации маркеров дисфункции печени (АСТ, АЛТ), креатинина, а также систолического АД ($p < 0,05$). Все пациенты, получавшие ЭПЧ, выздоровели в течение 3–15 дней после начала применения препарата и были выписаны с отрицательным ПЦР-тестом на вирус SARS-CoV-2 [54].

ЭПЧ также проявляют антибактериальные эффекты и тормозят рост колоний патогенных бактерий (т. н. «биоплёнки»). Обработка колоний ЭПЧ приводила к снижению количества внеклеточной ДНК (которая является маркёром активности биоплёнки). Кроме того, ЭПЧ противодействовали росту патогенной флоры в модели раны, содержащей биоплёнки [55].

ЭПЧ в лечении заболеваний репродуктивной системы / EPH in the treatment of diseases of the reproductive system

Показан терапевтический эффект ЭПЧ на токсичность яичек, вызванную доксорубицином у самцов крыс. При воспроизведении модели отмечено значительное снижение уровней тестостерона, ФСГ и ЛГ в сыворотке по сравнению с интактным контролем. Применение ЭПЧ тормозит эти неблагоприятные гормональные воздействия доксорубицина [56].

ЭПЧ улучшают инвазию трофобласта посредством регуляции экспрессии гена HLA-G. Регулируемая трофобластная инвазия и иммуномодуляция на границе фето-материнской области важны при имплантации и развитии плода [56]. Стандартизированный ЭПЧ эффективен в терапии бесплодия у пациенток с недостаточной пролиферацией эндометрия [57]. По данным М-эхографии, применение ЭПЧ приводило к достоверному росту толщины эндометрия в пролиферативной фазе цикла, причём без стимуляции гиперпролиферации эндометрия. Положительный результат сохранялся, как минимум, в течение 6 месяцев после терапии [58].

ЭПЧ применяется в терапии гипопластического хронического эндометрита — аутоиммунного заболевания, приводящего к бесплодию и невынашиванию. В то время как стандартная терапия (антибиотики) не оказывает влияния на клеточный состав эндометрия, применение ЭПЧ приводило к нормализации клеточного состава эндометрия (показатели CD3+, CD4+, CD8+, CD56+), снижению аутоиммунизации (IgG), улучшению кровоснабжения миометрия и эндометрия и утолщению эндометрия без гиперпролиферации [59].

Заключение / Conclusion

Плацентарная терапия, предложенная проф. Филатовым В.П., существенно развилась за последние 50 лет. С помощью современных методов постгеномной

фармакологии стало возможным изучение состава стандартизированных экстрактов плаценты человека, которые являются многокомпонентными препаратами (аминокислоты, пептиды, микроэлементы, витамины и др.) и определение механизмов их фармакологического действия. Экспериментальные и клинические исследования стандартизированных ЭПЧ показывают перспективность применения ЭПЧ для регенерации тканей организма, нормализации хронического воспаления, ранозаживления и стимуляции противовирусного иммунитета. Включение ЭПЧ в терапию заболеваний печени различной этиологии (НАЖБП, вирусного гепатита и др.), герпетической инфекции, COVID-19, гемохроматоза, остеоартрита, хронического эндометрита, диффузной алопеции, рубцовых изменений кожи, атопического дерматита и синдрома хронической усталости повышает результат лечения.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

Participation of authors. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Богачева Татьяна Евгеньевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: tatiana.boga4iova@yandex.ru.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ

ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново,

Российская Федерация

Tatiana E. Bogacheva

Corresponding author

e-mail: tatiana.boga4iova@yandex.ru.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

PhD, Cand. Sci. Med., Associate Professor of the

Department of Pharmacology of the FSBEI HE

IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

Торшин Иван Юрьевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>

SPIN-код: 1375-1114

к. ф-м. н., к. х. н., в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва,

Российская Федерация

Ivan Yu. Torshin

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>

SPIN code: 1375-1114

PhD, Cand. Physico-Mathematical Sci., Cand.

Chemical Sci., Leading researcher FRC CSC RAS,

Moscow, Russian Federation

te of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Громова Ольга Алексеевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>

SPIN-код: 6317-9833

д. м. н., профессор, в. н. с. ФИЦ ИУ РАН,

Москва, Российская Федерация

Olga A. Gromova

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>

SPIN code: 6317-9833

Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading researcher FRC

CSC RAS, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

- Филатов В.П. Тканевая терапия. *Клиническая медицина*. 1950; XXVIII(1);22–28.
- Filatov VP. Tkanevaya terapiya. *Klinicheskaya meditsina*. 1950; XXVIII(1); 22–28. (In Russ.).
- Максимов В.А., Громова О.А., Диброва Е.А. Сборник авторефератов докторских и кандидатских диссертаций по проблеме тканевой терапии плаценты человека. М.: Печатное бюро «Модуль», 2022.
- Maksimov VA, Gromova OA, Dibrova EA. Sbornik avtoreferatov doktorskikh i kandidatskikh dissertatsii po probleme tkanevoi terapii platsenty cheloveka. Moscow: Pechatnoye byuro "Modul", 2022 (In Russ.).
- Торшин И.Ю., Згода В.Г., Громова О.А., и др. Анализ лёгкой пептидной фракции Лаеннека методами современной протеомики. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2016;(4):31–42.
- Torshin IYu, Zgoda VG, Gromova OA, et al. Analysis of the light peptide fraction of Laennec by proteomic methods. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2016;(4):31–42. (In Russ.)
- Громова О.А., Торшин И.Ю., Волков А.Ю. и др. Препарат Лаеннек: элементный состав и фармакологическое действие. *Пластическая хирургия и косметология*. 2011;(2):327–333.
- Gromova OA, Torshin IYu, Volkov AYU, et al. Reparation Laennec: elemental composition and key role in the pharmacological action. *Plastic surgery and cosmetology*. 2011;(2):327–333. (In Russ.).
- Пилельс А.В., Громова О.А., Торшин И.Ю. и др. Экспериментальный анализ витаминного состава препарата «Лаеннек». *Вестник эстетической медицины*. 2013;12(3):80–87.
- Gilels AV, Gromova OA, Torshin IYu, et al. Experimental analysis of "Laennec" vitamin composition. *Vestnik ehsteticheskoy meditsiny*. 2013;12(3):80–87 (In Russ.).
- Торшин И.Ю., Громова О.А. Мировой опыт использования гидролизатов плаценты человека в терапии. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2019;170(10): 79–89. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-170-10-79-89.
- Torshin IYu, Gromova OA. Worldwide experience of the therapeutic use of the human placental hydrolytes. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;170(10): 79–89. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-170-10-79-89.
- Торшин И.Ю., Громова О.А., Стаховская Л.В., и др. Анализ 19,9 млн публикаций базы данных PubMed/MEDLINE методами искусственного интеллекта: подходы к обобщению накопленных данных и феномен "fake news". *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная Фармакоэкономика и Фармакоэпидемиология*. 2020;13(2):146–163. DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2020.021.
- Torshin IYu, Gromova OA, Stakhovskaya LV, et al. Analysis of 19.9 million publications of the PubMed/MEDLINE database using artificial intelligence methods: approaches to the generalizations of accumulated data and to the phenomenon of "fake news". *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2020;13(2):146–163 (In Russ.). DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2020.021.
- Мишушкин О.Н., Масловский Л.В., Елизаветина Г.А. и др. Применение препарата Лаеннек в гастроэнтерологической практике. *Эффективная фармакотерапия*. 2014;50:18–22.
- Minushkin ON, Maslovsky LV, Yelizavetina GA, et al. Administration of Laennec in Gastroenterology. *Effective pharmacotherapy*. 2014;50:18–22. (In Russ.).
- Пальцев А.И., Ерёмкина А.А., Торгашов М.Н. Гепатозащитная роль гидролизата плаценты — Лаеннека в лечении больных с вирусно-паразитарными заболеваниями печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016;(11):94–99.
- Paltsev AI, Yereimenko AA, Torgashov MN. Hepatoprotective role of placenta hydrolysat — Laennec in the treatment of patients with viral and parasitic liver diseases. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2016;(11):94–99. (In Russ.).
- Максимов В.А., Бунтин С.Е., Бунтина В.Г., и др. О влиянии плацентарного препарата Лаеннека на моторную функцию билиарного тракта у больных с жировой дистрофией печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016;(11):100–103.
- Maksimov VA, Buntin ES, Buntina VG, et al. The influence of placental drug Laennec on motor function of the biliary tract in patients with fatty degeneration of liver. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2016;(11):100–103. (In Russ.).
- Лазебник Л.Б., Радченко В.Г., Джадхав С.Н., и др. Системное воспаление и неалкогольная жировая болезнь печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2019;(5):29–41. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-165-5-29-41.
- Lazebnik LB, Radchenko VG, Dzhadhav SN, et al. Systemic inflammation and non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;(5):29–41. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-165-5-29-41.
- Лазебник Л.Б., Радченко В.Г., Селиверстов П.В., и др. Современное представление о фиброзе печени и подходах к его лечению у больных неалкогольным стеатогепатитом. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2017;148(12):98–109.
- Lazebnik LB, Radchenko VG, Seliverstov PV, et al. The contemporary understanding of liver fibrosis and approaches to treatment in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ekspierimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya*. 2017;148(12):98–100 (In Russ.).
- Громова О.А., Торшин И.Ю., Згода В.Г., Томилова И.К. Молекулярные механизмы действия препарата Лаеннек против формирования метаболического синдрома и ожирения. *Терапия*. 2017;(5):73–83.
- Gromova OA, Torshin IYu, Zgoda VG, Tomilova IK. Molecular mechanisms of action of Laennec against development of metabolic syndrome and obesity. *Therapy*. 2017;(5):73–83. (In Russ.).
- Thomsen KL, De Chiara F, Rombouts K, et al. Ammonia: A novel target for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Med Hypotheses*. 2018 Apr;113:91–97. DOI: 10.1016/j.mehy.2018.02.010.
- Пирогова И.Ю., Неуймина Т.В., Сучкова О.В., и др. Препарат Лаеннек (гидролизат плаценты человека) в монотерапии стеатогепатитов смешанной этиологии. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023;216(8):37-47. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-216-8-37-47.
- Pirogova IYu, Neuimina TV, Suchkova OV, et al. Laennec (Human placenta hydrolyzate) in monotherapy of mixed etiology of steatohepatitis. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2023;216(8):37–47. (In Russ.). DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-216-8-37-47.
- Тран В.Т., Торшин И.Ю., Громова О.А. Открытое контролируемое исследование эффективности и безопасности применения Лаеннека для улучшения функции печени у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023;216(8):48–56. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-216-8-48-56.
- Tran VT, Torshin IYu, Gromova OA. An open-label, controlled trial of the efficacy and safety of Laennec to improve liver function in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2023;216(8):48–56. (In Russ.). DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-216-8-48-56.
- Имавари М., Нагаса М., Торшин И.Ю., Громова О.А. Открытое контролируемое исследование клинических эффектов препарата ЭПР у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом и циррозом печени. *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2023. (в печати).
- Imavari M, Nagase M, Torshin IYu, Gromova OA. An open controlled study of the clinical effects of the EPC drug in patients with non-alcoholic steatohepatitis and cirrhosis of the liver. *Pharmacoeconomics. Modern pharmacoeconomics and pharmacoepidemiology*. 2023. (in press)/ (In Russ.).
- Shimokobe H, Sumida Y, Tanaka S, et al. Human placental extract treatment for non-alcoholic steatohepatitis non-responsive to lifestyle intervention: A pilot study. *Hepatol Res*. 2015 Sep;45(9):1034–1040. DOI: 10.1111/hepr.12432.
- Ghoneim M, El-Gerbed MSA. Human placental extract ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via regulating antioxidative and anti-inflammatory responses. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2021 Dec;88(6):961–971. DOI: 10.1007/s00280-021-04349-4.
- Bak DH, Na J, Choi MJ, et al. Anti apoptotic effects of human placental hydrolysate against hepatocyte toxicity *in vivo* and *in vitro*. *Int J Mol Med*. 2018 Nov;42(5):2569–2583. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3830.
- Yamauchi A, Tone T, Toledo A, et al. Placental extract ameliorates liver fibrosis in a methionine- and choline-deficient diet-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biomed Res*. 2020;41(1):1–12. DOI: 10.2220/biomedres.41.1.
- Yamauchi A, Kamiyoshi A, Koyama T, et al. Placental extract ameliorates non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by exerting protective effects on endothelial cells. *Heliyon*. 2017 Sep 27;3(9):e00416. DOI: 10.1016/j.heliyon.2017.e00416.
- Samiei F, Jamshidzadeh A, Noorafshan A, Ghaderi A. Human Placental Extract Ameliorates Structural Lung Changes Induced by Amiodarone in Rats. *Iran J Pharm Res*. 2016 Winter;15(Suppl):75–82.
- Жидоморов Н.Ю., Громова О.А., Торшин И.Ю. и др. Лаеннек как кардиопротектор. *Эстетическая медицина*. 2013;(4):531–538.
- Zhidomarov NYu, Gromova OA, Torshin IYu, et al. Laennec kak kardioprotektor. *Esteticheskaya medicina*. 2013;(4):531–538 (In Russ.).
- Yamauchi A, Kamiyoshi A, Sakurai T. Placental extract suppresses cardiac hypertrophy and fibrosis in an angiotensin II-induced cachexia model

- in mice. *Heliyon*. 2019 Oct 13;5(10):e02655. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02655.
26. Bak DH, Na J, Im SI, et al. Antioxidant effect of human placenta hydrolysate against oxidative stress on muscle atrophy. *J Cell Physiol*. 2019 Feb;234(2):1643–1658. DOI: 10.1002/jcp.27034
27. Jazayeri MH, Barzaman K, Nedaenia R, et al. Human placental extract attenuates neurological symptoms in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis—a putative approach in MS disease? *Auto Immun Highlights*. 2020 Oct 4;11(1):14. DOI: 10.1186/s13317-020-00137-x. Erratum in: *Immunol Res*. 2022 Dec;70(6):860.
28. Назаренко О.А., Громова О.А., Гришина Т.Р., и др. Коррекция Лаеннеком хронической перегрузки железом печени, почек и головного мозга. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2017;(2):39–44.
- Nazarenko OA, Gromova OA, Grishina TR, et al. Correction by Laennec of chronic iron overload liver, kidneys and brain. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017;(2):39–44. (In Russ.).
29. Громова О.А., Торшин И.Ю., Максимов В.А., и др. Пептиды в составе препарата Лаеннек, способствующие устранению гиперферритинемии и перегрузки железом. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2020;13(4):413–425. DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2020.070.
- Gromova OA, Torshin IYu, Maksimov VA, et al. Peptides contained in the composition of Laennec that contribute to the treatment of hyperferritinemia and iron overload disorders. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2020;13(4):413–425. (In Russ.). DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2020.070.
30. Yamauchi A, Kamiyoshi A, Sakurai T, et al. Development of a mouse iron overload-induced liver injury model and evaluation of the beneficial effects of placenta extract on iron metabolism. *Heliyon*. 2019 May 10;5(5):e01637. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01637. PMID: 31193082; PMCID: PMC6515419.
31. Nensat C, Songjang W, Tohtong R, et al. Porcine placenta extract improves high-glucose-induced angiogenesis impairment. *BMC Complement Med Ther*. 2021 Feb 18;21(1):66. DOI: 10.1186/s12906-021-03243-z.
32. de Toledo A, Nomoto K, Hirano E, Tohda C. Horse Placental Extract Enhances Neurogenesis in the Presence of Amyloid β . *Nutrients*. 2021 May 14;13(5):1672. DOI: 10.3390/nu13051672.
33. Ito K, Yamada R, Matsumoto N, Imamura T. Evaluation of fibroblast growth factor activity exerted by placental extract used as a cosmetic ingredient. *J Cosmet Dermatol*. 2018 Oct;17(5):821–829. DOI: 10.1111/jocd.12434.
34. Kwon JW, Hong SE, Kang SR, Park BY. Effect of Human Placental Extract Treatment on Random-Pattern Skin Flap Survival in Rats. *J Invest Surg*. 2019 Jun;32(4):304–313. DOI: 10.1080/08941939.2017.1417518.
35. Nagata M, Nakamura T, Hata Y, et al. JBP485 promotes corneal epithelial wound healing. *Sci Rep*. 2015 Oct 1;5:14776. DOI: 10.1038/srep14776.
36. Yamasaki M, Hasegawa S, Takahashi H, et al. Placental extracts induce the expression of antioxidant enzyme genes and suppress melanogenesis in B16 melanoma cells. *Nat Prod Res*. 2015;29(22):2103–2106. DOI: 10.1080/14786419.2014.988660.
37. Громова О.А., Торшин И.Ю., Диброва Е.А., и др. Молекулярные механизмы воздействия экстрактов плаценты человека на пигментообразование кожи. *Вестник эстетической медицины*. 2012;11(3):70–77
- Gromova OA, Torshin IYu, Dibrova EA, et al. Human's placenta extracts influence on skin chromogenesis molecular mechanisms. *Vestnik estheticoskoj mediciny*. 2012;11(3):70–77 (in Russ.).
38. Kwon TR, Oh CT, Choi EJ, et al. Human placental extract exerts hair growth-promoting effects through the GSK-3 β signaling pathway in human dermal papilla cells. *Int J Mol Med*. 2015 Oct;36(4):1088–1096. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2316.
39. Лучина Е.Н. Возможности применения препарата Лаеннек в лечении рубцовых изменений кожи. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология*. 2012;(4):36–40.
- Luchina EN. Possibilities of using Laennec to treat skin scarring changes. *Experimental and Clinical Dermatocosmetology*. 2012;(4):36–40. (In Russ.).
40. Awan KH, Patil S, Habib SR, et al. Evaluation of medicinal interventions for the management of oral submucous fibrosis: a systematic review of the literature. *J Contemp Dent Pract*. 2014 Nov 1;15(6):812–817. DOI: 10.5005/jp-journals-10024-1623.
41. Патент РФ 2606040 от 01.04.2015. Усманова И.Н., Герасимова Л.П., Кабинова М.Ф. Способ лечения хронического воспаления тканей пародонта и слизистой оболочки с элементами гиперкератоза у лиц молодого возраста. Доступно по: <https://patent.ru/patent/RU2606040C2.pdf>. Ссылка активна на 03.02.2022.
- Patent RU 2606040/ 01.04.2015. Usmanova IN, Gerasimova LP, Kabirova MF. Method of treatment of chronic inflammation of periodontal tissues and mucous membrane with elements of hyperkeratosis in young people. Available at: <https://patent.ru/patent/RU2606040C2.pdf>. Accessed: 03.02.2022 (In Russ.).
42. Громова О.А., Торшин И.Ю., Згода В.Г., Диброва Е.А. Регуляторное действие пептидов Лаеннека на митохондриальные процессы. *Терапия*. 2017;(7):71–84.
- Gromova OA, Torshin IYu, Zgoda VG, Dibrova EA. Regulatory action of Laennec' peptides at mitochondrial processes. *Therapy*. 2017;(7):71–84 (In Russ.).
43. Gromova O.A. Prospective of gerontological applications of Laennec: fundamental studies & molecular mechanisms. Congress of anti-age medicine, plenary session. Tokyo, 2017. Available at: http://www.jpplaa.jp/images/pdf/E7A094E7A9B6E8A681E8A6A7_E7ACAC2021E59088E4BDB5E58FB7_E8A1A81.pdf. Accessed 03.02.2022.
44. Леонов С.В., Марусич Е.И., Громова О.А., и др. Антивозрастной эффект гидролизата плаценты человека. Доказательный стандарт. *Терапия*. 2017;(4):75–83.
- Leonov SV, Marusich EI, Gromova OA, et al. Anti-aging effect of human placenta hydrolysate. Evidence-based standard. *Therapy*. 2017;(4):75–83. (In Russ.).
45. Торшин И., Громова О., Диброва Е. Влияние препарата Лаеннек на маркеры старения. *Эстетическая медицина*. 2017;XVI(2):157–167.
- Torshin I, Gromova O, Dibrova E. Vliyaniye preparata Laennec na markery stareniya. *Esteticheskaya medicina*. 2017;XVI(2):157–167. (In Russ.).
46. Shin EH, Kim M, Hada B, et al. Effects of Human Placenta Extract (Laennec) on Ligament Healing in a Rodent Model. *Biol Pharm Bull*. 2019;42(12):1988–1995. DOI: 10.1248/bpb.b19-00349.
47. Chang SW, Kim JY, Kim MJ, et al. Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells. *Acta Odontol Scand*. 2016;74(4):298–306. DOI: 10.3109/00016357.2015.1120882.
48. Громова О.А., Торшин И.Ю., Диброва Е.А., и др. Гидролизаты плаценты человека в реконструктивной терапии соединительной ткани хряща и суставов. *Терапия*. 2016;(6):43–53.
- Gromova OA, Torshin IYu, Dibrova EA, et al. Human placenta hydrolyzates in reconstructive therapy of connective tissue of cartilage and joints. *Therapy*. 2016;(6):43–53. (In Russ.).
49. Park KM, Cho TH. Therapeutic effect of acupuncture point injection with placental extract in knee osteoarthritis. *J Integr Med*. 2017 Mar;15(2):135–141. DOI: 10.1016/s2095-4964(17)60316-9.
50. Елисютина О.Г., Феденко Е.С., Шабанова И.Ф., и др. Первый опыт применения препарата лаеннек («Japan bioproducts industry Co., LTD», Япония) при atopическом дерматите России. *Российский Аллергологический Журнал*. 2010;7(1):97–104. DOI: 10.36691/RJA924
- Eliisyutina OG, Fedenko ES, Shabanova IF, et al. The experience of atopic dermatitis treatment with «Laennec» («Japan bioproducts industry Co., LTD», JAPAN) in Russia. *Russian Journal of Allergy*. 2010;7(1):97–104. DOI: 10.36691/RJA924.
51. Торшин И.Ю., Громова О.А., Диброва Е.А., и др. Пептиды в составе препарата Лаеннек, потенцирующие его противовирусные эффекты в лечении atopического дерматита герпетической инфекции. *Российский Аллергологический Журнал*. 2018;15(1):82–90. DOI: 10.36691/RJA191.
- Torshin IYu, Gromova OA, Dibrova EA, et al. Peptides in the composition of Laennec that show antiviral effects in the therapy of atopic dermatitis and herpes infection. *Russian Journal of Allergy*. 2018;15(1):82–90. (In Russ.).
52. Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е., Щубелко Р.В., и др. Рецидивирующий генитальный герпес: стандартные подходы и новые перспективы терапии. *Российский Аллергологический Журнал*. 2014;11(6):47–57. DOI: 10.36691/RJA521.
- Zuikova IN, Shulzhenko AE, Shchubelko RV, et al. Treatment of recurrent herpes virus infection: standard approaches and new perspectives. *Russian Journal of Allergy*. 2014;11(6):47–57. DOI: 10.36691/RJA521.
53. Kim EH, Kim YI, Jang SG, et al. Antiviral effects of human placenta hydrolysate (Laennec®) against SARS-CoV-2 in vitro and in the ferret model. *J Microbiol*. 2021 Nov;59(11):1056–1062. DOI: 10.1007/s12275-021-1367-2.
54. Максимов В.А., Торшин И.Ю., Чучалин А.Г., и др. Эффективность и безопасность полипептидного препарата (Лаеннек) в терапии COVID-19. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2020;178(6):55–63. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-178-6-55-63.
- Maksimov VA, Torshin IYu, Chuchalin AG, et al. The effectiveness and safety of a polypeptide drug (Laennec) for the treatment of COVID-19.

Experimental and Clinical Gastroenterology. 2020;178(6):55–63. (In Russ.). DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-178-6-55-63.

55. Goswami S, Sarkar R, Saha P, et al. Effect of human placental extract in the management of biofilm mediated drug resistance - A focus on wound management. *Microb Pathog*. 2017 Oct;111:307–315. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.08.041.

56. AbdRabou MA, Mehany ABM, Farrag IM, et al. Therapeutic Effect of Murine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells and Human Placental Extract on Testicular Toxicity Resulting from Doxorubicin in Rats. *Biomed Res Int*. 2021 Aug 6;2021:9979670. DOI: 10.1155/2021/9979670.

57. Choi JH, Jung J, Na KH, et al. Effect of mesenchymal stem cells and extracts derived from the placenta on trophoblast invasion and immune responses. *Stem Cells Dev*. 2014 Jan 15;23(2):132–145. DOI: 10.1089/scd.2012.0674.

58. Кузнецова И.В., Успенская Ю.Б., Коваленко М.А. Опыт применения экстракта плаценты человека при лечении эндометриальной дисфункции. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева*. 2014;1(1):22–24.

Kuznetsova IV, Uspenskaya YuB, Kovalenko MA. Use of human placenta hydrolysate in therapy for endometrial dysfunction. *Archive of Obstetrics and Gynecology named after V.F. Snegireva*. 2014;1(1):22–24. (In Russ.).

59. Каткова Н.Ю., Гречканев Г.О., Качалина Т.С., и др. Лечение гипопластического варианта хронического эндометрита: аргументация отказа от антибактериальной терапии. *Современные технологии в медицине*. 2016;8(4):99–103. DOI: 10.17691/stm2016.8.4.13.

Katkova NYu, Grechkanyov GO, Kachalina TS, et al. Treatment of the hypoplastic variant of chronic endometritis: arguments against antibacterial therapy. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2016;8(4):99–103. DOI: 10.17691/stm2016.8.4.13.

Пептиды плаценты: антибактериальные эффекты

© Торшин И. Ю.¹, Богачева Т. Е.², Громова О. А.¹

¹ — ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН» (ФИЦ ИУ РАН), Москва, Российская Федерация

² — ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

Аннотация. Масс-спектрометрическое секвенирование пептидов в составе Лаеннека указало на наличие в составе препарата 5 пептидов, биологическая активность которых может обуславливать антибактериальные свойства препарата. Наиболее значимым результатом настоящего исследования является нахождение в составе Лаеннека фрагмента антибактериального пептида кателицидина (LL-37), важного витамин-D-зависимого фактора врождённого иммунитета. Другие пептиды Лаеннека способствуют снижению избыточного воспаления посредством ингибирования активности белка NF-κB, опосредующего эффекты ФНО-α.

Ключевые слова: гидролизаты плаценты; антибактериальный эффект

Для цитирования:

Торшин И. Ю., Богачева Т. Е., Громова О. А. Пептиды плаценты: антибактериальные эффекты. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):15–22. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-15-22>

Поступила: 06.10.2023. **В доработанном виде:** 07.11.2023. **Принята к печати:** 09.12.2023. **Опубликована:** 30.12.2023.

Placenta peptides: antibacterial effects

© Ivan Yu. Torshin¹, Tatiana E. Bogacheva², Olga A. Gromova¹

¹ — FRC "Computer Science and Control" RAS, Moscow, Russian Federation

² — FSBEI HE "Ivanovo State Medical Academy" MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

Abstract. Mass spectrometric sequencing of peptides in Laennec indicated the presence of 5 peptides in the drug, the biological activity of which may determine the antibacterial properties of the drug. The most significant result of this study is the presence in Laennec of a fragment of the antibacterial peptide cathelicidin (LL-37), an important vitamin D-dependent factor of innate immunity. Other Laennec peptides help reduce excess inflammation by inhibiting the activity of the NF-κB protein, which mediates the effects of TNF-α.

Keywords: placenta hydrolysates; antibacterial effect

For citations:

Torshin IYu, Bogacheva TE, Gromova OA. Placenta peptides: antibacterial effects. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):15–22. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-15-22>

Received: 06.10.2023. **Revision received:** 07.11.2023. **Accepted:** 09.12.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

Гидролизаты плаценты человека (ГПЧ) успешно используются для ускорения заживления ран, поддержания состояния кожи и её придатков, терапии синдрома хронической усталости, лечения заболеваний печени, аллергии и атопического дерматита, а также при лечении заболеваний женской репродуктивной сферы [1–3]. Описаны эффекты ГПЧ для повышения иммунитета [4], терапии псориаза [5, 6], рассеянного склероза [7, 8], ревматоидного артрита и других заболеваний, ассоциированных с повышенным уровнем хронического воспаления.

Важными аспектами действия препаратов на основе ГПЧ являются их *антибактериальные* и *антивирусные свойства*. В частности, анализ пептидного состава препарата Лаеннек позволил выделить 14 пептидов, характеризующихся потенциальным противовирусным действием на всех стадиях жизненного цикла вирусов: торможение активации вирусов (ингибирование белка

NSFC1), ингибирование слияния вирусной оболочки с плазматической мембраной на стадии инфицирования вирусом клетки-хозяина (ингибирование белка CD4), репликацию вируса (ингибирование белка STBP1) и др. [9].

Имеющийся клинический опыт показывает, что ГПЧ, входящий в состав препарата Лаеннек, также может проявлять антибактериальные свойства. Препарат Лаеннек (уникальная технология получения соответствующего ГПЧ разработана компанией Japan Bioproducts Ltd) разрешён к применению с 2003 года в качестве гепатопротекторного и иммуномодулирующего средства. Антибактериальное действие Лаеннека может существенно дополнять другие аспекты фармакологии препарата и являться одним из факторов, способствующих ускоренному заживлению повреждений кожи. В настоящей работе выделены пептиды в составе Лаеннека, которые обуславливают антибактериальное действие препарата.

Анализ пептидного состава Лаеннека посредством *de novo* масс-спектрометрического секвенирования / Analysis of Laennec peptide composition by *de novo* mass spectrometric sequencing

Настоящее исследование проводилось в три этапа: (I) *de novo* секвенирование пептидов Лаеннека; (II) анализ функциональных взаимосвязей для установления пептидов, которые могут потенциально влиять на антибактериальный иммунитет; (III) экспертный анализ пептидов, которые имеют обоснованные молекулярные механизмы антибактериального действия. В результате проведения *de novo* секвенирования с использованием разработанного нами комплекса программ DNVSEQP стало возможным определение аминокислотных последовательностей около 5200 пептидных фрагментов в составе Лаеннека (т. е. более 50 % всех пептидов Лаеннека) и их идентификация с использованием базы данных UNIPROT [10]. Проведение *экспертного анализа* позволило выделить 5 пептидов (табл. 1), для которых могут быть обоснованы молекулярные механизмы их антибактериального действия.

Пептиды AYLSSPL, SNPLAL, GLATLVE в составе Лаеннека, содержащие сайты связывания с киназой IKKB и с белком NF-κB, будут *ингибировать активность провоспалительного транскрипционного фактора NF-κB*. Механизм собственно антибактериального действия Лаеннека связан, по всей видимости, с наличием в составе препарата пептида FALPLGDF, который представляет собой пептид-миметик антибактериального пептида FALL-39 [11], в состав которого входит более известный антибактериальный пептид LL-37 (кателицидин, остатки 134-170) [12].

Ингибирование фактора воспаления NF-κB / Inhibition of the inflammatory factor NF-κB

Молекулярные механизмы осуществления *противовоспалительных эффектов пептидных препаратов* (Серк-08) обусловлены особенностями их пептидного состава. Уникальной особенностью Лаеннека является включение в его состав пептидов AYLSSPL, SNPLAL и др., способных ингибировать активность NF-κB — основного медиатора провоспалительного действия ФНО-α. Пептиды Лаеннека — AYLSSPL (соответствует остаткам AYLSSPL 373-379 белка IKKBG), SNPLAL (SSPLAL 376-381 белка IKKBG) и найденный нами ранее пептид LFSPLAL (LSSPLAL 375-381 белка IKKBG) [5] — являются таргетными пептидами фермента IKK-β (киназа ингибитора фактора NF-κB). IKK-β активирует провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Нарушение регуляции NF-κB вызывает воспаление, аутоиммунные заболевания, а также развитие опухолевых заболеваний. NF-κB активируется целым рядом стимулов, включая цитокины (такие как ФНО-α и интерлейкин 1) и факторы стресса (такие как реактивные формы кислорода или ультрафиолет).

В цитоплазме клетки NF-κB находится в неактивном состоянии в комплексе с ингибиторным белком IκB. Стимулирующий агент активизирует IKK-β, которая фосфорилирует IκB, что приводит к деградации IκB на протеасоме. В результате, провоспалительный фактор NF-κB высвобождается, транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию контролируемых им провоспалительных генов [13, 14]. Ингибиторы

Таблица 1

Пептиды для которых существуют обоснованные молекулярные механизмы их антибактериального действия

Table 1

Peptides for which there are substantiated molecular mechanisms of their antibacterial action

ММ	Пептид Лаеннека	Фрагмент белка	Ген	Белок	Аннотация пептида, таргетный белок пептида
417.2	FVGTLEY	FVGTLYQ 182-188	IKKB	Ингибитор NF-κB-киназы	Остаток серин-181 фосфорилируется TBK1
598.3	AYLSSPL	AYLSSPL 373-379	IKKBG	Основной модулятор NF-κB	Остаток серин-376 фосфорилируется IKKB
577.8	SNPLAL	SSPLAL 376-381	IKKBG	Основной модулятор NF-κB	Остаток серин-376 фосфорилируется IKKB
478.2	GLATLVE	GLDTLVE 78-84	BCL10	Клеточный белок лейкемии-10	Модификация остатка 78G->R приводит к устранению активации NF-κB
763.4	FALPLGDF	FALLGDF 132-138	CAMP	Антимикробный пептид кателицидин	Антибактериальный пептид FALL-39, фрагмент кателицидина

Примечание: ММ — молекулярная масса пептида (г/моль).

Note: MW — peptide molecular weight (g/mol).

киназы IKK- β изучаются как потенциальные средства для лечения воспалительных заболеваний (например, остеоартрит) и опухолевых заболеваний [15].

Пептид LFSPLAL, найденный в составе препарата Лаеннек, соответствует аминокислотной последовательности LSSPLAL 375-381 белка IKK β , в которой киназа IKK- β фосфорилирует остаток ser-376 (LSSPLAL) [16]. Однако в последовательности пептида Лаеннека в соответствующей позиции серин заменён на фенилаланин (LFSPLAL), поэтому данный пептид с высокой вероятностью является специфическим ингибитором киназы IKK- β (рис. 1). Ингибирование

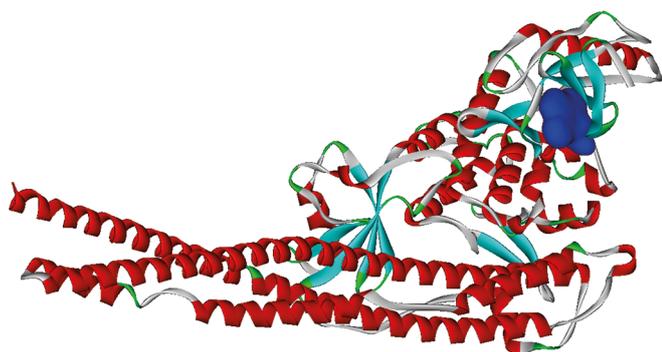


Рис. 1. Пространственная структура киназы IKK- β (PDB 4KIK)

Fig. 1. Spatial structure of IKK- β kinase (PDB 4KIK)

Примечания: Показана поверхность активного сайта (выделена синим), участвующая в связывании пептида Лаеннека «LFSPLAL», ингибирующего IKK- β .

Notes: Shown is the active site surface (in blue) involved in the binding of Laennec's peptide "LFSPLAL", which inhibits IKK- β .

активности IKK- β пептидом LFSPLAL будет приводить к инактивации провоспалительного фактора NF- κ B и, следовательно, к снижению уровня хронического воспаления и повышению сохранности клеток различных тканей.

Антимикробный пептид кателецидин (LL-37) / Antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37)

Пептиды Лаеннека, ингибируя провоспалительный фактор NF- κ B, способствуют усилению антибактериальных эффектов пептида FALPLGDF, который соответствует фрагменту *антимикробного пептида LL-37 (кателецидин)*, рис. 2). Антимикробные пептиды (АМП) встраиваются в цитоплазматическую мембрану бактерий и, приводя к образованию пор, нарушают целостность бактериальных клеток. Кроме того, АМП являются эффекторными молекулами врожденной иммунной системы кожи. Раны и сукровица содержат значительное количество антимикробных дефензиновых пептидов HNP-1, HNP-2 и HNP-3, лизоцима и пептидных антибиотиков LL-37/FALL-39, обеспечивающих антибактериальную защиту, важную для заживления ран [17].



Рис. 2. Структура пептида Лаеннека FALPLGDF (сферическая модель), входящего в состав антимикробного пептида кателецидина (LL-37)

Fig. 2. Structure of the Laennec peptide FALPLGDF (spherical model), which is part of the antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37)

Примечание: Модель на основе PDB файла 2FBU.

Note: Model based on PDB file 2FBU.

АМП представляют собой активность против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также некоторых грибов, паразитов и заражённых вирусов. Несколько воспалительных кожных заболеваний, включая псориаз, атопический дерматит, вульгарные угри и розацеа, характеризуются нарушенной экспрессией АМП (повышена при псориазе или розацеа и понижена при атопическом дерматите) [18].

Биологические эффекты АМП кателецидина достаточно сложны. При запросе «cathelicidin OR LL-37» в базе данных биомедицинских публикаций PUBMED было найдено 2711 ссылок. Поэтому, в рамках проведения настоящего исследования мы осуществили компьютеризованный анализ данного массива публикаций с использованием современных методов компьютерного обучения, развиваемых в рамках алгебраического подхода к распознаванию [19–22]. В качестве контрольной выборки публикаций использовались 2700 случайно выбранных публикаций из найденных по запросу «antibacterial NOT cathelicidin NOT LL-37» в базе данных PUBMED. В результате проведённого анализа текстов 2711 публикаций была получена карта терминов и отобраны наиболее информативные термины, описывающие фармакологические эффекты кателецидина (табл. 2).

Интересной особенностью полученного списка наиболее информативных ключевых слов (табл. 2) является преобладание ключевых слов, описывающих фармакологические эффекты кателецидина (1) относящиеся, прежде всего, к *дерматологии* («DERMATOLOGY», «DERMATITIS», «SKIN», «KERATINOCYTES»), (2) как модуляцию *процессов воспаления при участии цитокинов* («INFLAMMATION», «MACROPHAGES», «TOLL-LIKE», «IL-8», «IL-1BETA», «TUMOR NECROSIS FACTOR», «IL-10», «NF-KAPPA»)). Дальнейший анализ ключевых слов с последующим анализом рубрикации исследований по диагнозам МКБ-10 позволил выделить особенности структуры коморбидных патологий, рассматриваемых в публикациях по кателецидину (табл. 3).

Таблица 2

Ключевые слова, достоверно ассоциированные с фармакологическими эффектами кателецидина

Table 2

Keywords significantly associated with the pharmacological effects of catelecicidin

Ключевое слово (англ.)	ν_1	ν_2	$D_{инф}$	α
ANTIMICROBIAL PEPTIDES	0,582	0,003	1574,5	3
CATHELICIDIN	0,543	0,000	1471	6
LL-37	0,492	0,000	1335	9
PHARMACOLOGY	0,402	0,160	591,39	30
INNATE IMMUNE	0,176	0,011	459,76	43
GENE EXPRESSION	0,158	0,011	411,51	49
INFLAMMATION	0,142	0,028	327,98	77
VITAMIN D	0,110	0,002	294,94	94
DERMATOLOGY	0,108	0,008	281,17	102
EPITHELIAL CELLS	0,102	0,006	266,99	107
NEUTROPHILS	0,098	0,008	252,32	118
BETA-DEFENSINS	0,089	0,000	241	127
CYTOKINES	0,094	0,014	230,05	137
ANTI-INFECTIVE AGENTS	0,088	0,015	209,92	153
LPS	0,076	0,009	192,24	176
MACROPHAGES	0,069	0,002	184,87	185
INFLAMMATION	0,064	0,004	167,52	203
IMMUNOMODULATORY	0,063	0,007	159,43	218
KERATINOCYTES	0,060	0,003	159,09	219
TOLL-LIKE	0,056	0,000	152,5	229
IL-8	0,053	0,005	135,39	267
THE SKIN	0,052	0,011	117,53	318
PEPTIDES BIOSYNTHESIS	0,041	0,000	111,5	340
IL-1BETA	0,038	0,006	92,51	415
AIRWAY	0,036	0,004	91,01	423
PSEUDOMONAS AERUGINOSA	0,035	0,011	67,27	642
DERMATITIS	0,024	0,000	66	656
TUMOR NECROSIS FACTOR	0,029	0,006	65,18	664
IL-10	0,025	0,003	63,8	682
NF-KAPPAB	0,025	0,006	54,31	838

Примечания: ν_1, ν_2 — частоты встречаемости ключевого слова в выборке абстрактов K_1 (абстракты по исследуемой теме, т. е. кателецидин) и в выборке абстрактов K_2 (контрольная выборка абстрактов); $D_{инф}$ — оценка значения информативности ключевого слова для различения выборок K_1 и K_2 ; α — ранг информативности (порядковый номер ключевого слова при упорядочении всех ключевых слов по значениям $D_{инф}$). Порядок ключевых слов — по убыванию значений оценки информативности $D_{инф}$.

Notes: ν_1, ν_2 — frequency of occurrence of the keyword in the sample of abstracts K_1 (abstracts on the topic under study, i. e. catelecicidin) and in the sample of abstracts K_2 (control sample of abstracts), D_{inf} — assessment of the information content of the keyword for distinguishing samples K_1 and K_2 ; α — rank of information content (ordinal number of the keyword when ordering all keywords by D_{inf} values). The order of the keywords is in descending order of the information content assessment values D_{inf} .

Таблица 3

Коморбидные патологии, достоверно ассоциированные с публикациями по кателецидину (по результатам анализа выборки 2711 публикаций)

Table 3

Comorbid pathologies significantly associated with publications on catelecicidin (based on the results of analysis of a sample of 2711 publications)

N1	N2	Код	МКБ-10	О.Ш.
73	0	L71	Розацеа	1217,02
133	0	E55	Недостаточность витамина D	893,72
110	1	L40	Псориаз	283,89
204	8	L20	Атопический дерматит	30,36
107	5	L21	Себорейный дерматит	25,43
37	5	J45	Астма	24,67
366	23	D71	Функциональные нарушения полиморфно-ядерных нейтрофилов	18,40
139	15	L23	Аллергический контактный дерматит	13,54
48	12	J30	Вазомоторный и аллергический ринит	6,20
481	88	N73	Другие воспалительные болезни женских тазовых органов	5,76
467	138	L90	Атрофические поражения кожи	5,23
482	145	R21	Сыпь и другие неспецифические кожные высыпания	5,15
483	150	L98	Другие болезни кожи и подкожной клетчатки, не классифицированные в других рубриках	5,02
483	150	L99	Другие поражения кожи и подкожной клетчатки при болезнях, классифицированных в других рубриках	5,02
511	110	N61	Воспалительные болезни молочной железы	5,00
490	99	N41	Воспалительные болезни предстательной железы	4,90
484	153	L76	Послеоперационные осложнения со стороны кожи и дермы	4,88
115	40	B18	Хронический вирусный гепатит	4,13
115	40	B19	Вирусный гепатит неуточнённый	4,13
106	31	B07	Вирусные бородавки	4,06
121	47	J10	Грипп, вызванный идентифицированным вирусом гриппа	3,80
125	53	J11	Грипп, вирус не идентифицирован	3,61
533	147	K75	Другие воспалительные болезни печени	3,25
2389	858	Z16	Резистентность к антибиотикам	3,24
125	46	A40	Стрептококковая септицемия	2,75
1360	688	B09	Вирусная инфекция, характеризующаяся поражением кожи и слизистых оболочек, неуточнённая	2,15
1288	605	R65	Синдром системного воспалительного ответа	1,84
1202	771	L08	Другие местные инфекции кожи и подкожной клетчатки	1,80

Примечания: N1, число исследований по кателецидину; N2, число исследований в контроле; О.Ш., отношение шансов (кателецидин по сравнению с контролем). Диагнозы упорядочены по убыванию О.Ш., т. е. от диагнозов, более типичных для нарушений регуляции кателецидина к менее типичным диагнозам. Все описанные отличия были статистически достоверными ($p < 10^{-15}$ по критерию χ^2).

Notes: N1, number of studies on catelecicidin; N2, number of studies in control; OR, odds ratio (catelecicidin compared with control). Diagnoses are ordered in descending order of O.Sh., i. e. from diagnoses more typical of catelecicidin dysregulation to less typical diagnoses. All described differences were statistically significant ($p < 10^{-15}$ by χ^2 criterion).

Заболевания, ассоциированные с нарушениями обмена кателецидина, включают различные патологии кожи (L08 Другие местные инфекции кожи и подкожной клетчатки, L76 Послеоперационные осложнения со стороны кожи и дермы, L98 Другие болезни кожи и подкожной клетчатки, не классифицированные в других рубриках и др., рис. 3А), а также внекожные патологии, ассоциированные с воспалением (Z16 Резистентность к антибиотикам, R65 Синдром системного воспалительного ответа, K75 Другие воспалительные болезни печени и др., рис. 3Б).

В целом, АМП кателецидин является неотъемлемым компонентом витамин-D-зависимого врождённого антимикробного иммунитета. Кателецидины продуцируются многими различными клетками, включая макрофаги, нейтрофилы, моноциты, и эпителиальные клетки. Обработка моноцитов в культуре посредством биологически активной формы витамина D

(1,25-дигидроксивитамин-D₃) дозозависимо повышает экспрессию мРНК и белка кателецидина в 48...140 раз [23]. В клиническом исследовании пациентов в отделениях интенсивной терапии была установлена корреляция между концентрацией 25-гидроксивитамина D в плазме крови с уровнями кателецидина [24]. Принимая высокую распространённость дефицита витамина D у россиян [25, 26], *витамин D может являться весьма эффективным синергистом, усиливающим антибактериальное действие Лаеннека.*

Важно подчеркнуть, что антибактериальные эффекты кателецидина отнюдь не ограничены только разрушением бактериальных стенок. Кателецидин проявляет сложные иммуномодулирующие функции, важные для заживления ран: собственно антибактериальный эффект, модуляция экспрессии различных цитокинов и др. Пептид LL-37 усиливает пролиферацию неспецифически активированных CD4+

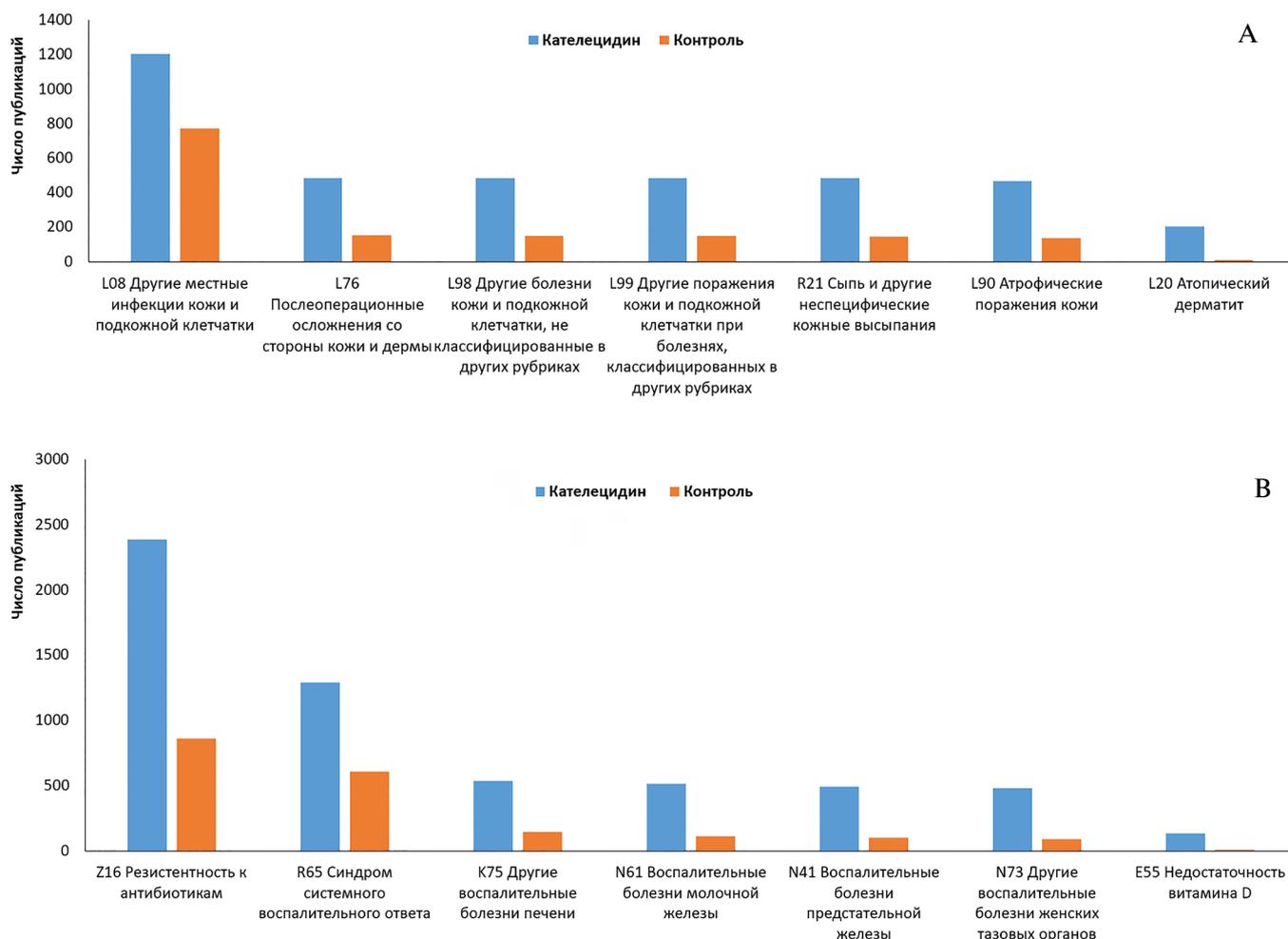


Рис. 3. Патологии, достоверно ассоциированные с эффектами кателецидина. А) Патологии кожных покровов. Б) Патологии других систем органов

Fig. 3. Pathologies significantly associated with the effects of catelecidin. А) Pathologies of the skin. В) Pathologies of other organ systems

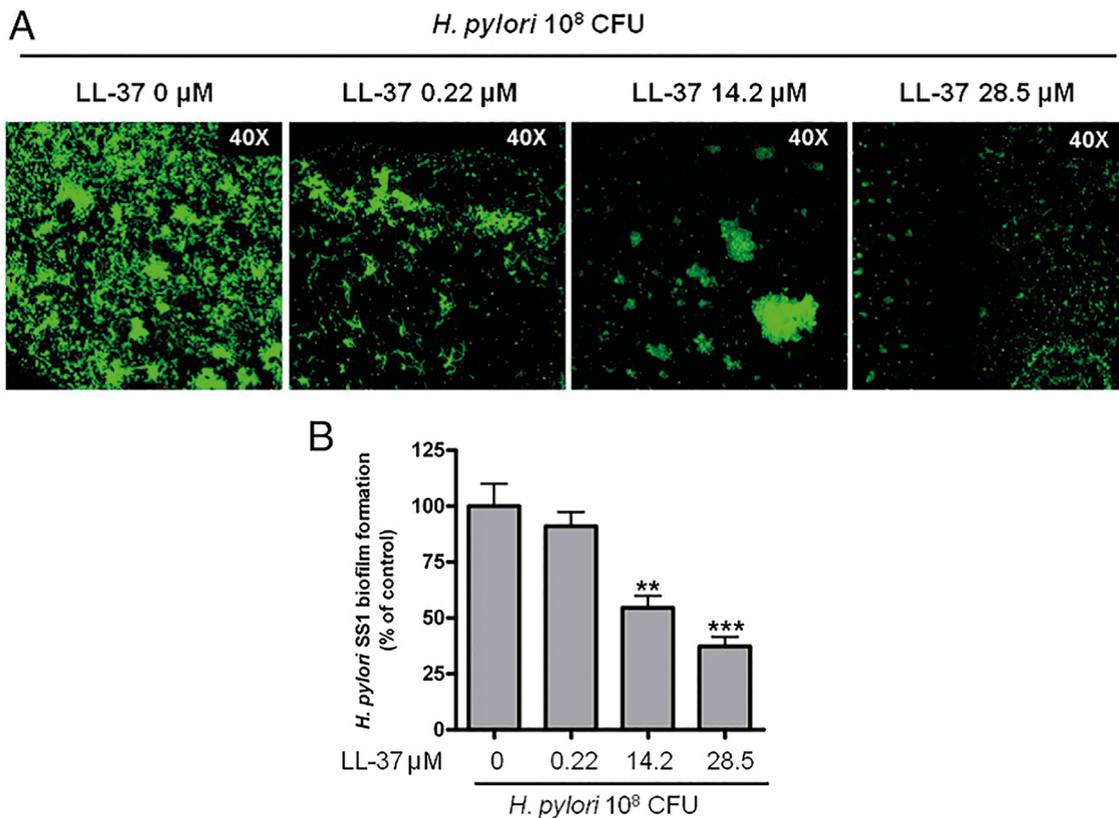


Рис. 4. Влияние LL-37 на биоплёнку *H. pylori* SS1 в культуре

Fig. 4. Effect of LL-37 on *H. pylori* SS1 biofilm in culture

Примечания: (4А) Репрезентативные изображения демонстрируют образование биоплёнки, прокрашенной посредством зелёного флуоресцентного красителя. *H. pylori* (10⁸ КОЕ) инкубировали в течение 72 ч, затем биоплёнки подвергались различным дозам LL-37 в течение 48 часов. Увеличение \times 340; (4В) Количественная оценка размера колоний. Количество биоплёнок оценивалось по светопоглощению (OD590). Добавление LL-37 дозозависимо уменьшало образование биоплёнки *H. pylori*. ** $P = 0,01$; *** $P = 0,001$ по сравнению с контролем.

Notes: (4A) Representative images show biofilm formation stained with green fluorescent dye. *H. pylori* (10⁸ CFU) was incubated for 72 hours, then the biofilms were exposed to various doses of LL-37 for 48 hours. Magnification \times 340. (4B) Quantification of colony size. The amount of biofilms was assessed by light absorption (OD590). The addition of LL-37 dose-dependently reduced *H. pylori* biofilm formation. ** $P = 0.01$; *** $P = 0.001$ compared to control.

T-лимфоцитов [27], резко снижает уровни мРНК и провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1 α , фактор некроза опухолей- α (ФНО- α) [28], увеличивает экспрессию β -интерферона в кератиноцитах [29]. Пептид LL-37 распознаётся несколькими рецепторами и может стабилизировать или модулировать сигнальную сигнализацию толл-подобных рецепторов, защищать от стрептококковой инфекции, возбудителей пневмонии и менингита [30]. Кателицидин также участвует в усилении VDR-зависимого иммунного ответа против лейшманиального паразита посредством толл-подобных рецепторов TLR2 [31].

Уровни кателицидина в виде пептида LL37 значительно повышены при псориазе, розацеи и локализуется в кератиноцитах, дендритных клетках и других лейкоцитах [32]. Повышенная экспрессия кателицидинов в очагах воспаления может быть результатом активации врождённой антибактериальной системы

защиты, т. к. бактериальный компонент играет важную роль в патогенезе и прогрессии этих заболеваний.

Розацеа — хроническое воспалительное состояние кожи, чаще всего поражающее кожу лица, и часто принимающееся за акне, экзему или аллергию. Патопатология розацеи не вполне ясна; возможными факторами являются аномалии в лицевых кровеносных сосудах, светлый цвет кожи, действие микроскопических клещей и обсеменение кожи бактериями (прежде всего, *Helicobacter pylori*) [33]. Повышение уровней кателицидина будет способствовать элиминации бактериальной инфекции.

Псориаз — хроническое воспалительное заболевание кожи, которое может провоцируется и усугубляется специфическими патогенами, включая бактерии (*Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*), вирусы (человеческий папилломавирус и эндогенные ретровирусы)

и грибковые инфекции (*Malassezia* and *Candida albicans*) [34]. Очевидно, что антибактериальная активность кателецидина будет важна и для терапии псориаза.

Кателецидин имеет решающее значение для защиты от различных видов микробной инфекции и, в частности, от инфекции *H. pylori*, которая является причиной не только гастрита, но и розацеи, и других патологий, связанных с избыточным воспалением. В эксперименте делеции гена кателицидина у мышей приводили к более сильной колонизации *H. pylori*, повышению экспрессии провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-1 β и к более низкой экспрессии противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в слизистой оболочке желудка при инфекции *H. pylori*. Обработка клеток кателицидином значительно уменьшала инфекцию *H. pylori* и связанное с этим воспаление (рис. 4) [35].

Присутствие в составе Лаеннека кателицидина и пептидов, ингибирующих фактор NF- κ B, позволяет профилактировать возможные провоспалительные эффекты кателицидина [36]. В зависимости от концентрации пептида и от наличия других лигандов, кателицидины могут проявлять противовоспалительные и потенциально провоспалительные эффекты [37]. Например, активация тучных клеток под действием LL-37 модифицируется лигандами толл-подобного рецептора TLR2, которые переключают функции тучных клеток человека с аллергических реакций на

врождённый иммунный ответ [38]. Поэтому, при наличии тех или иных лигандов, провоцирующих воспаление с участием кателецидина, ингибирование NF- κ B пептидами Лаеннека AYLSSPL, SNPLAL, GLATLVE будет проявлять противовоспалительный синергизм с эффектами пептидного фрагмента кателецидина.

Заключение / Conclusion

Для повышения эффективности и безопасности антибактериальной терапии важно не только цитотоксическое действие того или иного препарата на бактерии, но и усиление иммунных механизмов антибактериальной защиты организма. Кателецидин, фрагмент которого был найден в составе Лаеннека, является одним из факторов врождённого антибактериального иммунитета. Масс-спектрометрическое секвенирование пептидов в составе Лаеннека указало на наличие в составе препарата фрагмента антибактериального пептида кателицидина (LL-37), важного витамин-D-зависимого фактора врождённого иммунитета, и пептидов, способствующих снижению избыточного воспаления посредством ингибирования активности белка NF- κ B. Найденные особенности пептидного состава препарата Лаеннека позволяют обосновать молекулярные механизмы воздействия препарата на бактериальные колонии кожных покровов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Торшин Иван Юрьевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>

SPIN-код: 1375-1114

к. ф.-м. н., к. х. н., в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва, Российская Федерация

Ivan Yu. Torshin

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>

SPIN code: 1375-1114

PhD, Cand. Physico-Mathematical Sci., Cand. Chemical Sci., Leading researcher FRC CSC RAS, Moscow, Russian Federation

Богачева Татьяна Евгеньевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: tatiana.boga4iova@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

Tatiana E. Bogacheva

Corresponding author

e-mail: tatiana.boga4iova@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

PhD, Cand. Sci. Med., Associate Professor of the Department of Pharmacology of the FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

Громова Ольга Алексеевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>

SPIN-код: 6317-9833

д. м. н., профессор, в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва, Российская Федерация

Olga A. Gromova

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>

SPIN code: 6317-9833

Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading researcher FRC CSC RAS, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Громова О., Торшин И., Гилельс А., и др. Препараты плаценты человека: фундаментальные и клинические исследования. *Врач*. 2014;(4):67–72.
2. Gromova O, Torshin I, Gilels A, et al. Human placental preparations: basic and clinical studies. *Vrach (The Doctor)*. 2014;(4):67–72. (In Russ.).
3. Shukla VK, Rasheed MA, Kumar M, et al. A trial to determine the role of placental extract in the treatment of chronic non-healing wounds. *J Wound Care*. 2004 May;13(5):177–179. DOI: 10.12968/jowc.2004.13.5.26668.
3. Торшин И., Волков А., Гилельс А., и др. Пептидный состав препарата плаценты человека лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека. *Эстетическая медицина*. 2013;XII(1):33–45.
4. Torshin I, Volkov A, Gilels A, et al. Peptide composition of the human placenta drug Laennec and the molecular mechanisms of its effect on the human body. *Aesthetic medicine*. 2013;XII(1):33–45. (In Russ.).
4. Caruselli M, Tigano F. Azione degli estratti di placenta alla Filatov su alcuni fenomeni immunitari [Effect of Filatov's placental extracts on some immunization phenomena]. *G Bacteriol Immunol*. 1953 Sep–Oct;46(1-2):15–23. Undetermined Language.
5. Kludas M, Knoblauch R. Plazentaextrakt bei Psoriasis [Therapy of psoriasis with placental extract]. *Med Klin*. 1952 Oct 31;47(44):1459–1461. Undetermined Language
6. Novikova ZI. Vliianie vzvesi platsenty na immunologicheskie pokazateli i dinamiku kozhnogo protessa u bol'nykh ladonno-podoshvennym pustuleznym psoriazom [Effect of placenta suspension on the immunologic indicators and dynamics of skin changes in patients with palmar and plantar pustulous psoriasis]. *Vestn Dermatol Venerol*. 1985 Oct;(10):46–48. Russian.
7. Trebula J. Liecba rozrúsenej mozgomicheovej sklerózy extratom placenty [Therapy of multiple sclerosis with placental extracts]. *Bratisl Lek Listy*. 1952;32(5-6):313–323. Undetermined Language.
8. Dillon RN, Majnarich JJ. Placental extract in treatment of rheumatoid arthritis. *Northwest Med*. 1951 September; 50(9):677–679.
9. Torshin IYu, Rudakov KV. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 2: Density properties. *Pattern Recognition and Image Analysis. Advances in Mathematical Theory and Applications*. 2016;26(3):483–496.
10. Торшин И.Ю., Згода В.Г., Громова О.А., и др. Анализ лёгкой пептидной фракции Лаеннека методами современной протеомики. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2016;(4):31–42.
10. Torshin IYu, Zgoda VG, Gromova OA, et al. Analysis of the light peptide fraction of Laennec by proteomic methods. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2016;(4):31–42. (In Russ.).
11. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, et al. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jan 3;92(1):195–199. DOI: 10.1073/pnas.92.1.195.
12. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, et al. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem*. 1996 Jun 1;238(2):325–332. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0325z.x.
13. Nabel GJ, Verma IM. Proposed NF-kappa B/I kappa B family nomenclature. *Genes Dev*. 1993 Nov;7(11):2063. DOI: 10.1101/gad.7.11.2063.
14. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986 Aug 29;46(5):705–716. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90346-6.
15. Llona-Minguez S, Baiget J, Mackay SP. Small-molecule inhibitors of IκB kinase (IKK) and IKK-related kinases. *Pharm Pat Anal*. 2013 Jul;2(4):481–498. DOI: 10.4155/ppa.13.31.
16. Carter RS, Pennington KN, Ungurait BJ, Ballard DW. In vivo identification of inducible phosphoacceptors in the IKKgamma/NEMO subunit of human IκappaB kinase. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):19642–19648. DOI: 10.1074/jbc.M301705200.
17. Frohm M, Gunne H, Bergman AC, et al. Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur J Biochem*. 1996 Apr 1;237(1):86–92. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0086n.x.
18. Marcinkiewicz M, Majewski S. The role of antimicrobial peptides in chronic inflammatory skin diseases. *Postepy Dermatol Alergol*. 2016 Feb;33(1):6–12. DOI: 10.5114/pdia.2015.48066.
19. Ребров В.Г., Громова О.А. Витамины, макро- и микроэлементы. *ЭстетМед*, 2008, 986 с.
19. Rebrov VG, Gromova OA. Vitamins, macro- and microelements. *GeoTarMed*, 2008. (In Russ.).
20. Торшин И.Ю., Громова О.А., Диброва Е.А., и др. Пептиды в составе препарата Лаеннек, потенцирующие его противовирусные эффекты. *Российский Аллергологический Журнал*. 2018;6–2017:82–90.
20. Torshin IYu, Gromova OA, Dibrova EA, et al. Peptides in the composition of Laennec that show antiviral effects in the therapy of atopic dermatitis and herpes infection. *Russian Allergological Journal*. 2018;6–2017:82–90. (In Russ.).
21. Nakagawa Y, Gallo RL. Endogenous intracellular cathelicidin enhances TLR9 activation in dendritic cells and macrophages. *J Immunol*. 2015 Feb 1; 194(3):1274–1284. DOI: 10.4049/jimmunol.1402388.
22. Torshin IYu, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. part 2: metric approach within the framework of the theory of classification of feature values. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017;27(2):184–199.
23. Korucu E, Pur Ozyigit L, Ortakoylu MG, et al. Cathelicidin as a link between sarcoidosis and tuberculosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2015 Sep 14;32(3):222–227.
24. Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med*. 2009 Apr 23;7:28. DOI: 10.1186/1479-5876-7-28.
25. Лиманова О.А., Торшин И.Ю., Сардарян И.С., и др. Обеспеченность микронутриентами и женское здоровье: интеллектуальный анализ клинико-эпидемиологических данных. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2014;13(2):5–15.
25. Limanova OA, Torshin IYu, Sardaryan IS, et al. Micronutrient provision and women's health: intellectual analysis of clinical and epidemiological data. *Issues of gynecology, obstetrics and perinatology*. 2014;13(2):5–15. (In Russ.).
26. Торшин И.Ю., Лиманова О.А., Сардарян И.С., и др. Обеспеченность витамином D детей и подростков 7–14 лет и взаимосвязь дефицита витамином D с нарушениями здоровья детей: анализ крупномасштабной выборки пациентов посредством интеллектуального анализа данных. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2015;94(2):175–184.
26. Torshin IYu, Limanova OA, Sardaryan IS, et al. Provision of vitamin d in children and adolescents aged 7 to 14 years and the relationship of deficiency of vitamin d with violations of children's health: the analysis of a large-scale sample of patients by means of data mining. *Journal named after G.N. Speransky*. 2015;94(2):175–184. (In Russ.).
27. Thomi R, Schlapbach C, Yawalkar N, et al. Elevated levels of the antimicrobial peptide LL-37 in hidradenitis suppurativa are associated with a Th1/Th17 immune response. *Exp Dermatol*. 2018 Feb;27(2):172–177. DOI: 10.1111/exd.13482.
28. Sun W, Zheng Y, Lu Z, et al. LL-37 attenuates inflammatory impairment via mTOR signaling-dependent mitochondrial protection. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Sep;54:26–35. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.06.015.
29. Takiguchi T, Morizane S, Yamamoto T, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 enhances interferon-β expression and antiviral activity induced by double-stranded RNA in keratinocytes. *Br J Dermatol*. 2014 September; 171(3):492–498. DOI: 10.1111/BJD.12942.
30. Pinheiro da Silva F, Machado MC. The dual role of cathelicidins in systemic inflammation. *Immunol Lett*. 2017 Feb;182:57–60. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.01.004.
31. Das S, Sardar AH, Abhishek K, et al. Cathelicidin augments VDR-dependent anti-leishmanial immune response in Indian Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *Int Immunopharmacol*. 2017 Sep;50:130–138. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.06.010.
32. Fuentes-Duculan J, Bonifacio KM, Hawkes JE, Kunjraiva N, Cueto I, Li X, Gonzalez J, Garcet S, Krueger JG. Autoantigens ADAMTSL5 and LL37 are significantly upregulated in active Psoriasis and localized with keratinocytes, dendritic cells and other leukocytes. *Exp Dermatol*. 2017 Nov;26(11):1075–1082. DOI: 10.1111/exd.13378
33. Weiss E, Katta R. Diet and rosacea: the role of dietary change in the management of rosacea. *Dermatol Pract Concept*. 2017 Oct 31;7(4):31–37. DOI: 10.5826/dpc.0704a08.
34. Wang WM, Jin HZ. Skin Microbiome: An Actor in the Pathogenesis of Psoriasis. *Chin Med J (Engl)*. 2018 Jan 5;131(1):95–98. DOI: 10.4103/0366-6999.221269.
35. Zhang L, Wu WK, Gallo RL, et al. Critical Role of Antimicrobial Peptide Cathelicidin for Controlling Helicobacter pylori Survival and Infection. *J Immunol*. 2016 Feb 15;196(4):1799–1809. DOI: 10.4049/jimmunol.1500021.
36. Muto Y, Wang Z, Vanderberghe M, et al. Mast cells are key mediators of cathelicidin-initiated skin inflammation in rosacea. *J Invest Dermatol*. 2014 Nov;134(11):2728–2736. DOI: 10.1038/jid.2014.222.
37. Chen X, Takai T, Xie Y, et al. Human antimicrobial peptide LL-37 modulates proinflammatory responses induced by cytokine milieu and double-stranded RNA in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 19;433(4):532–537. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.024.
38. Zhang YY, Yu YY, Zhang YR, et al. The modulatory effect of TLR2 on LL-37-induced human mast cells activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Feb 5;470(2):368–374. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.037.

Изучение эффективности препарата Лаеннек при повреждении печени пальмовым маслом у крыс

© Богачева Т. Е.¹, Калачева А. Г.¹, Громова О. А.², Торшин И. Ю.²,

Гришина Т. Р.¹, Демидов В. И.¹

¹ — ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

² — ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН» (ФИЦ ИУ РАН), Москва, Российская Федерация

Аннотация. Пальмовое масло — компонент большинства продуктов питания, отличающийся высоким содержанием пальмитиновой и олеиновой кислот, избыток их приводит к образованию трипальмитинов, которые практически не поддаются ферментативному гидролизу липазой липопротеидов и определяют развитие ожирения, сахарного диабета 2 типа и атеросклероза. В настоящей работе представлены результаты исследования препарата Лаеннек, производимого на основе стандартизированных гидролизатов плаценты человека (ГПЧ). Применение ГПЧ при влиянии избыточного потребления пальмового масла в диете приводило к достоверному снижению маркеров дисфункции печени (АЛТ), которые повышаются при обогащённом рационе питания рафинированным пальмовым маслом (билирубин, общий белок, АЛТ, АСТ). Гепатопротекторный эффект Лаеннека подтверждён результатами гистологических и биохимических исследований, указывающими на снижение выраженности и распространённости жировой дистрофии печени.

Ключевые слова: пальмовое масло; стеатогепатоз; гидролизаты плаценты человека; Лаеннек; гепатопротекция

Для цитирования:

Богачева Т. Е., Калачева А. Г., Громова О. А., Торшин И. Ю., Гришина Т. Р., Демидов В. И. Изучение эффективности препарата Лаеннек при повреждении печени пальмовым маслом у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):23–31. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-23-31>

Поступила: 12.10.2023. **В доработанном виде:** 30.10.2023. **Принята к печати:** 14.11.2023. **Опубликована:** 30.12.2023.

Study of the effectiveness of the drug Laenек in case of liver damage by palm oil in rats

© Tatiana E. Bogacheva¹, Alla G. Kalacheva¹, Olga A. Gromova², Ivan Yu. Torshin², Tatiana R. Grishina¹, Vadim I. Demidov¹

¹ — FSBEI HE "Ivanovo State Medical Academy" MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

² — FRC "Computer Science and Control" RAS, Moscow, Russian Federation

Abstract. Palm oil is a component of most food products, characterized by a high content of palmitic and oleic acids, an excess of which leads to the formation of tripalmitins, practically do not respond to enzymatic hydrolysis by lipoprotein lipase and predetermine the development of obesity, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. This paper presents the results of a study of the drug Laenек, produced on the basis of standardized hydrolysates of the human placenta (HRP). The use of HRP under the influence of excessive consumption of palm oil in the diet led to a significant decrease in markers of liver dysfunction (ALT), which increase with an enriched diet of refined palm oil (bilirubin, total protein, ALT, AST). The hepatoprotective effect of Laenек was confirmed by the results of histological and biochemical studies indicating a decrease in the severity and prevalence of fatty liver dystrophy.

Keywords: palm oil; steatohepatosis; human placenta hydrolysates; Laenек; hepatoprotection

For citations:

Bogacheva TE, Kalacheva AG, Gromova OA, Torshin IYu, Grishina TR, Demidov VI. Study of the effectiveness of the drug Laenек in case of liver damage by palm oil in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):23–31. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-23-31>

Received: 12.10.2023. **Revision received:** 30.10.2023. **Accepted:** 14.11.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

В настоящее время актуальна проблема несбалансированности пищевого рациона, в котором растёт доля растительных масел, особенно пальмового масла. Пальмовое масло — это растительное масло, получаемое из мясистой части плодов масличной пальмы, которая произрастает в Индонезии и Малайзии. Масло из семян этой пальмы называется пальмоядровым маслом. Пальмовое масло отличается от других растительных масел высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, которые составляют примерно половину общего содержания жира. Главными ненасыщенными жирными кислотами пальмового масла являются пальмитиновая кислота, составляющая

41–50 %, и олеиновая кислота — 35–45 %. Избыток пальмитиновой кислоты приводит к образованию трипальмитинов, которые практически не поддаются ферментативному гидролизу липазой липопротеидов и определяют развитие ожирения, сахарного диабета 2 типа и атеросклероза [1].

Содержание незаменимых полиненасыщенных жирных кислот в пальмовом масле незначительное — линолевая, семейства омега-6 кислот, составляет 3–11 %, линоленовая кислота отсутствует [2]. Из-за несбалансированности состава жирных кислот пальмовое масло не является ценным пищевым продуктом и может применяться в питании только в комбинации с маслами, богатыми полиненасыщенными жирными кислотами омега-3, омега-6 (льняное, кедровое, рыжиковое масла).

На сегодняшний день пальмовое масло включают в состав буквально всех пищевых продуктов — от кондитерских изделий до молочной продукции. Использование пальмового масла в пищевой промышленности обусловлено его физико-химическими свойствами, обеспечивающими способность оставаться в твёрдом и полутвёрдом состоянии при комнатной температуре в отличие от большинства масел растительного происхождения [3].

Отложение жировой ткани в печени вызывает развитие неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП, синоним «жирная печень»). Существует две морфологические формы НАЖБП: неалкогольный стеатоз (жировой гепатоз) и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). При неалкогольном стеатозе процентное содержание липидных отложений в ткани печени превышает 5 %, прогноз при данном состоянии благоприятен, процесс обратим. НАСГ имеет различные степени тяжести заболевания: фиброз, цирроз, гепатоцеллюлярную карциному [4]. К развитию неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) приводит совокупность сложения генетических, диетических, гиподинамических рисков патологического накопления липидов в гепатоцитах; НАЖБП является наиболее распространённым компонентом комплекса полиморбидности [5].

В настоящее время в экспериментальных исследованиях описаны дието-индуцированные модели стеатоза печени: метионин-холин-дефицитная диета, позволяющая моделировать тяжёлую степень стеатоза и некротические изменения с воспалительным ответом на второй неделе эксперимента [6]; модель с применением рациона, богатого фруктозой (70 % фруктозы в диете), макромолекулярный стеатоз и воспаление внутри долек возникает на 5-й неделе [7]. Диета с высоким содержанием жиров также широко используется для формирования стеатоза и стеатогепатита у животных [8]. Для моделирования поражения печени на крысах применяют гепатотоксины с различными механизмами патогенного действия: гепатотоксины, преобразуемые зависимой от цитохрома P-450 монооксигеназной системой в свободные радикалы и электрофильные интермедиаты, ковалентно связывающие биомолекулы центролобулярных гепатоцитов (тетрахлорметан, галотан, бромбензол, парацетамол, тетрациклин, изониазид); аллиловый спирт, окисляемый цитозольной и митохондриальной алкогольдегидрогеназой в электрофильный метаболит акролеин, повреждающий перипортальные гепатоциты вследствие дефицита в них восстановленного глутатиона; 4-пентеновую кислоту, нарушающую β -окисление средне- и длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях печени и орнитиновый цикл синтеза мочевины с развитием эндогенной интоксикации и печёночной энцефалопатии; гепатотоксины, первично нарушающие синтез РНК и белка в гепатоцитах (D-галактозамин) — бромбензол, парацетамол,

тетрациклин, изониазид. Жировой гепатоз также вызывают у крыс с помощью интоксикации гидразином или этанолом [9].

В нашей работе проведено исследование биохимических и гистологических маркеров повреждения функции печени при влиянии избыточного потребления пальмового масла в эксперименте у крыс.

Предпринимаются различные попытки улучшить фармакотерапию заболеваний печени, без риска формирования лекарственного поражения печени (ЛПП). По данным глобальной базы данных о зарегистрированных неблагоприятных осложнениях при приёме лекарств (VigiBase, <https://who-umc.org/vigibase/>) на 2022 г., гепатотоксичность является самым распространённым побочным эффектом при приёме лекарственных средств [10]. Не рекомендуется использовать фитокомпозиции (экстракт зелёного чая (катехин), анаболические стероиды, пирролизидиновые алкалоиды, флавококсиб), т. к. они повышают риск ЛПП [11], не применять гиполипидемические препараты (статины, фибраты), препараты для заместительной гормональной терапии (эстрогены/эстрадиол, гестагены/прогестерон, комбинированные препараты: эстроген- и гестагенсодержащие, эстроген- и андрогенсодержащие), сахароснижающие препараты (гликлазид, глибенкламид), антибактериальные препараты (амоксициллин/клавуланат, изониазид, триметоприм/сульфаметоксазол, моксифлоксацин, кларитромицин, джозамицин, нитрофурантоин, миноциклин, тетрациклин, клиндамицин, линкомицин, метронидазол, рифампицин, рифабутин, тигециклин и др.), противогрибковые препараты (флуконазол, вориконазол, каспофунгин, итраконазол), нестероидные противовоспалительные (парацетамол [12], ибупрофен и др.). Адекватное лечение НАЖБП — сложная проблема для выбора патогенетически обоснованной фармакотерапии. Есть определённый опыт в лечении НАЖБП стандартизированными формами гидролизата плаценты человека (ГПЧ).

Гидролизаты плаценты человека с высокой степенью фармацевтической стандартизации представляют собой одно из наиболее перспективных направлений гепатопротекции. Например, ГПЧ Лаеннек представляет собой мультикомпонентный высокоочищенный препарат на основе гидролизата плаценты человека и содержащий полифункциональные пептидные фрагменты с противовоспалительным и регенераторным действием, витамины (В₁, В₂, РР, В₁₂, С), аминокислоты (например, цистеин), различные макро- и микроэлементы (сера, кобальт, цинк, селен и др.), проявляющие гепатопротекторные эффекты [13].

Препарат зарегистрирован для лечения таких заболеваний печени, как К70.0 Алкогольная жировая дистрофия печени, К76.0 Жировая дегенерация печени, К76.9 Болезнь печени неуточнённая. Гидролизаты плаценты человека успешно используются для ускорения заживления ран, поддержания состояния

кожи и её придатков, терапии синдрома хронической усталости, аллергии и атопического дерматита, а также при лечении заболеваний женской репродуктивной сферы [14–16]. Описаны эффекты ГПЧ для повышения иммунитета [17], терапии псориаза [18, 19], рассеянного склероза [20, 21], ревматоидного артрита и других заболеваний, ассоциированных с повышенным уровнем хронического воспаления.

Благодаря особенностям пептидного состава ГПЧ Лаеннек может способствовать регенерации гепатоцитов, восстанавливать нарушенную функцию печени и других органов. Представлены результаты анализа пептидного состава препарата Лаеннек с точки зрения метаболического синдрома [22]. Гепатопротекторное действие Лаеннека может существенно дополнять фармакологию препарата и являться одним из факторов, способствующих ускоренному заживлению повреждений печени в условиях избытка потребления пальмового масла.

Целью данной работы является изучение эффективности препарата Лаеннек при повреждении печени пальмовым маслом у крыс.

Материалы и методы / Materials and methods

Исследование проведено на 48 белых крысах-самцах массой 200–300 г. Животные были разделены на 4 группы: первая группа ($n = 12$) — контроль-интактный; второй ($n = 12$) и четвёртой группе ($n = 12$) крыс вводили препарат Лаеннек (регистрационный номер П N013851/01, Джапан Био Продактс Ко., Япония) в терапевтической курсовой дозе внутримышечно; в третьей ($n = 12$) и в четвёртой группах животных в рацион питания добавляли рафинированное пальмовое масло (CandleM, Индонезия) в избыточном количестве на протяжении периода наблюдения. В конце эксперимента животных всех групп наркотизировали, проводили забор крови для биохимического исследования и секционного материала (печени) для патогистологического исследования.

В сыворотке крови определяли содержание аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), уровни общего белка, прямого и общего билирубина (с помощью стандартных наборов Ольвекс), малонового диальдегида (МДА) по методу Jagi [23]. В группах сравнения проводилось определение интенсивности процесса перекисного окисления липидов в сыворотке крови методом индуцированной хемолуминесценции.

После эвисцерации печень фиксировалась в 10 % растворе нейтрального формалина, через 1 сутки орган препарировался, выделялись фрагменты правой и левой доли, которые повторно фиксировались. После вторичной фиксации и промывки материала проводка (обезвоживание) ткани печени осуществлялась с помощью 99 % изопропилового спирта. В дальнейшем кусочки заливались парафином, и изготовленные на

санном микротоме «Microm» гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Оценка патологических изменений печени крыс при моделировании стеатоза учитывала структурные изменения гепатоцитов, степень расстройства кровообращения, особенности ответной воспалительной реакции.

Микрофотографии получены с помощью исследовательского микроскопа «Micros» МС-200 и цифровой окулярной камеры DCM 900.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программа «Statistica 6,0».

Результаты исследования / Research results

Все исследованные биохимические параметры отражают функциональное состояние печени. Уровни АСТ, АЛТ в крови являются индикаторными ферментами цитолитического синдрома. Ферменты АСТ и АЛТ присутствуют в значительных количествах в печени и почках, поэтому в норме их концентрации в крови невелики. Маркер экскреторной и антитоксической функции печени — билирубин, один из промежуточных продуктов распада гемоглобина, происходящего в гепатоцитах. МДА возникает в организме при деградации полиненасыщенных жиров и является маркером оксидативного стресса. При повреждении гепатоцитов происходит потеря гепатоцитами МДА, билирубина, ферментов АСТ и АЛТ, и уровни этих биохимических маркеров в крови возрастают. Изменения уровня общего белка является признаком грубой патологии печени и нарушением её синтетической функции.

Результаты определения биохимических показателей крови показали, что пищевой рацион, обогащённый пальмовым маслом, приводил к поражению печени: у животных третьей группы (пальмовое масло, контроль) наблюдалось достоверное снижение уровня прямого (конъюгированного) билирубина ($p = 0,001$) и общего билирубина в плазме крови ($p = 0,002$). Длительный приём пальмового масла приводил к цитолизу гепатоцитов, что подтверждается значимым повышением активности трансаминаз АЛТ и АСТ ($p < 0,05$). В третьей группе животных наблюдалось значимое нарушение белково-синтетической функции, достоверно снизилось содержание общего белка сыворотки крови ($p = 0,03$) по сравнению с контрольной группой. Особенностью данной работы является то, что при поражениях печени не происходит увеличение уровней малонового диальдегида.

Результаты исследования показали, что применение препарата Лаеннек у здоровых животных (вторая группа, Лаеннек) не приводило к изменению биохимических показателей по сравнению с группой контроля.

В четвёртой группе наблюдения, получавшей Лаеннек на фоне избыточного потребления пальмового масла в диете, достоверно снизился уровень АЛТ ($p = 0,002$), что подтверждает уменьшение цитоли-

за гепатоцитов. Однако значимо снизился уровень прямого билирубина, увеличился показатель МДА по сравнению со всеми группами сравнения. Для восстановления популяции гепатоцитов, вероятно, требуется более продолжительное время введения препарата.

Таким образом, добавление в рацион питания избыточного содержания рафинированного пальмового масла ежедневно на протяжении периода наблюдения нарушает целостность гепатоцитов, что подтверждается достоверным изменением биохимических показателей (АЛТ, АСТ, прямой и общий билирубин, общий белок сыворотки крови). Курсовое введение ГПЧ Лаеннек в терапевтической дозе на фоне избыточного потребления пальмового масла в диете достоверно снизило уровень АЛТ, что подтверждает уменьшение цитолиза гепатоцитов.

Наиболее информативными для оценки интенсивности процесса перекисного окисления липидов являются следующие показатели хемилюминесценции: I_{max} — максимальная интенсивность, которая отражает потенциальную способность биологического объекта к свободно-радикальному окислению; S — светосумма, отражает содержание радикалов RO_2 , соответствующих обрыву цепи свободнорадикального окисления комплекс соединений, обладающих как антиоксидантным, так и прооксидантным действием. Результаты исследования показали, что I_{max} значительно отличается в третьей группе (пальмовое масло, контроль) по сравнению с первой группой животных (Контроль) ($p = 0,0009$).

Антиоксидантный потенциал обследуемой пробы коррелирует с показателем tg_2 и коэффициентами α и Z . Чем выше значения показателя tg_2 , тем выше антиоксидантная активность и, наоборот, чем выше значения α и Z , тем ниже активность антиоксидантной системы. Показатель tg_2 достоверно ниже в третьей группе (пальмовое масло, контроль) по сравнению с первой группой (Контроль) ($p = 0,003$). В четвёртой группе наблюдения у животных на фоне избыточного потребления пальмового масла в диете в комбинации с препаратом Лаеннек все показатели ПОЛ сохраняются на уровне показателей третьей группы (пальмовое масло, контроль) и значительно отличаются от коэффициентов у животных первой группы (Контроль) и второй группы (Лаеннек). Таким образом, препарат Лаеннек не уменьшил перекисное окисление липидов, вызванное пальмовым маслом, и не повысил антиоксидантную активность.

Оценка патогистологических изменений печени крыс при избыточном потреблении пальмового масла в диете учитывала степень расстройства кровообращения, особенности ответной воспалительной реакции, структурные изменения гепатоцитов.

Во всех наблюдениях контрольной группы (группа 1) и группы животных, получавших Лаеннек (группа 2), микроскопическая картина ткани печени соответ-

ствовала норме. В пределах отдельно взятой печёночной дольки при сохранении гистоархитектоники наблюдалась равномерная перфузия синусоидов, как в центральной и в перипортальной зонах, гепатоциты имели привычную конфигурацию и равномерную окраску, в строме портальных трактов присутствовали единичные лимфоциты (рис. 1).

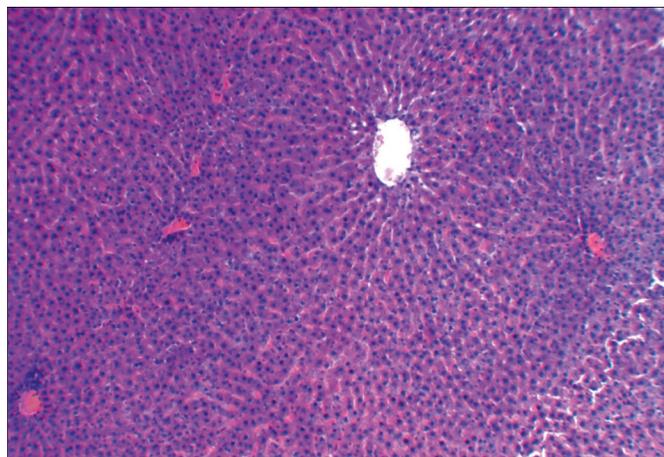


Рис. 1. Структура неизменённой печёночной дольки
Fig. 1. The structure of the unchanged liver lobule

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 120$.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 120$.

В условиях избыточного поступления жирных кислот в организм лабораторных животных (группа 3) структурные изменения печени нашли отражение во всех случаях наблюдений, но имели различную степень выраженности.

Нарушение кровообращения характеризовалось умеренно выраженным полнокровием печёночных вен и синусоидов центральных отделов печёночных долек (рис. 2).

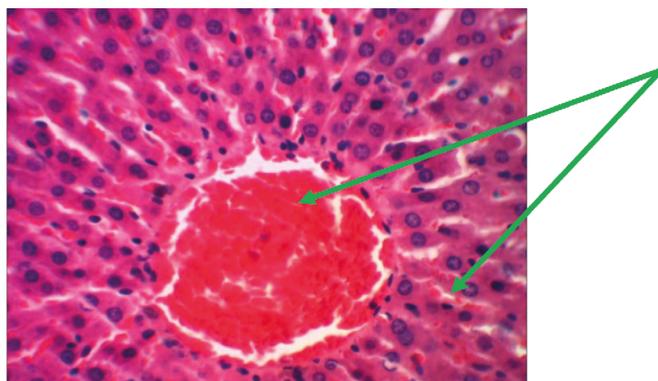


Рис. 2. Полнокровие вены и синусоидов центральной зоны печёночной дольки при отсутствии структурных изменений гепатоцитов

Fig. 2. Fullness of the vein and sinusoids of the central zone of the hepatic lobule in the absence of structural changes in hepatocytes

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 480$.

Структурные повреждения гепатоцитов характеризовались наличием оптически прозрачных вакуолей в цитоплазме со смещением ядра на периферию клетки (рис. 3).

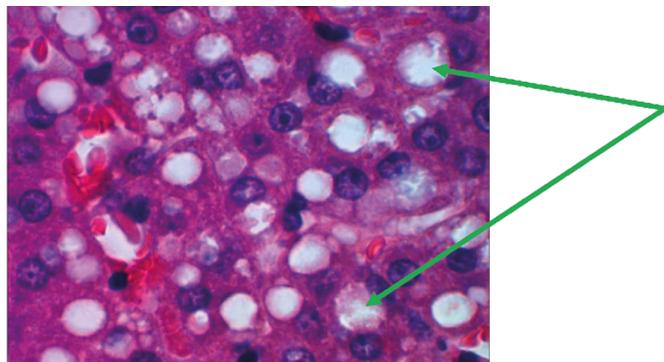


Рис. 3. Крупнокапельное ожирение гепатоцитов

Fig. 3. Large-drop obesity of hepatocytes

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1200$.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 1200$.

В 10 наблюдениях жировая дистрофия гепатоцитов была ограничена перипортальными зонами печёчных долек (рис. 4).

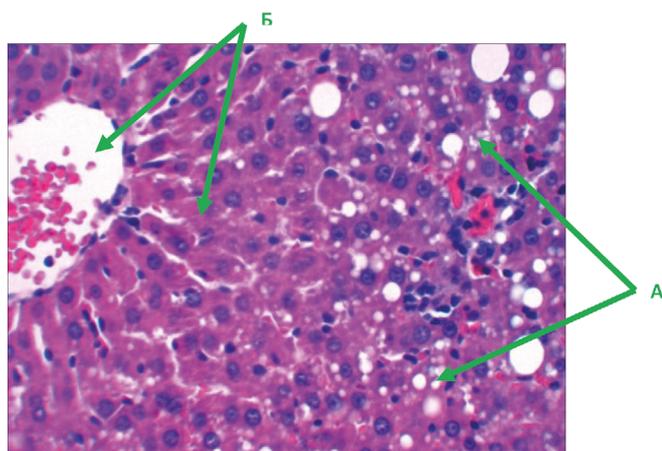


Рис. 4. Жировая дистрофия гепатоцитов в перипортальных зонах (А), в центре дольки гепатоциты интактны (Б)

Fig. 4. Fatty degeneration of hepatocytes in the periportal zones (A), in the center of the lobule hepatocytes are intact (B)

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 480$.

В 2 наблюдениях отмечено субтотальное крупномелкокапельное ожирение гепатоцитов, сопровождающаяся дисконфлексацией печёчных балок, деформацией и неравномерным полнокровием синусоидов (рис. 5).

Наряду с жировой дистрофией гепатоцитов в 3 наблюдениях имелись признаки нарушенной секреции конъюгированного билирубина в виде фокального внутриклеточного холестаза (рис. 6).

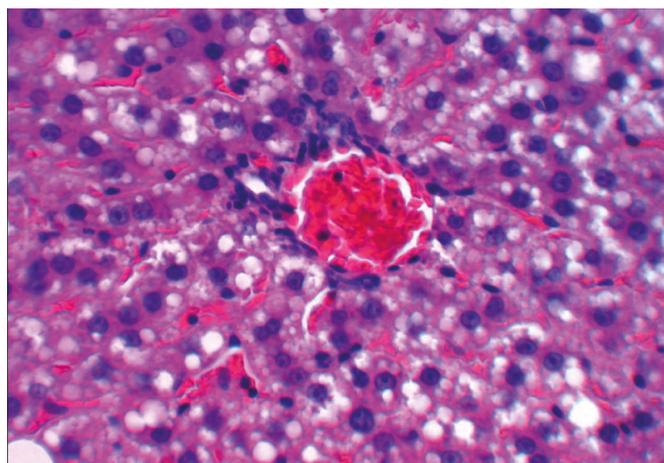


Рис. 5. Распространённая жировая дистрофия гепатоцитов с нарушением гистоархитектоники печёчной дольки

Fig. 5. Extended fatty degeneration of hepatocytes with a violation of the histoarchitectonics of the hepatic lobule

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 480$.

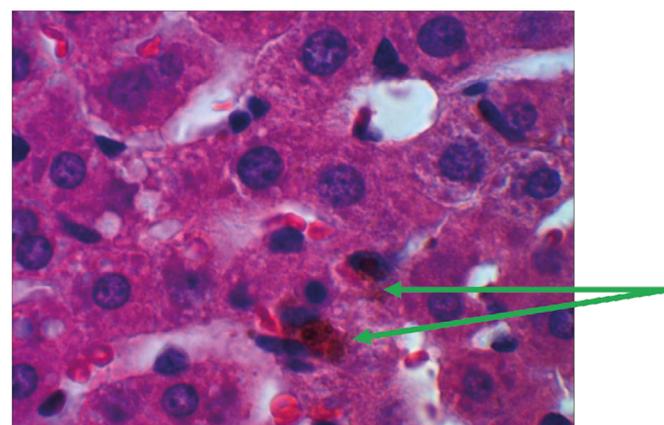


Рис. 6. Желчные пигменты в цитоплазме гепатоцитов

Fig. 6. Bile pigments in the cytoplasm of hepatocytes

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1200$.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 1200$.

Мезенхимально-клеточная реакция на повреждение гепатоцитов характеризовалась умеренно выраженной пролиферацией звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера) и лимфоцитарной инфильтрацией стромы портальных трактов (рис. 7).

Все вышеописанные изменения имели большую степень выраженности в правой доли печени.

При избыточном потреблении пальмового масла в диете и параллельном введении препарата Лаеннек у лабораторных животных (группа 4) зафиксированы следующие структурные нарушения печени:

Жировая дистрофия гепатоцитов обнаруживалась только в перипортальных зонах печёчных долек и носила очаговый характер, при этом большая часть печёчных клеток не имела видимых структурных повреждений (рис. 8).

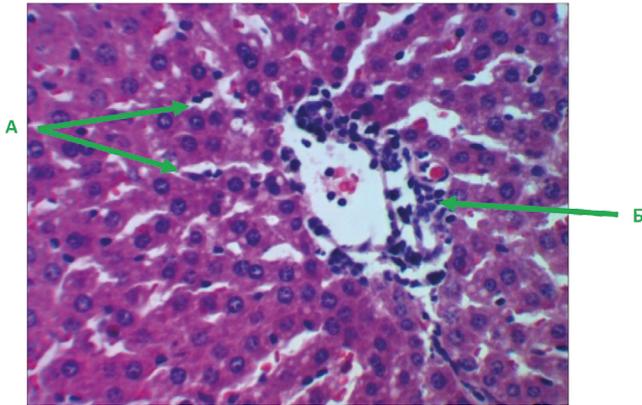


Рис. 7. Проплиферация Купферовских клеток (А), лимфоцитарный инфильтрат в зоне портального тракта (Б)
Fig. 7. Proliferation of Kupfer cells (A), lymphocytic infiltrate in the portal tract zone (B)

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 480.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification × 480.

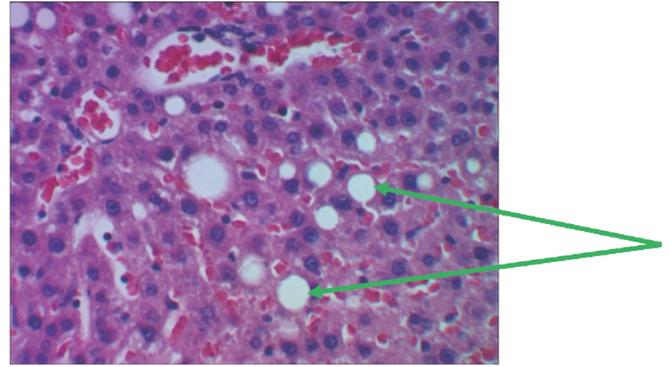


Рис. 9. Фокальная жировая дистрофия гепатоцитов перипортальной зоны печёночной дольки, умеренно выраженное полнокровие синусоидов

Fig. 9. Focal fatty dystrophy of hepatocytes of the periportal zone of the hepatic lobule, moderate fullness of sinusoids

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 480.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification × 480.

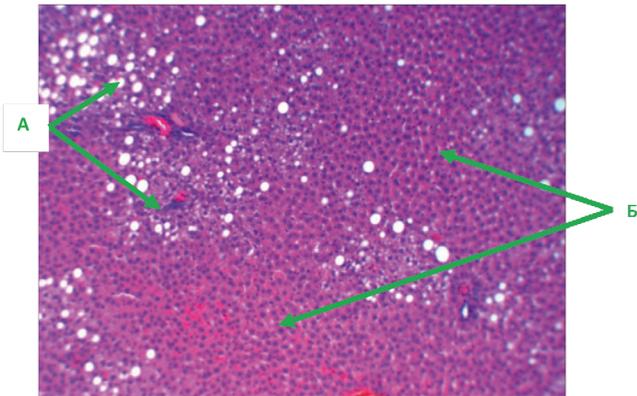


Рис. 8. Жировая дистрофия гепатоцитов в перипортальных зонах (А), гепатоциты прецентрального отдела и центров долек не имеют видимых повреждений (Б)
Fig. 8. Fatty degeneration of hepatocytes in the periportal zones (A), hepatocytes of the precentral division and lobule centers have no visible damage (B)

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 120.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification × 120.

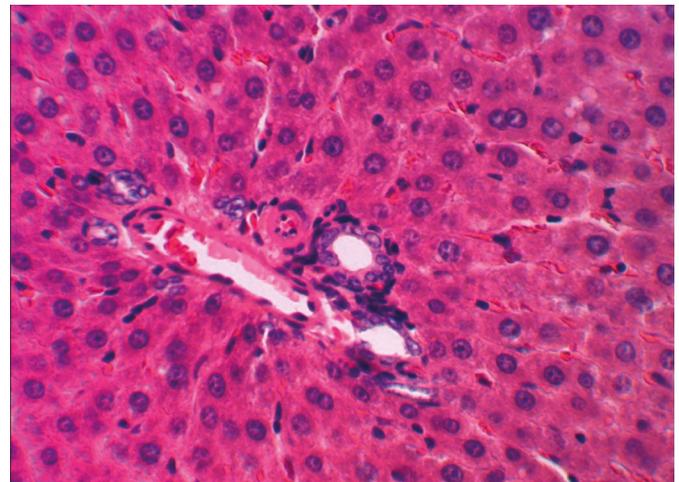


Рис. 10. Перипортальная зона печёночной дольки с сохранённой гистоархитектоникой, гепатоциты без признаков жировой дистрофии

Fig. 10. Periportal zone of the hepatic lobule with preserved histoarchitecture, hepatocytes without signs of fatty degeneration

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 480.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification × 480.

В 5 наблюдениях этой группы ожирение гепатоцитов имело фокальный характер (рис. 9).

Лишь в одном наблюдении 4-й группы повреждения печени оказались минимальными в виде единичных гепатоцитов, в цитоплазме которых обнаруживались мелкие капли липидов (рис. 10).

Во всех наблюдениях отмечалась слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы портальных трактов (рис. 11).

Патогистологическое исследование печени крыс при избыточного потребления пальмового масла в диете показало следующие изменения: (1) в контрольной группе и группе животных, получавших гидролизат плаценты человека Лаеннек, микроскопическая

картина ткани печени соответствовала норме; (2) в результате эксперимента диета с избыточным потреблением пальмового масла способствовала развитию стеатогепатоза, что имеет морфологическое подтверждение во всех группах наблюдений и характеризовалось развитием жировой дистрофии гепатоцитов с локализацией преимущественно в перипортальной зоне печёночной дольки, умеренно выраженной мезенхимально-клеточной реакцией; (3) использование препарата Лаеннек в 4-й группе наблюдений оказало отчётливый гепатопротекторный эффект, снижая выраженность и распространённость жировой дистрофии

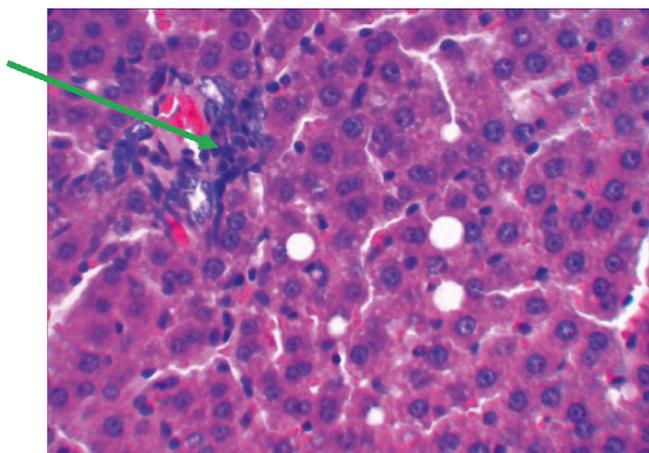


Рис. 11. Воспалительно-клеточный инфильтрат стромы портального тракта, фокальная жировая дистрофия гепатоцитов

Fig. 11. Inflammatory cell infiltration of the portal tract stroma, focal fatty degeneration of hepatocytes

Примечания: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$.
Notes: Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 480$.

печени (стеатогепатоза), которая приобрела форму фокального и мелкоочагового ожирения гепатоцитов без нарушения гистоархитектоники органа.

Заключение / Conclusion

Применение ГПЧ Лаеннек проявляет отчётливый гепатопротекторный эффект при избыточном потреблении пальмового масла в диете. Гистологическая картина гепатопротекторного действия препарата

Лаеннек подтверждается результатами биохимических исследований. У экспериментальных животных, которым вместе с избытком пальмового масла в рационе питания вводился ГПЧ Лаеннек, снижалась выраженность и распространённость жировой дистрофии печени (стеатогепатоза), которая приобрела форму фокального и мелкоочагового ожирения гепатоцитов без нарушения гистоархитектоники органа. Поскольку проблема несбалансированности пищевого рациона, в котором растёт доля растительных масел, особенно пальмового масла, в настоящее время является острой, снижение гепатотоксических эффектов пальмового масла посредством ГПЧ весьма актуально, особенно у пациентов с хроническими заболеваниями печени.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

Participation of authors. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Богачева Татьяна Евгеньевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: tatiana.boga4iova@yandex.ru.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

Tatiana E. Bogacheva

Corresponding author

e-mail: tatiana.boga4iova@yandex.ru.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

PhD, Cand. Sci. Med., Associate Professor of the Department of Pharmacology of the FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

Калачева Алла Геннадьевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6144-5781>

к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

Alla G. Kalacheva

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6144-5781>

PhD, Cand. Sci. Med., Associate Professor of the Department of Pharmacology of the FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

Громова Ольга Алексеевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>
 SPIN-код: 6317-9833

д. м. н., профессор, в. н. с. ФИЦ ИУ РАН,
 Москва, Российская Федерация

Olga A. Gromova

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>
 SPIN code: 6317-9833

Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading researcher FRC
 CSC RAS, Moscow, Russian Federation

Торшин Иван Юрьевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>
 SPIN-код: 1375-1114

к. ф-м. н., к. х. н., в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва,
 Российская Федерация

Ivan Yu. Torshin

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>
 SPIN code: 1375-1114

PhD, Cand. Physico-Mathematical Sci., Cand.
 Chemical Sci., Leading researcher FRC CSC RAS,
 Moscow, Russian Federation

Гришина Татьяна Романовна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-2348-5793>

д. м. н., профессор кафедры фармакологии
 ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России,
 Иваново, Российская Федерация

Tatiana R. Grishina

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-2348-5793>

Dr. Sci. (Med.), Professor Associate Professor of
 the Department of Pharmacology of the FSBEI HE
 IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

Демидов Вадим Игоревич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1064-8201>

к. м. н., доцент, заведующий кафедрой
 патологической анатомии ФГБОУ ВО ИвГМА
 Минздрава России, Иваново, Российская
 Федерация

Vadim I. Demidov

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1064-8201>

PhD, Cand. Sci. Med., Associate Professor, Head
 of the Department of Pathological Anatomy FSBEI
 HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

Список литературы / References

1. Титов В.Н. Высокое содержание пальмитиновой жирной кислоты в пище — основная причина повышения уровня холестерина липопротеинов низкой плотности и атероматоза системы артерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013;(2):3–10.

Titov VN. The high content of palmitinic fatty acid in food as a major cause of increase of concentration of cholesterol and low density lipoproteins and nodular sclerosis of arteries' intima. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2013;(2):3–10. (In Russ.).

2. Анисимов А.А. Пальмовое масло и его роль в производстве продуктов. *Масложировая промышленность*. 2002;(2):22–24.

Anisimov AA. Palm oil and its role in the production of products. *Fat-and-oil industry*. 2002;(2):22–24. (In Russ.).

3. Рафинация масел и жиров: Теоретические основы, практика, технология, оборудование. / Н.С. Арутюнян, Е.П. Корнена, Е.А. Нестерова. СПб.: ГИОРД, 2004. 288 с.

Teoreticheskie osnovy, praktika, tekhnologiya, oborudovanie. NS Narutyunyan, EP Kornena, EA Nesterova. St. Petersburg: GIORD. (In Russ.).

4. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):73–84. DOI: 10.1002/hep.28431.

5. Драпкина О. М., Концевая А. В., Калинина А. М., и др. Профилактика хронических неинфекционных заболеваний в Российской Федерации. Национальное руководство 2022. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022;21(4):3235. DOI:10.15829/1728-8800-2022-3235. EDN DNBVAT.

Drapkina OM, Kontsevaya AV, Kalinina AM, et al. 2022 Prevention of chronic non-communicable diseases in the Russian Federation. National

guidelines. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(4):3235. (In Russ.). DOI:10.15829/1728-8800-2022-3235. EDN DNBVAT.

6. Fan JG, Qiao L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2009 Jun;8(3):233–240.

7. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*. 2006 Feb;87(1):1–16. DOI: 10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x.

8. Оковитый С.В., Шустов Е.Б., Белых М.А., и др. Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных. *Биомедицина*. 2018;(4):29–43.

Okovity SV, Shustov EB, Belyh MA. Modeling of non-alcoholic liver steatosis: features of metabolic changes in the body of laboratory animals. *Biomedicine*. 2018;(4):29–43. (In Russ.).

9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: ФГБУ «НЦЭМСП» Минздрава России, 2012. 944 с.

Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part One. Moscow: FGBU «NCEMSP» Minzdravsocrazvitiya Rossii. 2012. (In Russ.).

10. LiverTox®. <http://livertox.nlm.nih.gov>

11. Гасанова Д.А., Асметов В.Я., Искендеров В.Г., Гасанова З.З. Снижение активности трансаминаз суммарным экстрактом фитоконпозиции при токсическом повреждении печени. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2017;62(8-3):102–120. DOI: 10.23670/IRJ.2017.62.078.

Gasanova DA, Asmetov VYa, Iskenderov VG, Gasanova ZZ. Decrease of transaminase activity by the total extract of phytocomposition in cases of liver toxic damage. *Mezhdunarodny'j nauchno-issledovatel'skij zhurnal* [International Research Journal]. 2017;62(8-3):102–120. (In Russ.). DOI: 10.23670/IRJ.2017.62.078.

12. Громова О.А., Торшин И.Ю., Демидов В.И., и др. Экспериментальный лекарственный гепатит. Гепатопротекторные эффекты пре-

парата Лаеннек на моделях токсического повреждения печени парацетамолом или алкоголем. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2022;199(3):86–92. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-199-3-86-92.

Gromova OA, Torshin IYu, Demidov VI, et al. Experimental medicinal hepatitis. Hepatoprotective effects of the drug Laennec in models of toxic liver injury with paracetamol or alcohol. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;199(3):86–92. (In Russ.). DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-199-3-86-92.

13. Справочник лекарственных средств Видаль. М.: Видаль Рус, 2021. 1298 с.

Reference book of medicines Vidal. Moscow. Vidal Rus, 2021. (In Russ.).

14. Громова О., Торшин И., Гилельс А., и др. Препараты плаценты человека: фундаментальные и клинические исследования. *Врач*. 2014;(4):67–72.

Gromova O, Torshin I, Gilels A, et al. Human placental preparations: basic and clinical studies. *Vrach (The Doctor)*. 2014;(4):67–72. (In Russ.).

15. Shukla VK, Rasheed MA, Kumar M, et al. A trial to determine the role of placental extract in the treatment of chronic non-healing wounds. *J Wound Care*. 2004 May;13(5):177–179. DOI: 10.12968/jowc.2004.13.5.26668.

16. Торшин И., Волков А., Гилельс А., и др. Пептидный состав препарата плаценты человека лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека. *Эстетическая медицина*. 2013;XII(1):33–45.

Torshin I, Volkov A, Gilels A, et al. Peptide composition of the human placenta drug Laennec and the molecular mechanisms of its effect on the human body. *Esteticheskaya medicina*. 2013;XII(1):33–45. (In Russ.).

17. Caruselli M, Tigano F. Azione degli estratti di placenta alla Filatov su alcuni fenomeni immunitari [Effect of Filatov's placental extracts on some

immunization phenomena]. *G Bacteriol Immunol*. 1953 Sep-Oct;46(1-2):15–23. Undetermined Language.

18. Kludas M, Knoblauch R. Plazentaextrakt bei Psoriasis [Therapy of psoriasis with placental extract]. *Med Klin*. 1952 Oct 31;47(44):1459–1461. Undetermined Language.

19. Novikova ZI. Vliianie vzvesi platsenty na immunologicheskie pokazateli i dinamiku kozhnogo protsesssa u bol'nykh ladonno-podoshvennym pustuleznym psoriazom [Effect of placenta suspension on the immunologic indicators and dynamics of skin changes in patients with palmar and plantar pustulous psoriasis]. *Vestn Dermatol Venerol*. 1985 Oct;(10):46–48. Russian.

20. Trebula J. Liecba roztrúsenej mozgomiechovej sklerózy extratom placenty [Therapy of multiple sclerosis with placental extracts]. *Bratisl Lek Listy*. 1952;32(5-6):313–323. Undetermined Language.

21. Dillon RN, Majnarich JJ. Placental extract in treatment of rheumatoid arthritis. *Northwest Med*. 1951 Sep;50(9):677–679.

22. Громова О.А., Торшин И.Ю., Згода В.Г., Томилова И.К. Молекулярные механизмы действия препарата Лаеннек против формирования метаболического синдрома и ожирения. *Терапия*. 2017;(5):73–83.

Gromova OA, Torshin IYu, Zgoda VG, Tomilova IK. Molecular mechanisms of action of Laennec against development of metabolic syndrome and obesity. *Therapy*. 2017;(5):73–83. (In Russ.).

23. Клиническая биохимия / под ред. В.А. Ткачука. 2-е изд. испр. и доп. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 512 с.

Clinical biochemistry. Ed by VA Tkachuk. Moscow: GEOTAR-MED, 2004. (In Russ.).

Изучение антацидного действия лекарственного препарата Антарейт® у здоровых добровольцев

Захаров К. А.¹, Василюк В. Б.¹, Гончаров А. С.², Гончаров И. С.², Лосевич А. В.³, Григорьев А. В.⁴, Вербицкая Е. В.⁴, Глобенко А. А.⁵, Капашин А. В.⁵, Пасько М. А.⁵

¹ — ООО «НИЦ Эко-безопасность», Санкт-Петербург, Российская Федерация

² — ООО «Серта клиник», Москва, Российская Федерация

³ — ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина», Санкт-Петербург, Российская Федерация

⁴ — ООО «ЦКП «Аналитическая Спектрометрия», Санкт-Петербург, Российская Федерация

⁵ — АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Цель. Изучение фармакодинамических параметров и подтверждение фармакодинамической эквивалентности (биоэквивалентности) лекарственных препаратов Антарейт® (МНН магалдрат), таблетки жевательные, 800 мг (АО «Валента Фарм», Россия) и Риопан® (МНН магалдрат), таблетки жевательные, 800 мг (Такеда ГмбХ, Германия). **Материал и методы.** Проведено открытое рандомизированное перекрёстное исследование по изучению фармакодинамики исследуемого препарата Антарейт® и референтного препарата Риопан®, с оценкой их биоэквивалентности после приёма 2 жевательных таблеток исследуемого или референтного препарата 3 раза в день. В исследовании приняли участие 40 здоровых добровольцев, которые были рандомизированы в 2 группы по 20 человек в зависимости от последовательности приёма препаратов в периодах исследования I и II. В течение 30 минут до приёма и далее на протяжении часа после приёма исследуемых препаратов при помощи pH-зонда проводилось измерение внутрижелудочной кислотности. На основании полученных данных рассчитывали 90 % доверительные интервалы (ДИ) для фармакодинамического параметра AUC_{ABL} , отражающего площадь превышения pH над исходным значением (above the baseline). Безопасность исследуемых препаратов оценивалась по частоте и тяжести нежелательных явлений (НЯ). **Результаты.** Статистический анализ показал, что 90 % ДИ для отношения средних значений параметра AUC_{ABL} исследуемого препарата к референтному препарату не опускался ниже 80 % (90 % ДИ: 80,55–119,49). В ходе проведения исследования было зарегистрировано 18 нежелательных явлений (НЯ) у 15,4 % (6 из 39) добровольцев в популяции безопасности, при этом отсутствовали статистически значимые различия по частоте НЯ между группами, а также по частоте НЯ в зависимости от принятого препарата. **Заключение.** Исследуемые препараты являются фармакодинамически эквивалентными и обладают сходным профилем безопасности при многократном приёме.

Ключевые слова: Антарейт®; магалдрат; фармакодинамические исследования; биоэквивалентность; кислотозависимые заболевания

Для цитирования:

Захаров К. А., Василюк В. Б., Гончаров А. С., Гончаров И. С., Лосевич А. В., Григорьев А. В., Вербицкая Е. В., Глобенко А. А., Капашин А. В., Пасько М. А. Изучение антацидного действия лекарственного препарата Антарейт® у здоровых добровольцев. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):32–40. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-32-40>

Поступила: 11.12.2023. **В доработанном виде:** 18.12.2023. **Принята к печати:** 25.12.2023. **Опубликована:** 30.12.2023.

Study of antacid effect of the drug Antareit® in healthy volunteers

Konstantin A. Zakharov¹, Vasily B. Vasilyuk¹, Alexander S. Goncharov², Ivan S. Goncharov², Anastasia V. Losevich³, Alexander V. Grigorev⁴, Elena V. Verbitskaya⁴, Alexander A. Globenko⁵, Aleksey V. Kapashin⁵, Maxim A. Pasko⁵

¹ — Scientific Research Center Eco-Safety LLC, St. Petersburg, Russian Federation

² — Serta Clinic LLC, Moscow, Russian Federation

³ — Clinical Hospital «RZD-Medicine», St. Petersburg, Russian Federation

⁴ — CSU “Analytical Spectrometry”, St. Petersburg, Russian Federation

⁵ — “Valenta Pharm” JSC, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim. Study of pharmacodynamic parameters and confirmation of pharmacodynamic equivalence (bioequivalence) of the drugs Antareit® (INN: magaldrate), chewable tablets, 800 mg (Valenta Pharm JSC, Russia) and Riopan (INN magaldrate), chewable tablets, 800 mg (Takeda GmbH, Germany). **Material and methods.** An open randomized crossover study was conducted to investigate the pharmacodynamics of the study drug Antareit® and the reference drug Riopan, assessing their bioequivalence after taking 2 chewable tablets of the study or reference drug 3 times a day. The study involved 40 healthy volunteers who were randomized into 2 groups of 20 people depending on the sequence of drug administration in study periods I and II. Intra-gastric acidity was measured with a pH-probe within 30 minutes before and for one hour after taking the study drugs. Based on the data obtained, 90% confidence intervals (CI) were calculated for the pharmacodynamic parameter AUC_{ABL} , reflecting the area above the baseline pH. The safety of the study drugs was assessed by the frequency and severity of adverse events (AEs). **Results.** Statistical analysis showed that the 90% CI for the ratio of the mean values of the AUC_{ABL} parameter of the study drug to the reference drug did not fall below 80% (90% CI: 80.55–119.49). During the study, 18 adverse events (AEs) were reported in 15.4% (6 of 39) of volunteers in the safety population, and there were no statistically significant differences in the incidence of AEs between groups, nor in the incidence of AEs depending on the drug taken. **Conclusion.** The studied drugs are pharmacodynamically equivalent and have a similar safety profile when administered repeatedly.

Keywords: Antareit®; magaldrate; pharmacodynamic studies; bioequivalence; acid-related disorders

For citations:

Zakharov KA, Vasilyuk VB, Goncharov AS, Goncharov IS, Losevich AV, Grigorev AV, Verbitskaya EV, Globenko AA, Kapashin AV, Pasko MA. Study of antacid effect of the drug Antareit® in healthy volunteers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):32–40. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-32-40>

Received: 11.12.2023. **Revision received:** 18.12.2023. **Accepted:** 25.12.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

Нарушение процессов кислотопродукции и поддержания необходимого рН в желудке и двенадцатиперстной кишке (ДПК) является патогенетической основой различных заболеваний желудочно-кишечного тракта. В группу кислотозависимых заболеваний (КЗЗ) включают гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь (ГЭРБ), язвенную болезнь желудка и ДПК, неязвенную (функциональную) диспепсию, хронический неатрофический гастрит и гастродуоденит, расстройства на фоне приёма нестероидных противовоспалительных средств (НПВП-гастропатия), синдром Золлингера–Эллисона, также хронический панкреатит (за счёт снижения секреции бикарбонатов в просвет ДПК) [1–3]. Язвенная болезнь желудка и ДПК широко распространена в странах Западной Европы, где ей страдают в среднем 8,2 % населения, в США — от 7 до 10 %, в Японии — 11 %, в Индии — 25 %. Симптомы ГЭРБ наблюдаются почти у половины взрослого населения земного шара, а эндоскопические признаки, характерные для данного заболевания, отмечаются у 2–10 % обследованных лиц [4, 5]. Результаты многоцентрового исследования по изучению распространённости ГЭРБ в России показали, что её симптомы отмечаются у 34,2 % пациентов, обратившихся в поликлинику за первичной медицинской помощью. По данным приведённого исследования, изжогу и/или регургитацию на протяжении последних 12 месяцев отмечали 73,5 % опрошенных [6].

Для лечения КЗЗ применяются лекарственные препараты из различных фармако-терапевтических групп, основными из которых являются ингибиторы протонной помпы (ИПП), антагонисты H_2 -гистаминовых рецепторов, прокинетики, эзофаго- и гастропротекторы, антациды и препараты альгиновой кислоты (альгинаты) [2, 7]. Антациды могут применяться в качестве средства монотерапии при эпизодической изжоге, а также и как препараты выбора в составе комплексной терапии КЗЗ, поскольку они быстро устраняют симптомы заболевания [3, 7]. Среди группы антацидных средств выделяют всасывающиеся (натрия гидрокарбонат, магния оксид, магния карбонат и кальция карбонат) и невсасывающиеся препараты (алюминия фосфат, алюминия гидроксид, магния гидроксид, магния трисиликат и алюминиево-магниевые соединения, такие как алюминия магния гидроксид сульфат — магалдрат) [3, 8]. Магалдрат нейтрализует свободную соляную кислоту в желудке, не вызывая вторичную гиперсекрецию желудочного сока (феномен «кислотного рикошета») [8, 9], обладает цитопротективным [10, 11], обволакивающим и адсорбирующим действием, а также способен связывать желчные кислоты и лизолецитин [12, 13].

АО «Валента Фарм» разработало лекарственный препарат Антарейт[®], таблетки жевательные, 800 мг, действующим веществом которого является магалдрат. Так как разработанный препарат оказывает фармакологическое действие непосредственно в просвете

желудочно-кишечного тракта и не достигает системного кровотока, определить его концентрацию в крови не представляется возможным. В связи с этим для подтверждения биоэквивалентности разработанного препарата Антарейт[®], таблетки жевательные, 800 мг (АО «Валента Фарм», Россия) референтному препарату Риопан[®], таблетки жевательные, 800 мг (Такеда ГмбХ, Германия) было проведено исследование с фармакодинамической конечной точкой, отражающей изменение рН желудочного содержимого (площади под кривой «рН — время»).

Материалы и методы / Materials and methods

Исследование было проведено в соответствии с протоколом клинического исследования, принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, стандартами по Надлежащей Клинической Практике (ICH E6 (R2) GCP), а также в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации (РФ) и Евразийского экономического союза (ЕАЭС). До начала исследования было получено разрешение Министерства здравоохранения Российской Федерации на проведение клинического исследования № 352 от 07 июля 2021 г., одобрение Совета по этике при Министерстве здравоохранения Российской Федерации (выписка из протокола заседания № 278 от 22 июня 2021 г.), а также одобрение локальных этических комитетов исследовательских центров. Участие в исследовании являлось добровольным. До проведения каких-либо процедур исследования добровольцы подписывали информированное согласие и имели право отказаться от участия в исследовании в любой момент.

В исследование включались здоровые мужчины и женщины (отсутствие отклонений по данным предусмотренных протоколом клинических, лабораторных, инструментальных методов обследования) в возрасте от 18 до 45 лет европеоидной расы, которые соответствовали следующим критериям включения: значения рН желудка в диапазоне 1–3 по данным часовой рН-метрии в периоде скрининга, измеренные за 3 часа и более после последнего приёма пищи; систолическое артериальное давление (САД) в диапазоне от 100 до 139 мм рт. ст., диастолическое артериальное давление (ДАД) — от 60 до 89 мм рт. ст., частота сердечных сокращений (ЧСС) — от 60 до 90 уд. в мин; индекс массы тела (ИМТ) от 18,5 до 30 кг/м² при массе тела не менее 55 кг для мужчин и не менее 45 кг для женщин; некурящие (никогда не курили или бросили курить за 6 месяцев и ранее до прохождения скрининга); согласие добровольца использовать адекватные методы контрацепции на протяжении всего исследования.

Основными критериями невключения являлись: отягощённый аллергологический анамнез; лекарственная непереносимость действующего и/или вспомогательных веществ исследуемых лекарственных

препаратов; лекарственная непереносимость, повышенная чувствительность или аллергические реакции на лидокаин, ксилокаин или иные местные анестетики, используемые при проведении эзофагогастроудоденоскопии (ЭГДС); хронические заболевания сердечно-сосудистой, лимфатической, дыхательной, нервной, эндокринной, пищеварительной, опорно-двигательной, покровной, иммунной систем, а также мочеполового аппарата и органов кроветворения; заболевания пищевода, желудка и/или двенадцатиперстной кишки по данным ЭГДС на визите скрининга, а также по данным анамнеза, операции на пищеводе, желудке и/или двенадцатиперстной кишке в анамнезе; заболевания или состояния, которые могли повлиять на результаты рН-метрии; острые инфекционные заболевания менее чем за 4 недели до скрининга; приём антацидов (включая раствор пищевой соды), блокаторов H₂-гистаминовых рецепторов за 24 часа до скрининга; приём ИППЗ за 72 часа до скрининга; приём (включая однократный) стероидов и/или иных ульцерогенных препаратов менее чем за 4 недели до скрининга; регулярный приём любых лекарственных препаратов в течение 2 недель до скрининга; донорская сдача крови или плазмы менее чем за 3 месяца до скрининга; применение гормональных контрацептивов (у женщин) менее чем за 2 месяца до скрининга; беременность или период лактации; по-

ложительный тест на беременность для женщин с сохраненным репродуктивным потенциалом; приём более чем 10 ед. алкоголя (1 ед. алкоголя эквивалентна 330 мл пива, 150 мл вина или 40 мл крепких алкогольных напитков) в неделю в последний месяц до включения в исследование или анамнестические сведения об алкоголизме, наркомании, злоупотреблении лекарственными препаратами; положительный результат анализа крови на ВИЧ, *Treponema pallidum*, гепатит В и С; положительный анализ мочи на содержание наркотических и сильнодействующих веществ; положительный тест на содержание паров алкоголя в выдыхаемом воздухе или на алкоголь в слюне; искривление носовой перегородки, обструкция носоглотки, делающие невозможной установку зонда для рН-метрии; хронические запоры; тяжёлые челюстно-лицевые травмы в анамнезе.

Проведённое исследование по своему дизайну было открытым рандомизированным перекрёстным исследованием сравнительной фармакодинамики и фармакодинамической эквивалентности препарата Антарейт[®], таблетки жевательные, 800 мг и препарата Риопан[®], таблетки жевательные, 800 мг у здоровых добровольцев. Исследование состояло из периода скрининга, периодов исследования I и II, отмывочного периода и визита последующего наблюдения. Длительность каждого из периодов исследования фармакоди-

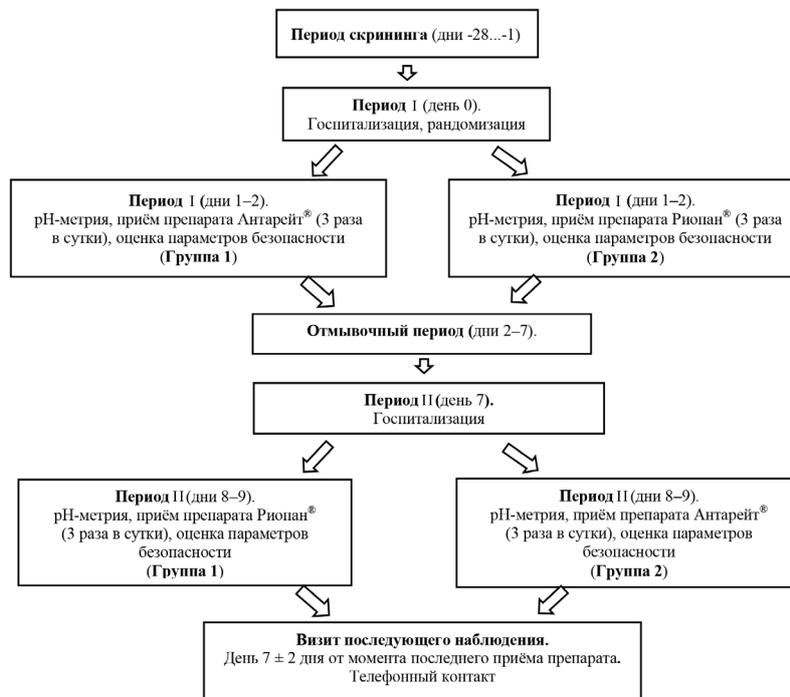


Рис. 1. Графическая схема исследования изучения фармакодинамики препаратов Антарейт[®] и Риопан[®]

Fig. 1. Graphical diagram of the study of the pharmacodynamics of Antareit[®] and Riopan[®] drugs

намики составляла 24 часа, отмывочный период между ними составлял 6 дней.

Всего было скринировано 46 добровольцев обоего пола, из которых 40 добровольцев были рандомизированы в 2 группы по 20 человек в зависимости от последовательности приёма исследуемого и референтного препаратов. В первом периоде исследования добровольцы из группы 1 (Антарейт® — Риопан®) принимали исследуемый препарат, а во втором периоде — референтный препарат. Добровольцы, рандомизированные в группу 2 (Риопан® — Антарейт®), принимали препараты в обратной последовательности: в первом периоде — референтный препарат, а во втором периоде — исследуемый препарат. На рис. 1 представлена графическая схема исследования.

В каждом из периодов исследования добровольцы принимали по 2 жевательных таблетки по 800 мг исследуемого или референтного препарата 3 раза в день (за 2 часа до каждого приёма пищи), запивая их негазированной водой.

За 1 час до первого приёма препарата в периодах I и II добровольцу устанавливали внутрижелудочный зонд для проведения рН-метрии. При этом электроды для рН-метрии располагались на расстоянии 5–10 см ниже нижнего пищеводного сфинктера. Измерение рН производилось при помощи гастроацидомонитора «Гастроскан-24» с частотой 1 измерение в секунду. Фиксировались значения рН перед приёмом (в течение 30 минут) и далее на протяжении 1 часа после приёма исследуемых препаратов. После регистрации результатов, через 1 час после последнего приёма препарата зонд извлекали.

Так как рН относится к физиологическим параметрам внутренней среды желудка, перед каждым приёмом исследуемых препаратов производилось измерение базального (исходного) значения рН в течение 5 минут, после чего рассчитывалась медиана от полученных значений. Это значение считалось исходным значением внутрижелудочного рН добровольца и использовалось в дальнейших расчётах.

Для анализа биоэквивалентности (фармакодинамической эквивалентности) использовалось специализированное программное обеспечение WinNonlin 8.3 (Pharsight® Corporation, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA), результаты анализа биоэквивалентности были сверены с результатами программы SAS версии 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). С целью описательной статистики исходных параметров и других зарегистрированных клинических данных была использована программа SAS с валированными алгоритмами выполнения статистических методов и необходимой документацией.

В качестве основного параметра для оценки фармакодинамической эквивалентности (биоэквивалентности) использовался показатель AUC_{pH} — площадь под фармакодинамической кривой «рН — время» в течение 1 часа после приёма исследуемого препарата/препарата

сравнения, рассчитанная с поправкой на исходный (до приёма препарата) уровень рН (AUC_{ABL} — площадь превышения рН над исходным значением (above the baseline)). Дополнительные фармакодинамические параметры включали: период времени на протяжении которого внутрижелудочное значение рН превышает 4,0; максимальное значение рН; минимальное значение рН; среднее (среднеквадратичное) значение рН; период времени на протяжении которого внутрижелудочное значение рН превышает 3,0; медиана времени для значений рН выше 3,0; медиана времени для значений рН выше 4,0. Гипотеза о не меньшей эффективности исследуемого препарата по сравнению с референтным препаратом подтверждалась, если нижняя граница 90 % доверительного интервала (ДИ) для отношения средних значений фармакодинамического параметра AUC_{ABL} была выше 80,00 %.

Оценка безопасности исследуемых препаратов проводилась на основании частоты и тяжести нежелательных явлений (НЯ), серьёзных нежелательных явлений (СНЯ), мониторинга изменений основных жизненно важных показателей (САД, ДАД, ЧСС, частоты дыхательных движений), температуры тела, изменения лабораторных показателей (клинический анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи), а также показателей электрокардиографии (ЭКГ).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Результаты / Results

Средний возраст добровольцев группы 1 составил $28,68 \pm 5,84$ лет, группы 2 — $28,5 \pm 5,7$ лет. При оценке антропометрических параметров значимых различий между добровольцами 1 и 2 групп не наблюдалось.

В статистический анализ фармакодинамики и фармакодинамической эквивалентности вошли данные рН-метрии 34 добровольцев (16 участников из группы 1 и 18 участников из группы 2), завершивших исследование в соответствии с протоколом. В данный анализ не были включены данные 6 добровольцев, выбывших из исследования досрочно, из которых один доброволец ни разу не принял препараты исследования, а у остальных 5 добровольцев отсутствовали данные одного из периодов исследования.

Средние значения параметра AUC_{ABL} — скорректированной площади под фармакодинамической кривой «рН — время (мин)» для исследуемого и референтного препаратов составили $111,503 \pm 102,357$ (диапазон 0 до 346,29) и $111,729 \pm 100,345$ (диапазон от 0 до 366,34), соответственно.

Средние значения максимального значения рН (rH_{max}), определяемого у добровольцев после приёма исследуемого препарата, составили $5,805 \pm 2,333$ (диапазон от 1,17 до 8,84), референтного препарата — $5,692 \pm 2,378$ (диапазон от 1,24 до 8,36).

В ходе сравнения фармакодинамических профилей исследуемого и референтного препаратов были показа-

Таблица 1

Результаты оценки фармакодинамической эквивалентности (биоэквивалентности) препаратов Антарейт® и Риопан®

Table 1

The results of the assessment of the pharmacodynamic equivalence (bioequivalence) of the drugs Antareit® and Riopan®

Параметр	Отношение средних значений (Т/Р), %	Нижняя граница 90 % ДИ	Верхняя граница 90 % ДИ	Мощность теста
AUC _{ABL}	100,02	80,55	119,49	51,85

Примечание: Т — исследуемый препарат; R — референтный препарат.
Note: T is the investigational product, R is the reference drug.

ны близкие значения времени достижения pH_{max} . Так, медианы времени достижения pH_{max} для исследуемого и референтного препаратов составили 22,5 и 19 мин, соответственно. При этом средние значения данного показателя составили $26,044 \pm 18,701$ мин и $24,691 \pm 19,335$ мин для исследуемого и референтного препаратов, соответственно.

Результаты проведённого исследования позволили подтвердить гипотезу не меньшей эффективности препарата Антарейт® по сравнению с препаратом Риопан®, так как 90 % ДИ для отношения средних значений фармакодинамического параметра AUC_{ABL} исследуемого препарата к референтному препарату не опускался ниже 80 % (90 % ДИ: 80,55–119,49) (табл. 1).

На рис. 2 представлен график, отражающий усреднённые значения pH после приёма препаратов Антарейт® и Риопан®.

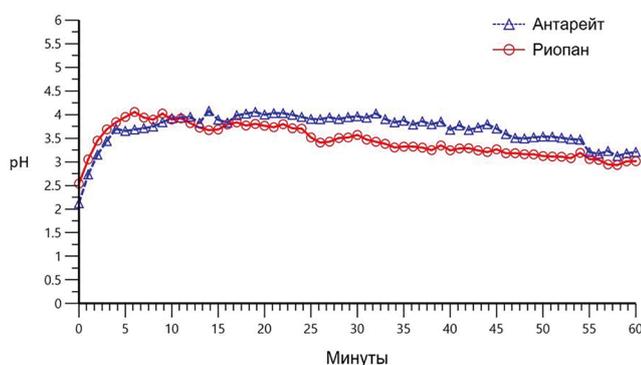


Рис. 2. Динамика показателей внутрижелудочного pH в течение 1 часа (средние значения за 1 минуту) добровольцев после приёма исследуемых препаратов Антарейт® и Риопан®

Fig. 2. Dynamics of intragastric pH values for 1 hour (average values for 1 minute) of volunteers after taking the studied drugs Antareit® and Riopan®

Проведённая оценка вторичных фармакодинамических точек показала отсутствие статистически значимых различий между препаратами (далее по тексту в квадратных скобках указаны значения 1 и 3 квартиля исследуемого параметра):

- % времени (в ходе всего периода наблюдения), в течение которого внутрижелудочное значение pH превышает 4,0, статистически значимо не отличался между препаратами ($p = 0,6414$) и составлял (медиана [Q1; Q3]): 50,78 % [23,49 %; 80,45 %] для препарата Антарейт® и 38,21 % [21,63 %; 79,84 %] для препарата Риопан®;

- максимальное значение pH статистически значимо не отличалось между препаратами ($p = 0,6506$) и составляло (медиана [Q1; Q3]): 7,01 [5,41; 7,66] для препарата Антарейт® и 6,9 [3,96; 7,85] для препарата Риопан®;

- минимальное значение pH статистически значимо не отличалось между препаратами ($p = 0,1898$) и составляло (медиана [Q1; Q3]): 1,01 [0,92; 1,23] для препарата Антарейт® и 1,08 [0,97; 1,33] для препарата Риопан®;

- среднее (среднеквадратичное) значение pH статистически значимо не отличалось между препаратами ($p = 0,5132$) и составляло ($M \pm SD$): $3,62 \pm 1,94$ для препарата Антарейт® и $3,43 \pm 1,82$ для препарата Риопан®;

- % времени (в ходе всего периода наблюдения), в течение которого внутрижелудочное значение pH превышает 3,0, статистически значимо не отличался между препаратами ($p = 0,1477$) и составлял (медиана [Q1; Q3]): 64,01 % [41,54 %; 90,47 %] для препарата Антарейт® и 43,02 % [23,60 %; 86,03 %] для препарата Риопан®;

- медиана времени, когда pH был выше 3,0, значимо не отличалась между препаратами ($p = 0,2016$) и составляла (медиана [Q1; Q3]): 38,42 [24,93; 54,30] мин для препарата Антарейт® и 25,82 [14,17; 51,63] мин для препарата Риопан®;

- медиана времени, когда pH был выше 4,0, значимо не отличалась между препаратами ($p = 0,6411$) и составляла (медиана [Q1; Q3]): 30,48 [14,10; 48,28] мин для препарата Антарейт® и 22,93 [12,98; 47,92] мин для препарата Риопан®.

В анализ безопасности вошли данные 39 рандомизированных добровольцев, которые получили хотя бы одну дозу исследуемого или референтного препарата (19 участников группы 1 и 20 участников группы 2).

На протяжении исследования было зарегистрировано 18 НЯ у 15,4 % (у 6 из 39) добровольцев в по-

пуляции безопасности. В число этих случаев вошли 10 НЯ у 15,79 % (у 3 из 19) добровольцев из группы 1 (Антарейт® — Риопан®) и 8 НЯ у 15 % (3 из 20) добровольцев из группы 2 (Риопан® — Антарейт®). При этом статистически значимых различий по частоте развития НЯ между группами выявлено не было ($p = 1,000$).

При анализе НЯ с учётом принятого препарата всего в ходе исследования при применении препарата Антарейт® было зарегистрировано 8 НЯ (44,44 % от общего количества НЯ), в то время как при применении препарата Риопан® — 10 НЯ (55,56 % от общего количества НЯ). Статистически значимых различий по частоте возникновения НЯ в зависимости от принятого препарата выявлено не было ($p = 0,815$).

За время проведения исследования не отмечалось серьёзных НЯ, случаев смерти или иных значимых НЯ. Только 1 НЯ (2,56 %) привело к досрочному выбыванию добровольца из исследования — случай коронавирусной инфекции COVID-19 (в группе 1). Данное НЯ было средней степени тяжести, при этом все остальные НЯ были лёгкой степени тяжести. Во всех случаях связь с приёмом препаратов исследования была оценена как неопределённая, все НЯ были связаны с процедурами исследования, помимо 1 НЯ — упомянутого случая коронавирусной инфекции COVID-19.

Наиболее частыми НЯ были: орофарингеальный дискомфорт в 3 случаях у 2 добровольцев из группы 1 (Антарейт® — Риопан®), а также 2 случая у 1 добровольца в группе 2 (Риопан® — Антарейт®); реакция в месте проведения процедуры в 2 случаях у 2 добровольцев в группе 1 и 3 случая у 2 добровольцев в группе 2. При анализе НЯ с учётом принятого препарата в ходе исследования при применении препарата Антарейт® было зарегистрировано 8 НЯ (44,44 % от общего количества НЯ), а при применении препарата Риопан® — 10 НЯ (55,56 % от общего количества НЯ). При этом статистически значимых различий по частоте возникновения НЯ в зависимости от принятого препарата выявлено не было ($p = 0,815$). Клинически значимых отклонений в результатах лабораторных показателей, ЭКГ и в других обследованиях не выявлено. Все выявленные отклонения от нормы были клинически не значимы и не были зарегистрированы как НЯ. Для всех случаев НЯ связь с приёмом препаратов исследования была оценена как неопределённая. Выявленные НЯ не потребовали действий со стороны и исследований и разрешились самостоятельно без каких-либо последствий для здоровья добровольцев.

Обсуждение / Discussion

При лечении КЗЗ одна из основных ролей отводится препаратам напрямую или опосредовано снижающим кислотность в желудке и ДПК. *Burget DW с соавт.* в 1990 г. опубликовали метаанализ в который вошли данные 144 клинических исследований, оценивающих влияния кислотности на эффективность терапии пептических язв. Авторами было показано, что при повышении и

поддержании pH на значении 3 и более на протяжении 18–20 часов в сутки в течение 3–4 недель происходит рубцевание пептических язв [14]. Данное наблюдение в последующем получило название «правила Бурже». Стоит также отметить, что значение pH в желудке при нормальных условиях не является постоянной величиной и может колебаться в пределах от 1,6 в теле желудка до 5,0 и более в антральном отделе [15]. Изучение связи pH с проявлениями ГЭРБ показало, что при высокой кислотности значительно чаще наблюдаются эрозивные формы заболевания. При этом у пациентов с ГЭРБ кислотность желудочного сока оказалась достоверно выше по сравнению со здоровыми добровольцами [16]. Кроме этого низкие значения pH оказывают влияние на моторно-эвакуационную функцию желудка и могут способствовать развитию гастроудоденального рефлюкса [17]. На основании вышеперечисленного, процессы кислотопродукции и кислотонейтрализации следует рассматривать в качестве патогенетических путей, воздействуя на которые можно влиять не только на проявления, но и течение КЗЗ.

В проведённом АО «Валента Фарм» клиническом исследовании была подтверждена фармакодинамическая эквивалентность препарата Антарейт®, таблетки жевательные, 800 мг (АО «Валента Фарм», Россия) и референтного препарата Риопан®, таблетки жевательные, 800 мг (Такеда ГмбХ, Германия). Согласно Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках ЕАЭС (Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85), установление фармакодинамической эквивалентности позволяет экстраполировать данные доклинических и клинических исследований референтного препарата на исследуемый препарат и подтвердить его безопасность и эффективность по зарегистрированным показаниям [18].

Заключение / Conclusion

В ходе исследования оценивалась динамика изменения pH в желудке после приёма лекарственного препарата Антарейт®, таблетки жевательные, 800 мг (АО «Валента Фарм», Россия) в сравнении с референтным препаратом Риопан®, таблетки жевательные, 800 мг (Такеда ГмбХ, Германия). На основании рассчитанных 90 % ДИ для отношения средних значений фармакодинамического параметра AUC_{ABL} исследуемого препарата к референтному препарату была подтверждена их фармакодинамическая эквивалентность. Оба препарата показали благоприятный и сопоставимый профиль безопасности.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы статьи являются сотрудниками фармацевтической компании АО «Валента

Фарм», исследовательских центров и биоаналитической лаборатории, на базе которых проводилось данное исследование. Статья опубликована при финансовой поддержке АО «Валента Фарм».

Conflict of interest. The authors of the article are employees of the pharmaceutical company “Valenta Pharm” JSC, research centers and bioanalytical laboratory, on the basis of which this study was conducted. The article was published with the financial support of “Valenta Pharm” JSC.

Участие авторов. Концепция и дизайн исследования — Глобенко А. А., Капашин А. В.; сбор и статисти-

ческая обработка данных — Захаров К. А., Василюк В. Б., Гончаров А. С., Гончаров И. С., Лосевич А. В., Григорьев А. В., Вербицкая Е. В.; написание текста — Пасько М. А., Капашин А. В.; редактирование — Капашин А. В., Глобенко А. А.

Participation of authors. Study concept and design — Globenko AA, Kapashin AV; data collection and statistical processing — Zakharov KA, Vasilyuk VB, Goncharov AS, Goncharov IS, Losevich AV, Grigorev AV, Verbitskaya EV; writing the manuscript — Pasko MA, Kapashin AV; editing — Kapashin AV, Globenko AA.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Захаров Константин Анатольевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0557-0382>
Заместитель управляющего ООО «НИЦ Эко-безопасность», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Konstantin A. Zakharov

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0557-0382>
Deputy Manager, Scientific Research Center Eco-Safety LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Василюк Василий Богданович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2503-4402>
SPIN-код: 1459-5548
Управляющий ООО «НИЦ Эко-безопасность», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Vasiliy B. Vasilyuk

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2503-4402>
SPIN code: 1459-5548
Manager, Scientific Research Center Eco-Safety LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Гончаров Александр Сергеевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-0480-0080>
Врач-терапевт ООО «Серта клиник», Москва, Российская Федерация

Alexander S. Goncharov

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-0480-0080>
Physician, Serta Clinic LLC, Moscow, Russian Federation

Гончаров Иван Сергеевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-4287-6358>
Врач-терапевт ООО «Серта клиник», Москва, Российская Федерация

Ivan S. Goncharov

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-4287-6358>
Physician, Serta Clinic LLC, Moscow, Russian Federation

Лосевич Анастасия Витальевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-7759-9751>
Врач-терапевт ЧУЗ «КБ «РЖД-Медицина», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Anastasia V. Losevich

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-7759-9751>
Physician, Clinical Hospital «RZD-Medicine», St. Petersburg, Russian Federation

Григорьев Александр Викторович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0327-8644>
Генеральный директор ООО «ЦКП «Аналитическая Спектрометрия», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Alexander V. Grigorev

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0327-8644>
General Director, CSU “Analytical Spectrometry”, St. Petersburg, Russian Federation

Вербицкая Елена Владимировна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3770-993X>
 Биомедицинский статистик ООО «ЦКП
 «Аналитическая Спектрометрия»,
 Санкт-Петербург, Российская Федерация

Elena V. Verbitskaya

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3770-993X>
 Biomedical statistician, CSU “Analytical Spectrometry”, St. Petersburg, Russian Federation

Глобенко Александр Александрович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>
 SPIN-код: 8135-0575
 Руководитель медицинского управления
 АО «Валента Фарм», Москва, Российская
 Федерация

Alexander A. Globenko

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>
 SPIN code: 8135-0575
 Head of the Medical Department, Valenta Pharm
 JSC, Moscow, Russian Federation

Капашин Алексей Валерьевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9437-0322>
 Руководитель группы разработки и анализа
 документов клинических исследований и
 регистрационных досье АО «Валента Фарм»,
 Москва, Российская Федерация

Aleksey V. Kapashin

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9437-0322>
 Head of the group for development and analysis of
 the clinical trial documents and registration dossi-
 ers, “Valenta Pharm” JSC, Moscow, Russian Federa-
 tion

Пасько Максим Андреевич

Автор, ответственный за переписку
 e-mail: Maksim.Pasko@valentapharm.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8518-3736>
 SPIN-код: 9153-0244
 Специалист группы разработки и анализа
 документов клинических исследований и
 регистрационных досье АО «Валента Фарм»,
 Москва, Российская Федерация

Maksim A. Pasko

Corresponding author
 e-mail: Maksim.Pasko@valentapharm.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8518-3736>
 SPIN code: 9153-0244
 Specialist of the group for development and analy-
 sis of the clinical trial documents and registration
 dossiers “Valenta Pharm” JSC, Moscow, Russian
 Federation

Список литературы / References

1. Полунина Т.В. Комбинированная терапия кислотозависимых заболеваний. *РМЖ*. 2013;21(13):691–697.

Polunina TV. Combination therapy for acid-related diseases. *RMJ*. 2013;21(13):691–697. (In Russ.).

2. Диагностика и лечение кислотозависимых заболеваний пищеварительного тракта: Руководство для врачей / И.Ю. Колесникова, В.С. Волков. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2014. 432 с. (In Russ.).

Diagnostika i lechenie kislotozavisimyh zabolevanij pishchevaritel'nogo trakta: Rukovodstvo dlya vrachej / IYu Kolesnikova, VS Volkov. Moscow: Publishing House “Medical Information Agency” LLC, 2014. (In Russ.).

3. Вьючнова Е.С., Никушкина И.Н., Одинцова А.Н., и др. Современные представления о роли антацидных препаратов в лечении кислотозависимых заболеваний. *Доказательная гастроэнтерология*. 2014;3(3):73–75.

Vyuchnova ES, Nikushina IN, Odintsova AN, et al. The current concepts of the role of antacid preparations in the treatment of acid-dependent diseases. *Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology*. 2014;3(3):73–75. (In Russ.).

4. GBD 2017 Gastro-oesophageal Reflux Disease Collaborators. The global, regional, and national burden of gastro-oesophageal reflux disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jun;5(6):561–581. DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30408-X.

5. Ушкалова Е.А. Клиническая фармакология современных антацидов. *Фарматека*. 2006;126(11):1–6.

Ushkalova EA. Clinical pharmacology of modern antacids. *Farmateka*. 2006;126(11):1–6. (In Russ.).

6. Бордин Д.С., Абдулхаков Р.А., Осипенко М.Ф., и др. Многоцентровое исследование распространенности симптомов гастроэзофагеальной рефлюксной болезни у пациентов поликлиник в России. *Терапевтический архив*. 2022;94(1):48–56. DOI: 10.26442/00403660.2022.01.201322.

Bordin DS, Abdulkhakov RA, Osipenko MF, et al. Multicenter study of gastroesophageal reflux disease symptoms prevalence in outpatients in Russia. *Terapevticheskii Arkhiv (Ter. Arkh.)*. 2022;94(1):48–56. DOI: 10.26442/00403660.2022.01.2013227.

7. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Трухманов А.С., и др. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2020;30(4):70–97. DOI: 10.22416/1382-4376-2020-30-4-70-97.

Ivashkin VT, Maev IV, Trukhmanov AS, et al. Recommendations of the Russian Gastroenterological Association in Diagnosis and Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2020;30(4):70–97. (In Russ.). DOI: 10.22416/1382-4376-2020-30-4-70-97.

8. Булгаков С.А. Клиническое применение антацида магалдрат в лечении кислотозависимых заболеваний. *Доказательная гастроэнтерология*. 2019;8(3):38–44. DOI: 10.17116/dokgastro2019803138.

Bulgakov SA. Clinical application of magaldrate antacid in the treatment of acid-dependent diseases. *Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology*. 2019;8(3):38–44. (In Russ.). DOI: 10.17116/dokgastro2019803138

9. Громова О.А., Торшин И.Ю., Максимов В.А. Магалдрат как антацид с мультитаргетным воздействием: клинико-фармакологическое эссе. *Лечащий Врач*. 2018;(2):67–73.

- Gromova OA, Torshin IYu, Maksimov VA. Magaldrate as an antiacid with multi-target effect: clinical-pharmacological essay. *Lechaschi Vrach*. 2018;(2):67. (In Russ.).
10. Schmidt C, Baumeister B, Kipnowski J, Miederer SE, Vetter H. Magaldrate stimulates endogenous prostaglandin E2 synthesis in human gastric mucosa *in vitro* and *in vivo*. *Hepatogastroenterology*. 1998 Nov-Dec;45(24):2443–2446.
11. Borella LE, DiJoseph JF, Mir GN. Cytoprotective and antiulcer activities of the antiacid magaldrate in the rat. *Arzneimittelforschung*. 1989 Jul;39(7):786–789. PMID: 2783181.
12. Baur C, Becker A, Linder R, Schwan T. Zur Neutralisationskapazität, Pepsin-Inaktivierung sowie Gallensäure- und Lysolecithin-Bindung des Antazidums Magaldrat [Neutralizing capacity, pepsin inactivation and binding to bile acids and lysolecithin of the antiacid magaldrate (author's transl)]. *Arzneimittelforschung*. 1981;31(3):504–507. German.
13. McCafferty DF, Woolfson AD. A comparative assessment of a new antiacid formulation based on magaldrate. *J Clin Hosp Pharm*. 1983 Dec;8(4):349–355. DOI: 10.1111/j.1365-2710.1983.tb01058.x.
14. Burget DW, Chiverton SG, Hunt RH. Is there an optimal degree of acid suppression for healing of duodenal ulcers? A model of the relationship between ulcer healing and acid suppression. *Gastroenterology*. 1990 Aug;99(2):345–351. DOI: 10.1016/0016-5085(90)91015-x.
15. Трухманов А.С., Сторонова О.А., Ивашкин В.Т. Клиническое значение 24-часовой рН-метрии в диагностике и оценке эффективности лекарственных препаратов у больных с заболеваниями пищевода и желудка. *Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол* 2016;26(6):55–68. DOI: 10.22416/1382-4376-2016-6-55-68.
- Trukhmanov AS, Storonova OA, Ivashkin VT. Clinical impact of 24-hour pH-metry in esophageal and stomach diseases diagnostics and pharmacological drugs efficacy testing. *Ross z gastroenterol gepatol koloproktol*. 2016; 26(6): 55–68 (In Russ.). DOI: 10.22416/1382-4376-2016-6-55-68.
16. Опарин А.А., Лаврова Н.В., Корниенко Д.А. Особенности моторно-секреторных нарушений при различных формах гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Вестник проблем биологии и медицины*. 2013;1(3):131–133.
- Опарин АА, Лаврова НВ, Корниенко ДА. Features of Motility and Secretary Disorders in Different Forms of Gastroesophageal Reflux Disease. *Bulletin of problems in biology and medicine*. 2013;1(3):131–133. (In Russ.).
17. Галиев Ш.З., Амиров Н.Б., Ахметов Т.Р., и др. Характер морфологических изменений слизистой оболочки желудка при дуоденогастральном рефлюксе: взаимосвязь с кислотностью и helicobacter pylori. *Уральский медицинский журнал*. 2018;(2):91–96.
- Galiev ShZ, Amirov NB, Akhmetov TR, et al. Morphological changes of the gastric mucosa in patients with duodenogastic reflux: relationship with acidity and helicobacter pylori. *Ural Medical Journal*. 2018;(2):91–96. (In Russ.).
18. Решение Совета Евразийской Экономической Комиссии № 85 от 03.11.2016 «Об утверждении правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».
- Decision of Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016 No. 85 «About approval of Rules of carrying out researches of bioequivalence of medicines within the Eurasian Economic Union» (In Russ.).

Фармакокинетика димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 у крыс. Часть 2. Кинетика распределения в органах и тканях

Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бочков П. О., Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Поварнина П. Ю., Жердев В. П.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Для внедрения соединения ГК-2 в клиническую практику необходимо провести доклиническое изучение его фармакокинетики, в частности, распределение исследуемого лекарственного средства (ЛС) в органах и тканях. **Цель** — изучение тканевой доступности нового оригинального соединения ГК-2 у крыс после его внутрибрюшинного введения. **Методы.** Количественное определение ГК-2 в плазме крови и гомогенатах органов/тканей крыс проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. **Результаты.** На крысах изучено распределение ГК-2 в органах и тканях, имеющих различную степень васкуляризации. Установлено, что после однократного внутрибрюшинного введения ГК-2 в дозе 150 мг/кг исследуемое соединение регистрировалось в плазме крови на протяжении 2 ч, период полувыведения ($t_{1/2el}$) его составил 0,4 ч. В органах и тканях ГК-2 детектировался от 1,5 до 2 ч. Тканевая доступность ГК-2 в системе «печень — плазма крови» составила 18,68; «почки — плазма крови» — 1,26; «селезёнка — плазма крови» — 0,68; «скелетные мышцы — плазма крови» — 0,31. Для органа-мишени — головного мозга — тканевая доступность составила 0,24. В головном мозге время достижения максимальной концентрации ГК-2 (0,77 мкг/г) составляло 0,34 ч. Установлено, что ГК-2 медленнее выводится из головного мозга ($t_{1/2el}$ составил 0,75 ч), чем из других органов и тканей (от 0,31 ч для селезёнки и до 0,47 ч для почек).

Ключевые слова: фактор роста нервов; димерный дипептидный миметик ГК-2; доклиническая фармакокинетика; высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия

Для цитирования:

Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бочков П. О., Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Поварнина П. Ю., Жердев В. П. Фармакокинетика димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 у крыс. Часть 2. Кинетика распределения в органах и тканях. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):41–47. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-41-47>

Поступила: 02.10.2023. **В доработанном виде:** 09.11.2023. **Принята к печати:** 19.11.2023. **Опубликована:** 30.12.2023.

Pharmacokinetics of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor GK-2 in rats. Part 2. Kinetics of distribution in organs and tissues

Gennadiy B. Kolyvanov, Alexander A. Litvin, Oxana Yu. Kravtsova, Oxana G. Gribakina, Pavel O. Bochkov, Polina Yu. Povarnina, Vladimir P. Zherdev

Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. To introduce the GK-2 compound into clinical practice, it is necessary to conduct a preclinical study of its pharmacokinetics, in particular, the distribution of the studied drug in organs and tissues. **The aim** is to study the tissue availability of a new original compound GK-2 in rats after its intraperitoneal administration. **Methods.** Quantitative determination of GK-2 in blood plasma and organ/tissue homogenates of rats was carried out by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. **Results.** The distribution of GK-2 in organs and tissues with varying degrees of vascularization was studied in rats. It was found that after a single intraperitoneal injection of GK-2 at a dose of 150 mg/kg, the studied compound was recorded in blood plasma for 2 hours, its half-life ($t_{1/2el}$) was 0.4 hours. In organs and tissues, GK-2 was detected from 1.5 to 2 hours. The tissue availability of GK-2 in the liver — blood plasma system was 18.68; "kidneys — blood plasma" — 1.26; "spleen — blood plasma" — 0.68; "skeletal muscles — blood plasma" — 0.31. For the target organ, the brain, the tissue availability was 0.24. In the brain, the time to reach the maximum concentration of GK-2 (0.77 mcg/g) was 0.34 hours. It was found that GK-2 is excreted more slowly from the brain ($t_{1/2el}$ was 0.75 h) than from other organs and tissues (from 0.31 h for the spleen and up to 0.47 h for the kidneys).

Keywords: nerve growth factor; dimeric dipeptide mimetic GK-2; preclinical pharmacokinetics; high-performance liquid chromatography-mass spectrometry

For citations:

Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Kravtsova OYu, Gribakina OG, Povarnina PYu, Zherdev VP. Pharmacokinetics of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor GK-2 in rats. Part 2. Kinetics of distribution in organs and tissues. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):41–47. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-41-47>

Received: 02.10.202. **Revision received:** 09.11.2023. **Accepted:** 19.11.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

Острые нарушения мозгового кровообращения являются ведущей причиной смертности и инвалидизации. В РФ инсульт ежегодно развивается более чем у 450 тыс. человек, летальный исход в остром периоде заболевания составляет до 35 % случаев [1].

Новым перспективным направлением лечения острых нарушений мозгового кровообращения явля-

ется разработка лекарственных средств (ЛС) на основе эндогенных белков — нейротрофинов, вовлечённых как в нейропротекцию, так и в нейрорегенерацию, что может обеспечить их эффективность даже при отставленном начале введения [2]. Наиболее хорошо изученный белок этого семейства — фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF). Однако полноразмерные нейротрофины подвергаются быстрой деградации в биологических жидкостях (период полужизни 2–3 мин)

и слабо проникают через гематоэнцефалический барьер, поэтому во всём мире разрабатываются низкомолекулярные миметики нейротрофинов с оптимальными фармакокинетическими характеристиками [3].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (реорганизован в 2023 году в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий») под руководством академика РАН *Середенина С.Б.* и член-корреспондента РАН *Гудашевой Т.А.* на основе гипотезы о ключевой роли наиболее экспонированных чаще всего центральных дипептидных фрагментов β -изгибов петлеобразных структур нейротрофинов создан димерный дипептидный миметик четвертой петли NGF гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизин) с рабочим шифром ГК-2 [4]. Дипептид ГК-2 проявлял нейропротекторную активность на ряде клеточных моделей в интервале концентраций 10^{-5} – 10^{-9} М [5, 6]. Нейропротекторной активностью ГК-2 обладал также и в экспериментах *in vivo* при системном введении [7–10]. Так, в условиях окклюзии средней мозговой артерии у крыс ГК-2 снижал объём повреждения мозга с эффективностью до 60 % и улучшал функциональное состояние, в том числе при отставленном на 24 ч начале введения [11].

Для дальнейшего продвижения соединения ГК-2 в клиническую практику необходимо провести доклиническое изучение его фармакокинетики, в частности распределение исследуемого ЛС в органах и тканях [12]. Поэтому целью данного исследования стало изучение тканевой доступности (f_T) нового оригинального соединения ГК-2 у крыс после его внутрибрюшинного (в/б) введения.

Материалы и методы / Materials and methods

Для проведения фармакокинетических исследований использовали фармацевтическую субстанцию ГК-2 (серия—СН-13-88) (рис. 1), синтезированную в отделе химии лекарственных средств, в лаборатории пептидных биорегуляторов «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» как описано [13].

Тестируемое вещество вводили в/б белым беспородным крысам-самцам в возрасте 10 недель мас-

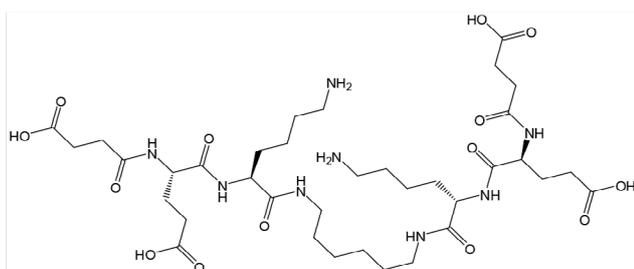


Рис. 1. Структурная формула соединения ГК-2
Fig. 1. Structural formula of the compound GK-2

сой 180–220 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская обл.). Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», межгосударственными стандартами серии «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 (Приложение А к Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123)). Проведение экспериментов было одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (реорганизован в 2023 году в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»).

Для количественного определения ГК-2 в различных органах/тканях и в первую очередь органе-мишени — головном мозге, вещество вводили в/б в виде водного раствора в дозе 150 мг/кг. Содержание ГК-2 определяли в плазме крови, печени, селезёнке, скелетной мышце, почках и головном мозге до введения ЛС (контроль) и через 5, 10, 20 и 30 мин и 1,0; 1,5; 2,0 ч после введения. На каждую дискретную точку использовали по 5 животных.

Образцы тканей и органов получали после декапитации животных. Отбор образцов крови производили в пробирки, предварительно обработанные 5 % водным раствором калиевой соли ЭДТА. Органы промывали дистиллированной водой, просушивали фильтровальной бумагой и замораживали без добавления консервантов. Для подготовки образцов к анализу использовали метод преципитации белков крови с последующим отделением органической фазы от водной. Определение ГК-2 в плазме крови и гомогенатах органов и тканей проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Нижний предел количественного определения составил 5 нг/мл гомогената органа/ткани [14].

Основные фармакокинетические характеристики ГК-2 рассчитаны модельно-независимым методом [15]:

AUC_{0-t} [мкг/мл · ч] — площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой концентрация препарата — время) рассчитывается от момента введения до последнего временного интервала отбора проб; $AUC_{0-\infty}$ рассчитывается от момента введения до бесконечности;

C_{max} [мкг/мл] — максимальная концентрация исследуемого ЛС в плазме крови/ткани после в/б введения;

T_{max} (ч) — время достижения максимальной концентрации ЛС в ткани после в/б введения;

MRT (ч) — среднее время удерживания ЛС в организме;

k_{el} (ч⁻¹) — константа скорости элиминации, параметр, характеризующий скорость выведения ЛС из организма;

$t_{1/2el}$ (ч) — период, за который выводится половина введённой дозы ЛС;

Cl/F (л/ч/кг) — плазменный клиренс после в/б введения;

V_d/F (л/кг) — кажущийся объём распределения после в/б введения.

f_T — тканевая доступность — величина, характеризующая интенсивность распределения вещества в органах и тканях, рассчитывается по формуле:

$$f_T = AUC_{T0-t} / AUC_{P0-t}, \text{ или } AUC_{T0-\infty} / AUC_{P0-\infty},$$

где AUC_{T0-t} , $AUC_{T0-\infty}$ — AUC в ткани, AUC_{P0-t} , $AUC_{P0-\infty}$ — AUC в плазме крови [12].

Результаты и их обсуждение / Results and discussion

Усреднённые фармакокинетические кривые ГК-2 в плазме крови крыс после в/б введения в дозе 150 мг/кг представлены на рис. 2, соответствующие фармакокинетические параметры в табл. 1.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры ГК-2 в плазме крови крыс после однократного в/б введения в дозе 150 мг/кг

Table 1

Pharmacokinetic parameters of GK-2 in rat blood plasma after a single intravenous administration at a dose of 150 mg/kg

Параметры	Единицы измерения	Значение
C_{max}	МКГ/МЛ	8,27
T_{max}	ч	0,08
AUC_{0-t}	МКГ/МЛ×Ч	3,51
$AUC_{0-\infty}$	МКГ/МЛ×Ч	3,63
k_{el}	ч ⁻¹	1,793
$t_{1/2el}$	ч	0,39
MRT	ч	0,54
V_d/F	Л/КГ	24,05
Cl/F	Л/Ч/КГ	42,74

Установлено, что после в/б введения ГК-2 крысам в дозе 150 мг/кг исследуемое вещество определялось в плазме крови на протяжении 2 ч. Максимальная концентрация (C_{max}) в плазме крови регистрировалась через 0,08 ч (T_{max}) после введения ГК-2, а её величина составила 8,27 мкг/мл. Снижение концентраций ГК-2 в плазме крови носило монэкспоненциальный характер. Период полувыведения ЛС ($t_{1/2el}$) составил 0,39 ч, величина MRT равнялась 0,54 ч, что позволяет отнести ГК-2 к «короткоживущим» ЛС.

Величина кажущегося объёма распределения (V_d/F) ГК-2 составила 24,05 л/кг. Данный параметр обычно не эквивалентен анатомическому объёму, а отражает распределение исследуемого вещества и степень его связывания в организме. Так, если ЛС связывается преимущественно белками крови, кажущийся объём распределения будет меньше, чем реальный. С другой стороны, преимущественное связывание ЛС во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения V_d/F над реальным объёмом [16]. В нашем случае, расчёт величины V_d/F дал высокие значения, указывающие, что ГК-2 распределяется во внесосудистом пространстве (плазма крови, ткани) животных.

Важным этапом при проведении фармакокинетических исследований является изучение тканевой доступности новых ЛС. Основным результатом процессов распределения является транспорт ЛС в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект препарата. На основании определения величины тканевой доступности возможна количественная оценка интенсивности проникновения действующего вещества в периферические ткани [12].

Усреднённые фармакокинетические профили ГК-2 в органах/тканях крыс после однократного в/б введения в дозе 150 мг/кг представлены на рис. 2, соответствующие фармакокинетические параметры — в табл. 2.

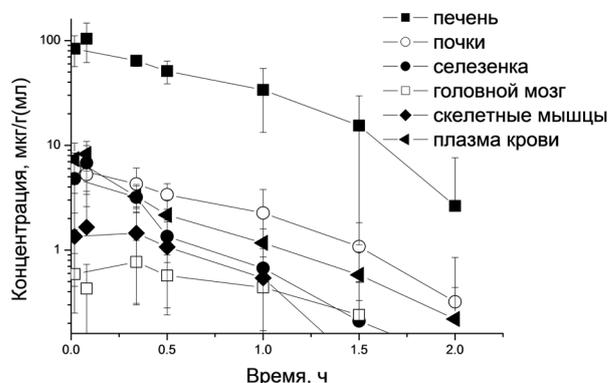


Рис. 2. Усреднённые фармакокинетические кривые ГК-2 в тканях органов и плазме крови крыс после его однократного в/б введения в дозе 150 мг/кг (среднее ± SD, n = 5)

Fig. 2. Averaged pharmacokinetic curves of GK-2 in organ tissues and blood plasma of rats after its single intravenous administration at a dose of 150 mg / kg (mean ± SD, n = 5)

Установлено, что ГК-2 регистрировался во всех изученных органах/тканях в течение 1,5–2,0 ч, при этом в распределении ЛС прослеживалась значительная гетерогенность. Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) ГК-2 в исследуемых органах и тканях колебалось от 0,08 ч в печени, селезенке и скелетных мышцах, 0,17 ч — в почках и до 0,34 ч — в головном мозге. Максимальная концентрация (C_{max}) ГК-2 возрастала в ряду головной мозг — скелетные

Таблица 2

Фармакокинетические параметры ГК-2 в различных органах/ тканях крыс после его однократного в/б введения в дозе 150 мг/кг

Table 2

Pharmacokinetic parameters of GK-2 in different organs/tissues of rats after its single intravenous administration at a dose of 150 mg/kg

Параметры	Органы и ткани				
	Печень	Почки	Селезёнка	Головной мозг	Скелетные мышцы
C_{max} (мкг/г)	104,24	5,96	6,79	0,77	1,65
T_{max} (ч)	0,08	0,17	0,08	0,34	0,08
AUC_{0-t} (мкг/г×ч)	72,464	4,793	2,637	0,708	1,198
k_{el} (ч ⁻¹)	1,698	1,473	2,213	0,928	2,007
$AUC_{0-\infty}$ (мкг/г)×ч)	74,019	5,010	2,677	0,967	1,238
$t_{1/2el}$ (ч)	0,41	0,47	0,31	0,75	0,35
MRT (ч)	0,65	0,73	0,44	1,17	0,68
f_T	18,68	1,26	0,68	0,24	0,31

мышцы — почки — селезёнка — печень (0,77; 1,65; 5,96; 6,79; 104,24 мкг/г, соответственно). Снижение концентраций ЛС носило моноэкспоненциальный характер.

Анализ величин f_T ГК-2 показал, что исследуемое соединение наиболее интенсивно распределялось в хорошо васкуляризованных органах (печень, почки, селезёнка) и в значительно меньшей степени — в умеренно и слабо васкуляризованных органах (головной мозг, скелетные мышцы) (рис. 3). Тканевая доступность ГК-2 в системе «печень — плазма

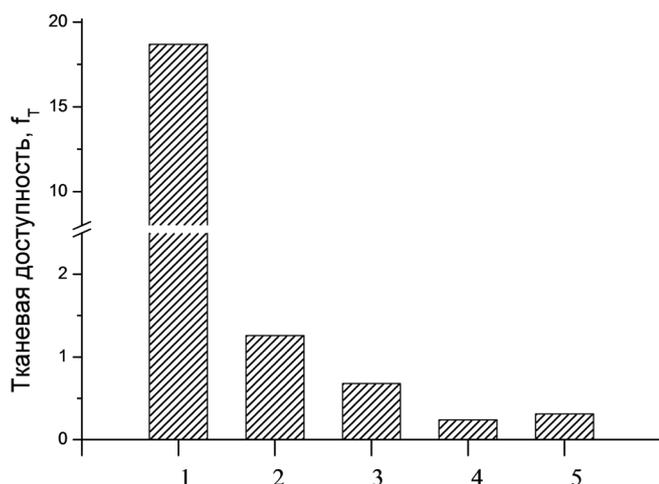


Рис. 3. Тканевая доступность ГК-2 в органах/тканях крыс после однократного в/б введения в дозе 150 мг/кг: 1 — печень, 2 — почки, 3 — селезёнка, 4 — головной мозг, 5 — скелетные мышцы

Fig. 3. Tissue availability of GK-2 in rat organs / tissues after a single IV injection at a dose of 150 mg/kg: 1 — liver, 2 — kidneys, 3 — spleen, 4 — brain, 5 — skeletal muscles

крови» составила 18,68; «почки — плазма крови» — 1,26. Следует отметить, что f_T ГК-2 в таком органе, как селезёнка была в 27,5 раза ниже по сравнению с органом, обеспечивающим элиминацию, — печенью. Для системы «селезёнка — плазма крови» этот показатель составил 0,68. Для скелетных мышц — 0,31. Для органа-мишени (головного мозга) — 0,24. Согласно результатам ранее проведённых фармакокинетических исследований коротких пептидных соединений величина f_T ГК-2 в мозге была самой высокой. Так, в частности, f_T димерного дипептида ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина)) составила 0,05 (доза 150 мг/кг, внутривенное введение). Более того, значение f_T активного метаболита линейного замещённого дипептида ГЗК-111 (этиловый эфир N-фенилацетилглицил-L-пролина) цикло-L-пролилглицина — 0,003 (доза 20 мг/кг, внутрижелудочное введение) [17, 18].

Установлено, что ГК-2 выводится из органа-мишени медленнее ($t_{1/2el}$ для головного мозга составил 0,75 ч), чем из других органов и тканей (от 0,31 ч для селезёнки и до 0,47 ч для почек). Аналогичную зависимость наблюдали и для среднего времени удерживания.

Заключение / Conclusion

1. После однократного внутрибрюшинного введения ГК-2 в дозе 150 мг/кг в органах и тканях крыс определялся на протяжении 1,5–2 ч. Период полувыведения ГК-2 составил 0,31–0,75 ч.

2. Дипептид ГК-2 проникал через гематоэнцефалический барьер, определялся в головном мозге на протяжении 1,5 ч. Тканевая доступность в органе-мишени составила 0,24.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Authors' participation. All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Financing. The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Колыванов Геннадий Борисович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>
SPIN-код: 2538-8639

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация

Литвин Александр Алексеевич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: litbiopharm@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>
SPIN-код: 6193-5770

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация

Кравцова Оксана Юрьевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>
SPIN-код: 1733-2330

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация

Грибакина Оксана Геннадьевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>
SPIN-код: 6266-8161

к. б. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация

Бочков Павел Олегович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8555-5969>
SPIN-код: 5576-8174

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация

Gennadiy B. Kolyvanov

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>
SPIN code: 2538-8639

Dr. Sci. in Biology, leading researcher of the labora-
tory of pharmacokinetics Federal Research Center
for Innovator and Emerging Biomedical and Phar-
maceutical Technologies, Moscow, Russian Federa-
tion

Alexander A. Litvin

Corresponding author

e-mail: litbiopharm@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>
SPIN code: 6193-5770

Dr. Sci. in Biology, Leading researcher of the
laboratory of pharmacokinetics Federal Research
Center for Innovator and Emerging Biomedical and
Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian
Federation

Oxana Yu. Kravtsova

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>
SPIN code: 1733-2330

PhD, Cand. Sci. (Biology), senior research scien-
tist of the laboratory of pharmacokinetics Federal
Research Center for Innovator and Emerging Bio-
medical and Pharmaceutical Technologies,
Moscow, Russian Federation

Oxana G. Gribakina

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>
SPIN code: 6266-8161

PhD, Cand. Sci. (Biology), research scientist of the
laboratory of pharmacokinetics Federal Research
Center for Innovator and Emerging Biomedical and
Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian
Federation

Pavel O. Bochkov

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8555-5969>
SPIN code: 5576-8174

PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Officer
of laboratory pharmacokinetics Federal Research
Center for Innovator and Emerging Biomedical and
Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian
Federation

Поварнина Полина Юрьевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
 SPIN-код: 5498-6724

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Жердев Владимир Павлович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>
 SPIN-код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Polina Yu. Povarnina

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
 SPIN code: 5498-6724

PhD, Cand. Sci. (Biology), senior researcher of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of Drug Chemistry, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Vladimir P. Zherdev

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>
 SPIN code: 2213-9592

Dr. Sci. (Med.), professor, Head of laboratory pharmacokinetics Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Пирадов М.А. Инсульт : пошаговая инструкция / Пирадов М.А., Максимова М.Ю., Танащян М.М. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 272 с.
 Piradov MA. Insult : Poshagovaya instruktsiya. Piradov MA, Maximova MYu, Tanashyan MM. Moscow: GEOTAR-Media. 2019. (In Russ.).
2. Sims SK, Wilken-Resman B, Smith CJ, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Nerve Growth Factor Therapeutics for Brain Injury: The Current Translational Challenges in Preclinical and Clinical Research. *Neural Plast.* 2022 Mar 2;2022:3889300. DOI: 10.1155/2022/3889300.
3. Skaper SD. Peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *Curr Pharm Des.* 2011;17(25):2704–2718. DOI: 10.2174/138161211797415995.
4. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Патент РФ. 2011. № 2410392. Дипептидные миметики нейротрофинов ngf и bdnf. Доступно по: <http://allpatents.ru/patent/2410392.html> Ссылка активна на 15.09.2023
5. Seredenin SB, Gudashева TA. Patent RF. 2011. № 2410392. Dipeptidnye mimetiki nejrotrofinov ngf i bdnf. (In Russ.). Доступно по: <http://allpatents.ru/patent/2410392.html> Ссылка активна на 15.09.2023.
6. Gudashева TA, Povarnina PY, Tarasiuk AV, Seredenin SB. Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties. *Med Res Rev.* 2021 Sep;41(5):2746–2774. DOI: 10.1002/med.21721.
7. Gudashева TA, Logvinov IO, Nikolaev SV, et al. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC- γ 1. *Dokl Biochem Biophys.* 2020 Sep;494(1):244–247. DOI: 10.1134/S1607672920050075.
8. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Исследование in vitro нейропротективных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов ГК-2. *Бюлл. экп. биол. мед.* 2010;150(11):537–540.
9. Antipova TA, Gudashева TA, Seredenin SB. In vitro study of neuroprotective properties of GK-2, a new original nerve growth factor mimetic. *Bull Exp Biol Med.* 2011;150(5):607–609. (In Russ.).
10. Середенин С.Б., Романова Г.А., Гудашева Т.А. и др. Нейропротективное и антиамнестическое действие дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга. *Бюлл. экп. биол. мед.* 2010;150(10):406–409. DOI: 10.1007/s10517-011-1161-y.
11. Seredenin SB, Romanova GA, Gudashева TA, et al. Neuroprotective and anti-amnesic effect of nerve growth factor dipeptide mimetic GK-2 in experimental ischemic infarction of brain cortex. *Bull Exp Biol Med.* 2011 Feb;150(4):432–435. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-011-1161-y.
12. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н., и др. Нейропротекторные эффекты димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 на модели двусторонней необратимой перевязки сонных артерий у крыс. *Экспер. и клин. фармакол.* 2012;75(9):15–20. DOI: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-15-20.
13. Povarnina PYu, Gudashева TA, Vorontsova ON, et al. Neuroprotective effects of a dipeptide mimetic on the GK-2 nerve growth factor in model of permanent common carotid artery occlusion in rats. *Exper Clin Pharmacol.* 2012;75(9):15–20. (In Russ.). doi: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-15-20.
14. Заржецкий Ю.В., Аврущенко М.Ш., Мороз В.В., и др. Эффективность миметика фактора роста нервов ГК-2 для предупреждения постреанимационных изменений мозга. *Бюлл. экп. биол. мед.* 2015;159(4):442–445. DOI: 10.1007/s10517-015-2989-3.
15. Zarzhetskiy YuV, Avruschenko MSh, Moroz VV, et al. Effectiveness of GK-2, a Nerve Growth Factor Mimetic, in Preventing Post-Resuscitation Changes in the Brain. *Bull Exp Biol Med.* 2015 Aug;159(4):453–455. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-015-2989-3.
16. Середенин С.Б., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А. Экспериментальная оценка терапевтического окна нейропротективной активности препарата ГК-2, низкомолекулярного миметика фактора роста нервов. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2018;118(7):49–53. DOI: 10.17116/jnevro20181187149.
17. Seredenin SB, Povarnina PYu, Gudashева TA. An experimental evaluation of the therapeutic window of the neuroprotective activity of a low-molecular nerve growth factor mimetic GK-2. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova.* 2018;118(7):49–53. (In Russ.). DOI: 10.17116/jnevro20181187149.
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. *Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики новых лекарственных средств* / Миронов А. Н. (ред.). М.: Гриф и К, 2012. С. 865–880.
19. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. *Metodicheskie rekomendacii po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij farmakokinetiki novykh lekarstvennykh sredstv.* Mironov AN (ed.). Moscow: Grif and K, 2012. P. 865–880. (In Russ.).
20. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. *Докл. акад. наук.* 2010;4(1):6549–6552. DOI: 10.1134/S160767291005011X.
21. Antipova TA, Gudashева TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Dokl Biochem Biophys.* 2010 Sep-Oct;434:262–265. (In Russ.). DOI: 10.1134/S160767291005011X.
22. Литвин А.А., Кольванов Г.Б., Блынская Е.В. и др. Количественное определение гексаметилендиаминдиамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) в плазме крови с использованием ВЭЖХ-МС. *Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия.* 2019;60(3):194–197.
23. Litvin AA, Kolyvanov GB, Blynskaya EV, et al. Quantification of hexamethylenediamine diamide bis-(N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine) in the blood plasma by HPLC-MS. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 2. Khimia.* 2019;60(3):194–197. (In Russ.).

15. Агафонов А.А., Пиотровский В.К. Программа M-ind системы параметров фармакокинетики модельно-независимым методом статистических моментов. *Хим.-фарм. журн.* 1991;10:16–19.

Agafonov AA, Piotrovskiy VK. The M-ind program of the system of pharmacokinetics parameters by the model-independent method of statistical moments. *Chem.-pharm. Journal.* 1991;10:16–19. (In Russ.).

16. Сергиенко В. И., Желлиф Р., Бондарева И. Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение М.: Издательство РАМН, 2003. 302 с.

Sergienko VI, Gelliff R, Bondareva IB. *Prikladnaya Pharmacokinetika.* Moscow: Izdatelstvo RAMN, 2003. (In Russ.).

17. Жердев В.П., Кольванов Г.Б., Литвин А.А., и др. Фармакокинетика дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2019;1:37–43. DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10038.

Zherdev VP, Kolyvanov GB, Litvin AA, et al. Pharmacokinetics of dipeptide mimetic BDNF GSB-106 in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2019;1:37–43. (In Russ.). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10038.

18. Подолько А.Л., Бочков П.О., Литвин А.А., и др. Кинетика распределения нового нейропротекторного средства ГЗК-111 и его активного метаболита цикло-L-пролилглицина в органах и тканях крыс. *Экспер. и клин. фармакол.* 2022;85(7):32–35. DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-7-32-35.

Podol'ko AL, Bochkov PO, Litvin AA, et al. Distribution kinetics of new neuroprotector compound GZK-111 and its metabolite cyclo-L-prolylglycine in rat tissues and organs. *Exper Clin Pharmacol.* 2022;85(7):32–35. (In Russ.). DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-7-32-35.

Оценка фармакокинетики тиозонида при его многократном приёме пациентами с диагнозом туберкулёз лёгких с множественной или широкой лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*

© Савченко А. Ю.¹, Кукес В. Г.¹, Буренков М. С.², Раменская Г. В.³

¹ — ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России», Московская область, Красногорский район, Российская Федерация

² — АО «Фарм-Синтез», Москва, Российская Федерация

³ — ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность Рост числа случаев туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) определяет актуальность разработки новых противотуберкулёзных препаратов (ПТП). **Цель.** Оценка фармакокинетических свойств нового отечественного ПТП тиозонид у пациентов с МЛУ-ТБ при многократном приёме препарата. **Методы.** Тиозонид применялся у пациентов с верифицированным диагнозом МЛУ-ТБ в рамках клинического исследования по протоколу No ТИО22 «Многоцентровое 12-недельное двойное слепое рандомизированное, плацебо-контролируемое клиническое исследование по подбору оптимальных доз лекарственного препарата тиозонид, капсулы (ЗАО «Фарм-Синтез») на фоне стандартной противотуберкулёзной химиотерапии у пациентов с диагнозом туберкулёз лёгких с множественной или широкой лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёза» (разрешение МЗ РФ № 661 от 24.11.2014). **Результаты.** Фармакокинетические характеристики тиозонида определялись при его многократном применении у пациентов с диагнозом туберкулёз лёгких с множественной или широкой лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёза, получающих стандартную противотуберкулёзную химиотерапию, методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Время достижения максимальной концентрации T_{max} тиозонида при многократном приёме в дозе 200, 400 и 600 мг составило $4,21 \pm 1,23$ часа, $4,9 \pm 1,08$ и $5,29 \pm 0,91$, соответственно; время полувыведения $T_{1/2}$ для тех же доз препарата составило $7,84 \pm 1,86$, $7,56 \pm 1,92$ и $6,3 \pm 2,12$ часа, соответственно. Максимальная концентрация тиозонида после приёма добровольцами препарата тиозонид C_{max} отмечалась на уровне $1386,89 \pm 533,68$ нг/мл в группе, принимавшей 200 мг тиозонида в сутки, $2684,48 \pm 712,40$ – при приёме препарата в дозе 400 мг и $5558,99 \pm 2143,81$ — в дозе 600 мг. **Заключение.** Выявлена линейная зависимость максимальной концентрации и площади под фармакокинетической кривой от принимаемой дозы и средней концентрации тиозонида в плазме крови пациентов с туберкулёзом лёгких с МЛУ-ТБ.

Ключевые слова: туберкулёз; МЛУ-ТБ; тиозонид; фармакокинетика

Для цитирования:

Савченко А. Ю., Кукес В. Г., Буренков М. С., Раменская Г. В. Оценка фармакокинетики тиозонида при его многократном приёме пациентами с диагнозом туберкулёз лёгких с множественной или широкой лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):48–54. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-48-54>

Поступила: 25.07.2023. В доработанном виде: 15.08.2023. Принята к печати: 14.11.2023. Опубликовано: 30.12.2023.

Evaluation of the multiple doses thiozonide's pharmacokinetics in patients diagnosed with pulmonary tuberculosis with multidrug-resistant or extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

© Alla Yu. Savchenko¹, Vladimir G. Kukes¹, Mikhail S. Burenkov², Galina V. Ramenskaya³

¹ — FSBI SCBT FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

² — "Pharm-Sintez" JSC, Moscow, Russian Federation

³ — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. The increase in the number of cases of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) determines the relevance of the development of new anti-TB drugs (ATDs). Determining the pharmacokinetics of a drug in the context of MDR-TB therapy is an integral part of the study of the original drug.

Objective. Evaluation of the pharmacokinetic properties of a new original drug, thiozonide, in patients with MDR-TB with multiple doses of the drug. **Methods.** Thiozonide was used in patients with a verified diagnosis of MDR-TB as part of a clinical trial according to protocol No. THIO22 "Multicenter 12-week double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial on the selection of optimal dosages of the drug thiozonide, capsules (CJSC Pharm-Sintez)" for against the background of standard anti-tuberculosis chemotherapy in patients diagnosed with pulmonary tuberculosis with multidrug-resistant or extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*" (permission of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 661 dated 11/24/2014). **Results.** The pharmacokinetic characteristics of thiozonide were determined during its repeated use in patients diagnosed with pulmonary tuberculosis with multidrug-resistant or extensively drug-resistant mycobacterium tuberculosis, receiving standard anti-tuberculosis chemotherapy, by HPLC with mass spectrometric detection. The time to reach the maximum concentration T_{max} of thiozonide with repeated administration at a dose of 200 mg, 400 mg and 600 mg was 4.21 ± 1.23 hours, 4.9 ± 1.08 and 5.29 ± 0.91 , respectively; the half-life $T_{1/2}$ for the same dosages of the drug was 7.84 ± 1.86 , 7.56 ± 1.92 and 6.3 ± 2.12 hours, respectively. The maximum concentration of thiozonide after taking the drug thiozonide by volunteers was C_{max} was observed at the level of 1386.89 ± 533.68 ng / ml in the group taking 200 mg of thiozonide per day, 2684.48 ± 712.40 when taking the drug at a dosage of 400 mg and $5558, 99 \pm 2143.81$ – at a dosage of 600 mg. **Conclusion.** A linear dependence of the maximum concentration and the area under the pharmacokinetic curve on the dose taken and also the average concentration of thiozonide in the blood plasma of patients with pulmonary tuberculosis with multidrug resistance of the causative agent of the disease was revealed.

Keywords: tuberculosis; MDR-TB; thiozonide; pharmacokinetics

For citations:

Savchenko AYu, Kukes VG, Burenkov MS, Ramenskaya GV. Evaluation of the multiple doses thiozonide's pharmacokinetics in patients diagnosed with pulmonary tuberculosis with multidrug-resistant or extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):48–54. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-48-54>

Received: 25.07.2023. **Revision received:** 15.08.2023. **Accepted:** 14.11.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

Бремя туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ) является предпосылкой к разработке новых противотуберкулёзных препаратов (ППП). В последнее десятилетие в Российской Федерации зарегистрированы бедаквилин (Janssen) и деламанид (Otsuka), а также один отечественный ППП — перхлозон (ГК Фармасинтез) [1–4]. Значимой представляется новая отечественная разработка — препарат из группы диарилхинолинов с рабочим названием тиозонид (ЗАО «Фарм-синтез»), по химической структуре представляющий собой $\{1R,2S+1S,2R\}$ -1-(6-Бром-2-хлорхинолил-3-ил)-4-(диметиламино)-2-(нафталин-1-ил)-1-фенилбутан-2-ол. Тиозонид обладает противотуберкулёзной активностью, сравнимой в монотерапии на модели генерализованного туберкулёза у мышей с таковой у препарата 2-го ряда рифампицином. Продолжительность жизни животных при этом была выше 120 суток (максимальное время наблюдений), в контроле животные погибали в среднем на 25-й день. Показано также, что имеет место синергизм с ППП 1-го ряда — изониазидом, рифампицином и этамбутолом, приводящий к практически полному выздоровлению подопытных животных [5, 6]. Учитывая, что тиозонид разрабатывается как средство терапии МЛУ-ТБ, одним из важных аспектов является исследование его фармакокинетических свойств при приёме пациентами в составе многокомпонентной фармакотерапии туберкулёза лёгких.

Материалы и методы / Materials and methods

Многоцентровое 12-недельное двойное слепое рандомизированное, плацебо-контролируемое клиническое исследование по подбору оптимальных доз лекарственного препарата тиозонид, капсулы (ЗАО «Фарм-Синтез») на фоне стандартной противотуберкулёзной химиотерапии у пациентов с диагнозом туберкулёз лёгких с множественной или широкой лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёза было одобрено Минздравом России (Разрешение МЗ РФ № 661 от 24.11.2014) и проведено в 13 клинических центрах. Изучение проводилось в рамках всех требований, предъявляемых к клиническим исследованиям, и было одобрено на заседании Совета по этике 23 сентября 2014 года в соответствии с заданием Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 августа 2014 года № 20-2-459896/П/ЭТ-3. В него были включены 160 пациентов, подпи-

савших информированное согласие, находившихся на стационарном или амбулаторном лечении, от 18 до 60 лет включительно, с диагнозом туберкулёз лёгких с множественной или широкой лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёза. Оценка фармакокинетических параметров проводилась по концентрации тиозонида в плазме пациентов, получавших исследуемый препарат в суточных дозах 200, 400 или 600 мг в соответствующие временные точки.

Участие в добровольной части исследования фармакокинетики было предложено всем пациентам. Фармакокинетические параметры были определены у 20 пациентов в группе пациентов, принимавших исследуемый лекарственный препарат тиозонид в суточной дозе 200 мг/сут, у 13 пациентов в группе пациентов, принимавших исследуемый лекарственный препарат тиозонид в суточной дозе 400 мг/сут, у 15 пациентов в группе пациентов, принимавших тиозонид в суточной дозе 600 мг/сут, и у 22 пациентов в группе пациентов, принимавших плацебо. Были рассчитаны и изучены следующие фармакокинетические переменные:

C_{max} — максимальная концентрация лекарственного вещества;

T_{max} — время достижения максимальной концентрации (C_{max}) лекарственного вещества;

C_{min} — минимальная концентрация лекарственного вещества;

C_{ss} — средняя концентрация лекарственного вещества в стационарных условиях;

AUC_{0-t} — суммарная площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время» в интервале времени от 0 до момента (t) отбора последней пробы биоматериала;

$AUMC_{0-t}$ — суммарная площадь под кривой произведения времени на концентрацию лекарственного вещества в интервале времени от 0 до момента (t) отбора последней пробы биоматериала;

$AUC_{0-\infty}$ — площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время» в интервале времени от 0 до ∞ ;

$AUC_{\infty,ss}$ — суммарная площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время» в пределах интервала дозирования (∞) в стационарных условиях (ss) при многократном введении лекарственного средства;

Cl — общий клиренс;

MRT — среднее время удерживания в организме молекулы лекарственного вещества;

V_d — стационарный объём распределения лекарственного вещества;

K_{el} — константа скорости элиминации лекарственного вещества;

$T_{1/2}$ — период полувыведения лекарственного вещества;

C_{max}/AUC_{0-t} или $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ — относительная скорость всасывания.

Приём исследуемого препарата производился натощак, не менее чем за 4 ч до приёма препаратов стандартной противотуберкулёзной химиотерапии. Первая проба крови была отобрана на визите рандомизации (День 0) натощак до приёма исследуемого препарата и препаратов стандартной противотуберкулёзной терапии, через 5–10 мин после установки катетера. Последующие отборы образцов крови проводились через:

- 1; 2; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12 и 24 ч после приёма первой дозы препарата на Визите рандомизации в день 0 (всего 11 точек по 5 мл);

- до приёма очередной дозы исследуемого препарата на Визитах 2, 3, 4, 5 и 6, в дни 3, 5, 7, 14 и 28, соответственно (5 точек по 5 мл).

Определение концентраций тиозонида проводилось методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Подробное описание методики приведено в статье [7]. Статистический анализ результатов определения концентраций тиозонида в плазме крови заключался в расчёте среднеарифметических (Mean) значений, стандартного отклонения (SD), коэффициента вариации (CV, %), медианы (Median), интерквартильного размаха (IQR), минимального (Min) и максимального (Max) значений.

Описательную статистику рассчитывали при помощи пакета MS Excel [8]. Расчёт фармакокинетических параметров и дисперсионный анализ проводили при помощи пакета MS Excel расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (разработано Joel I. Usansky, Ph.D., Atul Desai, M.S. and Diane Tang-Liu, Ph.D.; Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism Allergan, Irvine, CA 92606, США).

Результаты исследования/Results

В табл. 1–3 представлены данные усреднённых фармакокинетических параметров тиозонида после его многократного приёма пациентами с МЛУ-ТБ в дозах 200, 400 и 600 мг. Табл. 4 содержит данные о сравнительной относительной биодоступности и относительной степени всасывания тиозонида в зависимости от дозы при многократном приёме препарата. На рис. 1 представлены усреднённые фармакокинетические профили (в полулогарифмических координатах) после приёма препарата тиозонид в дозах 200, 400 и 600 мг.

Изучена фармакокинетика препарата тиозонид, капсулы (ЗАО «Фарм-Синтез») при его многократном применении у пациентов с диагнозом туберкулёз лёгких с множественной или широкой лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёза, получающих стандартную противотуберкулёзную химиотерапию. Наблюдалась линейная зависимость максимальной концентрации и площади под фармакокинетической кривой от принимаемой дозы, а также средней концентрации тиозонида в плазме крови пациентов в стационарных условиях.

Приём исследуемого препарата в суточной дозе 200 мг характеризовался следующими показателями: время достижения максимальной концентрации тиозонида составило $T_{max} = 4,21 \pm 1,23$ часа, изучаемый препарат элиминировался из крови со средним значением $T_{1/2} = 7,84 \pm 1,86$ часа. Максимальная концентрация тиозонида после приёма добровольцами препарата составила $C_{max} = 1386,89 \pm 533,68$ нг/мл. Значение AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ тиозонида составили $12864,67 \pm 6120,71$ нг · ч/мл и $14947,90 \pm 7051,90$ нг · ч/мл. Среднее время удерживания тиозонида составило $12,86 \pm 2,52$ ч, общий клиренс — $16,51 \pm 7,53$ л/ч, элиминация на терминальном участке фармакокинетической кривой имела линейный характер. Среднее значение K_{el} составило $0,09 \pm 0,002$ ч⁻¹. Минимальная концентрация тиозонида в плазме крови пациентов в пределах ин-

Таблица 1

Усреднённые значения фармакокинетических параметров тиозонида после приёма препарата при многократном введении в суточной дозе 200 мг

Table 1

Average values of the pharmacokinetic parameters of thiozonide after taking the drug with repeated administration at a daily dosage of 200 mg

Статистические оценки / Statistical estimates	Параметр / Parameter			
	C_{ss} , нг/мл	C_{min} , нг/мл	C_{max} , нг/мл	$AUC_{c,ss}$, нг · ч/мл
Среднее / Mean	628,2	351,4	947,4	430 811,3
Медиана / Median	488,9	260,1	877,3	358 848,3
Стандартное отклонение / Standard deviation	373,7	323,1	479,3	252 568,8
Коэффициент вариации, CV, %	59,5	92,0	50,6	58,6
Интерквартильный размах / IQR	473,6	264,1	692,7	364 788,6
Минимум / Minimum	1 85,4	0	260,0	124 974,8
Максимум / Maximum	1 778,2	1 563,9	1 991,9	1 088 830,6

Таблица 2

Усреднённые значения фармакокинетических параметров тиозонида после приёма препарата тиозонид при многократном введении в суточной дозе 400 мг

Table 2

Average values of the pharmacokinetic parameters of thiozonide after taking the drug with repeated administration at a daily dosage of 400 mg

Статистические оценки / Statistical estimates	Параметр / Parameter			
	C _{ss} , нг/мл	C _{min} , нг/мл	C _{max} , нг/мл	AUC _{τ,ss} , нг · ч/мл
Среднее / Mean	912,4	468,8	1 467,3	593 688,2
Медиана / Median	620,01	330,47	1 311,54	493 069,56
Стандартное отклонение / Standard deviation	597,7	367,8	821,7	334 164,4
Коэффициент вариации, CV, %	65,5	78,5	56,0	56,3
Интерквартильный размах / IQR	663,7	262,7	1 459,3	447 085,9
Минимум / Minimum	396,2	0,00	581,7	254 135,6
Максимум / Maximum	2 511,9	1 529,6	3 104,1	1 381 857,7

Таблица 3

Усреднённые значения фармакокинетических параметров тиозонида после приёма препарата тиозонид при многократном введении в суточной дозе 600 мг

Table 3

Average values of the pharmacokinetic parameters of thiozonide after taking the drug with repeated administration at a daily dosage of 600 mg

Статистические оценки / Statistical estimates	Параметр / Parameter			
	C _{ss} , нг/мл	C _{min} , нг/мл	C _{max} , нг/мл	AUC _{τ,ss} , нг · ч/мл
Среднее / Mean	1 387,5	868,7	2 216,9	890 732,2
Медиана / Median	1 308,4	824,6	1 849,8	844 069,0
Стандартное отклонение / Standard deviation	776,1	456,2	1 809,1	422 607,2
Коэффициент вариации, CV, %	55,9	52,5	81,6	47,4
Интерквартильный размах / IQR	651,8	420,6	697,6	497 270,2
Минимум / Minimum	228,0	87,8	561,8	87 755,4
Максимум / Maximum	3 379,6	1 756,7	8 005,0	1 565 497,1

Таблица 4

Относительная биодоступность и относительная степень всасывания тиозонида после приёма 200 мг/сутки в сравнении с приёмом 400 и 600 мг/сутки

Table 4

Relative bioavailability and relative extent of absorption of thiozonide after administration of study drug thiozonide at a daily dosage of 200 mg/day compared with administration of study drug at two other daily dosages (400 and 600 mg/day) in pairs

Дозировка / Dosage	Параметр / Parameter		
	f	f'	f''
200 мг / 400 мг	0,59	0,58	0,52
200 мг / 600 мг	0,29	0,28	0,25

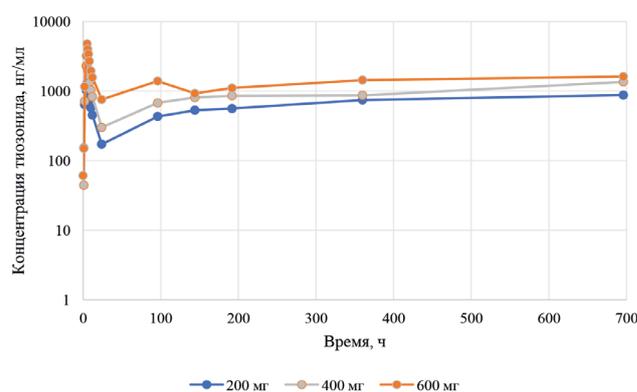


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические профили во времени (в полулогарифмических координатах) после приёма тиозонида (200, 400, 600 мг)

Fig. 1. Average pharmacokinetic profiles over time (in semi-logarithmic coordinates) after administration of thiozonide (200, 400, 600 mg)

тервала дозирования составила $351,40 \pm 323,13$ нг/мл. Максимальная концентрация тиозонида в плазме крови пациентов в пределах интервала дозирования составила $947,41 \pm 479,29$ нг/мл. Величина средней концентрации тиозонида в плазме крови пациентов в стационарных условиях составила $628,17 \pm 373,70$ нг/мл.

Увеличение суточной дозы препарата тиозонид до 400 мг сопровождалось ростом времени достижения максимальной концентрации, оно составило $T_{\max} = 4,9 \pm 1,08$ часа; тиозонид элиминировался из крови со средним значением $T_{1/2} = 7,56 \pm 1,92$ часа. Максимальная концентрация тиозонида после приёма добровольцами препарата в дозе 400 мг составила $C_{\max} = 2684,48 \pm 712,40$ нг/мл. Значения AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ тиозонида составили $22094,37 \pm 9443,74$ нг · ч/мл и $25369,28 \pm 10911,98$ нг · ч/мл. Среднее время удерживания тиозонида составило $12,35 \pm 2,01$ ч, общий клиренс — $17,99 \pm 6,01$ л/ч, элиминация на терминальном участке фармакокинетической кривой имела так же, как и в случае с приёмом препарата в дозе 200 мг, линейный характер. Среднее значение K_{el} составило $0,010 \pm 0,02$ ч⁻¹. Минимальная концентрация тиозонида в плазме крови пациентов в пределах интервала дозирования составила $468,82 \pm 367,77$ нг/мл. Максимальная концентрация тиозонида в плазме крови пациентов в пределах интервала дозирования составила $1467,27 \pm 821,70$ нг/мл. Величина средней концентрации тиозонида в плазме крови пациентов в стационарных условиях составила $912,39 \pm 597,66$ нг/мл.

Дальнейшая эскалация суточной дозировки до 600 мг приводила к увеличению фармакокинетических показателей: время достижения максимальной концентрации тиозонида составило $T_{\max} = 5,29 \pm 0,91$ часа, его элиминация из крови характеризовалась средним значением $T_{1/2} = 6,3 \pm 2,12$ часа. Максимальная концентрация тиозонида после приёма добровольцами препарата тиозонид оказалась равной $C_{\max} = 5558,99 \pm 2143,81$ нг/мл. Значения AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ тиозонида составили $45397,10 \pm 17063,37$ нг · ч/мл и $51924,57 \pm 20602,76$ нг · ч/мл, соответственно. Среднее время удерживания тиозонида составило $12,14 \pm 2,11$ ч, общий клиренс — $13,87 \pm 7,08$ л/ч, элиминация на терминальном участке фармакокинетической кривой имела линейный характер. Среднее значение K_{el} составило $0,016 \pm 0,017$ ч⁻¹. Минимальная концентрация тиозонида в плазме крови пациентов в пределах интервала дозирования составила $868,70 \pm 456,20$ нг/мл. Максимальная концентрация тиозонида в плазме крови пациентов в пределах интервала дозирования составила $2216,91 \pm 1809,14$ нг/мл. Величина средней концентрации тиозонида в плазме крови пациентов в стационарных условиях составила $1387,45 \pm 776,14$ нг/мл.

Обсуждение результатов / Discussion

Данные многоцентрового клинического исследования по подбору оптимальных доз лекарственного препарата тиозонид позволили установить характерный фармакокинетический профиль препарата у пациентов с МЛУ-ТБ, получающих различные (с эскалацией) дозы препарата. Препарат определялся у всех пациентов, его получавших. Демографические показатели пациентов, включённых в исследование ФК тиозонида, не отличались от таковых в других КИ фармакокинетики современных ПТП [9]. Сравнительный анализ ФК разных режимов дозирования препарата показал дозозависимое увеличение фармакокинетических показателей. Полученные фармакокинетические характеристики сопоставимы с таковыми у зарегистрированного ПТП из группы диарилхинолинов бедаквилаина: пятичасовое время достижения максимальной концентрации при дозе 700 мг/сут и дозозависимый характер увеличения фармакокинетических показателей [10].

Заключение / Conclusion

Фармакокинетическое исследование оригинального ПТП тиозонид при многократном приёме в дозах 200–600 мг в сутки показало линейный характер фармакокинетики в рассматриваемом диапазоне доз. Аналогичную фармакокинетику выявили ранее при изучении распределения препарата у здоровых добровольцев [11].

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Участие авторов. *Кукес В. Г.* — постановка задачи исследования; *Савченко А. Ю.* — статистическая обработка результатов, написание текста статьи; *Раменская Г. В.* — согласование и редактирование текста статьи; *Буренков М. С.* — консолидация первичных данных.

Participation of authors. *Kukes VG* — statement of the research problem; *Savchenko AYU* — statistical processing of the results, writing the text of the article; *Ramenskaya GV* — coordination and editing of the text of the article; *Burenkov MS* — consolidation of primary data.

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Financing. The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Савченко Алла Юрьевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: alursav@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>

в. н. с. лаборатории фармако моделирования
ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская
область, Красногорский район, Российская
Федерация

Alla Yu. Savchenko

Corresponding author

e-mail: alursav@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>

Leading Researcher, Pharmaceutical Comodeling
Laboratory, FSBI SCBT FMBA of Russia, Moscow
region, Krasnogorsky district, Russian Federation

Кукес Владимир Григорьевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5112-6928>

д. м. н., профессор, академик РАН, Кафедра
клинической фармакологии и пропедевтики
внутренних болезней, ФГБУН НЦБМТ ФМБА
России, Московская область, Красногорский
район, Российская Федерация

Vladimir G. Kukes

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5112-6928>

Dr. Sci (Med.), Professor, Academician RAS De-
partment of Clinical Pharmacology and Propae-
deutics of Internal Diseases, FSBI SCBT FMBA
of Russia, Moscow region, Krasnogorsky district,
Russian Federation

Буренков Михаил Сергеевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1158-9004>

к. б. н., менеджер по доклиническим
исследованиям АО «Фарм-Синтез», Москва,
Российская Федерация

Mikhail S. Burenkov

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1158-9004>

PhD, Cand. Sci. (Biology), manager for pre-clinical
research, “Pharm-Synthesis” JSC, Moscow, Russian
Federation

Раменская Галина Владиславовна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>

д. фарм. н., профессор, директор Института
фармазии ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), Москва,
Российская Федерация

Galina V. Ramenskaya

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>

Dr. Sci (Pharm.), Professor, Director of the Institute
of Pharmacy I.M. Sechenov First Moscow State
Medical University (Sechenov University), Moscow,
Russian Federation

Список литературы / References

1. Li Y, Sun F, Zhang W. Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging. *Drug Dev Res.* 2019 Feb;80(1):98–105. DOI: 10.1002/ddr.21498.

2. Keam SJ. Pretomanid: First Approval. *Drugs.* 2019 Nov;79(16):1797–1803. DOI: 10.1007/s40265-019-01207-9.

3. Яблонский П.К., Виноградова Т.И., Левашев Ю.Н. и др. Доклинические и клинические исследования нового противотуберкулезного препарата «Перхлозон®». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2016;18(1):42–48.

Yablonskiy PK, Vinogradova TI, Levashev YuN, et al. Nonclinical and Clinical Studies of the New Anti-Tuberculosis Drug “Perchlozone®”. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2016;18(1):42–48. (In Russ.).

4. Ramachandran G, Swaminathan S. Safety and tolerability profile of second-line anti-tuberculosis medications. *Drug Saf.* 2015 Mar;38(3):253–269. DOI: 10.1007/s40264-015-0267-y.

5. Меньшикова Л.А. Фармакокинетическое исследование оригинального лекарственного средства тиозонида: дис. ... канд. фарм. наук. М.: 2016.

Men'shikova LA. Farmakokineticheskoe issledovanie original'nogo lekarstvennogo sredstva tiozonida: dis. ... kand. farm. nauk. Moscow; 2016. (In Russ.).

6. Бочарова И.В., Буренков М.С., Лепеха Л.Н., и др. Доклинические исследования специфической активности нового противотуберкулезного препарата тиозонид. *Туберкулез и болезни легких.* 2014;(6):46–50. DOI: 10.21292/2075-1230-2014-0-6-46-50.

Bocharova IV, Burenkov MS, Lepkha LN, et al. Preclinical studies of the specific activity of the new antituberculosis drug thiozonide. *Tuberculosis and Lung Diseases.* 2014;(6):46–50. (In Russ.). DOI: 10.21292/2075-1230-2014-0-6-46-50.

7. Раменская Г.В., Шохин И.Е., Меньшикова Л.А. и др. Разработка и валидация метода количественного определения оригинального противотуберкулезного препарата тиозонида в плазме крови с целью проведения фармакокинетических исследований. *Химико-фармацевтический журнал.* 2015;49(3):46–49. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-3-46-49.

Ramenskaya GV, Shokhin IE, Men'shikova LA, et al. Development and validation of the method of quantitative determination of original anti-tb drug thiozonide in blood plasma for pharmacokinetic investigations. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal.* 2015;49(3):46–49. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-3-46-49.

8. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М.: Филинь; 1997. 608 с.

Borovikov VP, Borovikov IP. Statisticheskiy analiz i obrabotka dannykh v srede Windows. Moscow: Filin; 1997. (In Russ.).

9. Марьяндышев А.О., Хохлов А.Л., Смердин С.В. и др. Основные результаты клинических исследований эффективности, безопасности и фармакокинетики перспективного противотуберкулезного препарата макозинон (PBTZ169). *Терапевтический архив*. 2020;92(3):61–72. DOI: 10.26442/00403660.2020.03.000621.

Mariandyshev AO, Khokhlov AL, Smerdin SV, et al. The main results of clinical trials of the efficacy, safety and pharmacokinetics of the perspective anti-tuberculosis drug makozinone (PBTZ169). *Therapeutic Archive*. 2020;92(3):61–72. (In Russ.). DOI: 10.26442/00403660.2020.03.000621.

10. Wilby KJ. A Scoping Review of the Clinical Pharmacokinetics of Bedaquiline. *Clin Pharmacokinet*. 2022 Apr;61(4):481–488. DOI: 10.1007/s40262-022-01107-4.

11. Савченко А.Ю., Меньшикова Л.А., Раменская Г.В., Смолярчук Е.А. Фармакокинетическое исследование инновационного противотуберкулезного препарата тиозонида в плазме крови. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(3):3–6. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-3-3-6.

Savchenko AYU, Menshikova LA, Ramenskaya GV, Smolyarchuk EA. Studying pharmacokinetics of new anti-tuberculosis drug thiozonide in blood plasma. *Khimiko-farmatsevicheskiy zhurnal*. 2015;49(3):3–6. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-3-3-6.

Особенности влияния антиоксиданта этилметил-гидроксипиридина малата и лекарственного средства убидекаренона на плазменные концентрации убихинона, убихинола и редокс-статус коэнзима Q10

© Зозина В. И.¹, Кондратенко С. Н.¹, Ших Е. В.¹, Красных Л. М.²,
Мельников Е. С.¹, Кукек В. Г.¹

¹ — ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

² — ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ, Москва, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Коэнзим Q10 (CoQ10) является одним из основных компонентов, поддерживающих баланс окислительно-восстановительной системы регуляции организма. Несмотря на то, что в некоторых исследованиях изучаются плазменные концентрации CoQ10 при различных заболеваниях, распределение убихинола и убихинона, а также редокс-статус CoQ10 остаются практически неизученными. **Цель.** Целью исследования послужило изучение соотношения концентраций убихинона и убихинола у больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН), принимающих антиоксидант этилметилгидроксипиридина малат и отечественный лекарственный препарат убидекаренон (препарат коэнзим Q10). **Методы.** В исследование было включено 58 больных с 0–III функциональным классом (ФК) ХСН (по NYHA), которые были распределены на 2 группы для последующей оценки влияния этилметилгидроксипиридина малата и убидекаренона на эндогенную плазменную концентрацию общего CoQ10, убихинола и убихинона. Концентрации изучаемых веществ определяли методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций. **Результаты.** В ходе исследования выявили, что при дополнительном приёме препарата убидекаренон наблюдалось увеличение концентрации коэнзима Q10 (+25,0 Δ %), значительный рост концентрации убихинола (+43,4 Δ %), а также резкое увеличение редокс-статуса (+74,6 Δ %) по сравнению с контрольной группой. При приёме этилметилгидроксипиридина малата в дополнение к стандартной терапии у больных наблюдался статистически значимый рост концентрации коэнзима Q10 (+20,22 Δ %), достоверное увеличение концентрации убихинола (+25,0 Δ %) и убихинона (+17,7 Δ %) по сравнению с контрольной группой, принимающей стандартную терапию. **Заключение.** При дополнительном приёме этилметилгидроксипиридина малата и убидекаренона к стандартной терапии наблюдается статистически значимый рост концентрации общего CoQ10. Однако при приёме убидекаренона наблюдается резкий рост редокс-статуса CoQ10 за счёт его восстановленной формы — убихинола, в то время как при приёме этилметилгидроксипиридина малата можно наблюдать недостоверную, но положительную тенденцию к увеличению редокс-статуса CoQ10 за счёт статистически достоверного увеличения концентрации как убихинона, так и убихинола.

Ключевые слова: коэнзим Q10; убихинол; убихинон; редокс-статус; убидекаренон; этилметилгидроксипиридина малат

Для цитирования:

Зозина В. И., Кондратенко С. Н., Ших Е. В., Красных Л. М., Мельников Е. С., Кукек В. Г. Особенности влияния антиоксиданта этилметилгидроксипиридина малата и лекарственного средства убидекаренона на плазменные концентрации убихинона, убихинола и редокс-статус коэнзима Q10. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):55–62. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-55-62>

Поступила: 03.07.2023. В доработанном виде: 15.07.2023. Принята к печати: 14.11.2023. Опубликовано: 30.12.2023.

Features of the influence of the antioxidant ethylmethylhydroxypyridine malate and the drug ubidecarenone on plasma concentrations of ubiquinone, ubiquinol and the redox state of coenzyme Q10

© Vladlena I. Zozina¹, Svetlana N. Kondratenko¹, Evgenia V. Shikh¹, Liudmila M. Krasnykh², Evgeny S. Melnikov¹, Vladimir G. Kukes¹

¹ — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

² — FSBI "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products"

Abstract. Relevance. Coenzyme Q10 is one of the main components that maintain the balance of the body's redox regulatory system. Although some studies have examined plasma concentrations of CoQ10 in various diseases, the distribution of ubiquinol and ubiquinone, as well as the redox state of CoQ10, remain largely unexplored. **The purpose of the study.** The purpose of the study was to study the ratio of ubiquinone and ubiquinol concentrations in patients with chronic heart failure (CHF) administering the antioxidant ethylmethylhydroxypyridine malate and the domestic drug ubidecarenone (CoQ10 drug). **Methods.** The study included 58 patients with functional class (FC) of CHF 0–III (according to NYHA), who were divided into 2 groups for subsequent assessment of the effect of ethylmethylhydroxypyridine malate and ubidecarenone on endogenous plasma concentrations of total CoQ10, ubiquinol and ubiquinone. The concentrations of the studied substances were determined by HPLC-MS/MS in the multiple reaction monitoring mode. **Results.** The study revealed that with additional administration of the drug ubidecarenone, there was an increase in the concentration of coenzyme Q10 (+25.0 Δ%), a significant increase in the concentration of ubiquinol (+43.4 Δ%), as well as a sharp increase in redox state (+74.6 Δ%) compared to the control group. During administration of ethylmethylhydroxypyridine malate in addition to standard therapy, patients experienced a statistically significant increase in the concentration of coenzyme Q10 (+20.22 Δ%), a significant increase in the concentration of ubiquinol (+25.0 Δ%) and ubiquinone (+17.7 Δ%) according to compared with a control group receiving standard therapy. **Conclusion.** With the additional administration of ethylmethylhydroxypyridine malate and ubidecarenone to standard therapy, a statistically significant increase in the concentration of total CoQ10 is observed. However, when administering ubidecarenone, a sharp increase in the redox state of CoQ10 is observed due to its reduced form — ubiquinol. While during administration of ethylmethylhydroxypyridine malate, it is observed an unreliable but positive trend towards an increase in the redox state of CoQ10 due to a statistically significant increase in the concentration of both ubiquinone and ubiquinol.

Keywords: coenzyme Q10; ubiquinol; ubiquinone; redox state; ubidecarenone; ethylmethylhydroxypyridine malate

For citations:

Zozina VI, Kondratenko SN, Shikh EV, Krasnykh LM, Melnikov ES, Kukes VG. Features of the influence of the antioxidant ethylmethylhydroxypyridine malate and the drug ubidecarenone on plasma concentrations of ubiquinone, ubiquinol and the redox state of coenzyme Q10. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):55–62. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-55-62>

Received: 03.07.2023. Revision received: 15.07.2023. Accepted: 14.11.2023. Published: 30.12.2023.

Введение / Introduction

Коэнзим Q10, по химической структуре представляющий собой бензохиноновое кольцо с боковой изопреновой цепью, является одним из основных компонентов, поддерживающих баланс окислительно-восстановительной системы регуляции организма [1]. В частности, CoQ10 играет важную роль в обеспечении клеток энергией, способствуя выработке аденозинтрифосфата (АТФ) и являясь основным переносчиком электронов от комплексов I и II к комплексу III митохондриальной дыхательной цепи [2]. Основная антиоксидантная активность CoQ10 связана с его восстановленной формой, убихинолом, способным ограничивать перекисное окисление липидов, снижать степень окислительного стресса, а также регенерировать витамины E и C до полностью восстановленных форм [3]. Исследования биоэнергетической и антиоксидантной функции CoQ10 привели к изучению важности его роли в модуляции экспрессии генов, процессе старения и гибели клеток. Однако антиоксидантная активность CoQ10 зависит не только от концентрации убихинола, но и от редокс-статуса CoQ10, представляющего собой соотношение убихинол/убихинон и являющимся одним из важных показателей антиоксидантной системы организма [4].

Снижение концентрации CoQ10 в плазме наблюдается при различных патологиях: митохондриальных миопатиях [5, 6], эндокринных [7, 8], сердечно-сосудистых заболеваниях [9, 10], хронических болезнях почек [11, 12], заболеваниях печени [13]. Истощение CoQ10 при данных заболеваниях нарушает баланс клеточного антиоксидантного статуса и вызывает нарушение функции митохондрий и клеточного энергоснабжения, что в свою очередь, приводит, например, к сердечной недостаточности. Было установлено, что концентрация CoQ10 ниже 0,48 мкг/мл является предсказателем смертности у больных хронической сердечной недостаточностью [14, 15].

Несмотря на то, что во множестве исследований изучаются плазменные концентрации CoQ10 при различных заболеваниях, распределение убихинола и убихинона, а также редокс-статус CoQ10 остаются практически неизученными. Таким образом, представлялось релевантным изучить соотношение концентраций убихинона и убихинола у больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН), принимающих антиоксидант этилметилгидроксипиридина малат и отечественный лекарственный препарат убидекаренон, содержащий коэнзим Q10.

Материал и методы / Materials and Methods

В исследование было включено 58 больных с 0–III функциональным классом (ФК) ХСН (по NYHA). Возраст больных в среднем составил $64,8 \pm 6,95$ лет, средняя масса — $69,2 \pm 8,7$ кг, средний рост — $169,0 \pm 6,048$ см.

Характеристика больных, включённых в исследование, представлена в табл. 1. Анамнез пациентов не был отягощён серьёзными заболеваниями желудочно-кишечного тракта, мочевыделительной и других систем.

Больные, согласно принимаемой терапии, были распределены на 2 группы (I и II) таким образом, чтобы было возможно оценить влияние этилметилгидроксипиридина малата и убидекаренона (препарат коэнзима Q10) на эндогенную плазменную концентрацию общего CoQ10, убихинола и убихинона. В первую группу входило 26 больных 0–I ФК ХСН по NYHA, принимавших стандартную терапию (контрольная группа) и стандартную терапию с дополнительным назначением убидекаренона. Во вторую группу входило 32 больных II–III ФК ХСН по NYHA, принимавших стандартную терапию (контрольная группа) и стандартную терапию с дополнительным назначением этилметилгидроксипиридина малата (тестируемая группа). Подробный дизайн исследования представлена в табл. 2.

Исследование проведено в соответствии с принципами Декларации Всемирной медицинской ассоциации (Эдинбург, 2000 г.). Письменное информированное согласие было получено от всех участников исследования до начала каких-либо процедур. Процедуры исследования были согласованы с Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 14–22).

Забор крови для анализа у больных I группы осуществляли через 14 дней лечения. При этом больным из I тестируемой группы убидекаренон назначали на 2-й день стандартной терапии. Забор крови для анализа у больных II группы осуществляли однократно — через 3 дня от начала лечения в стационаре. Для этого больному вводили одноразовый катетер в кубитальную вену и отбирали 5 мл крови в пробирку, содержащую ЭДТА. Плазму крови отделяли центрифугированием и хранили до анализа при -30 °С.

Эндогенную концентрацию убихинола, убихинона и общего CoQ10 в плазме крови больных определяли методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций с применением методики, разработанной нами ранее [16–18]. Методика позволяла надёжно и достоверно определять концентрацию изучаемых аналитов в плазме крови больных и отвечала основным критериям валидации для аналитических методов, используемых для измерения концентрации различных эндогенных соединений, лекарственных средств и их метаболитов в биологических жидкостях человека [19–21]. Всего проанализировано 84 пробы плазмы крови больных.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы «Statistica 6.0». Рассчитывали следующие параметры: среднее арифметическое значение (Mean), стандартное отклонение среднего результата (S.D.), стандартную ошибку

Таблица 1

Характеристика больных

Table 1

Characteristics of patients

Показатель		Группы больных		
		I группа	II группа	
Число больных, человек (%)		26	32	
Артериальная гипертензия	Степень	1	2 (7,69 %)	—
		2	24 (92,31 %)	13 (40,62 %)
		3	—	19 (59,38 %)
	Стадия	1	14 (53,85 %)	—
		2	12 (46,15 %)	17 (53,12 %)
		3	—	15 (46,88%)
	Риск ССО	Низкий	2 (7,69 %)	—
		Умеренный	12 (46,15 %)	2 (6,25 %)
Высокий		12 (46,15 %)	12 (37,50 %)	
Очень высокий		—	18 (56,25 %)	
Ишемическая болезнь сердца		23 (88,46 %)	29 (90,63 %)	
Стенокардия напряжения, функциональный класс	1 ф.к.	4 (15,38 %)	8 (25,00 %)	
	2 ф.к.	—	10 (31,25 %)	
ХСН, функциональный класс по NYHA	0 ФК	21 (80,77 %)	—	
	I ФК	5 (19,23 %)	—	
	II ФК	—	18 (56,25 %)	
	III ФК	—	14 (43,75 %)	
Пол	Женщины	15 (57,69 %)	20 (62,50 %)	
	Мужчины	11 (42,31 %)	12 (37,50 %)	

Примечания: ХСН — хроническая сердечная недостаточность; ССО — сердечно-сосудистые осложнения; ф.к. — функциональный класс; ФК — функциональный класс по NYHA.
 Notes: ХСН — CHF — chronic heart failure; ССО — CVD — cardiovascular complications; ф.к. — f.c. — functional class; ФК — FC — functional class according to NYHA.

Таблица 2

Дизайн исследования

Table 2

Research design

Показатель	Группы больных			
	I группа		II группа	
	Контрольная группа	Тестируемая группа	Контрольная группа	Тестируемая группа
Число пациентов	12	14	18	14
Пол пациентов	Женщины — 58,3 %, Мужчины — 41,7 %	Женщины — 57,1 %, Мужчины — 42,9 %	Женщины — 61,1 %, Мужчины — 38,9 %	Женщины — 64,3 %, Мужчины — 35,7 %
Средний возраст, лет	66,07±7,14	64,91±6,84	63,82±6,73	64,41±7,08
Средняя масса, кг	71,5±10,61	71,35±6,47	68,51±8,37	65,42±9,17
Средний рост, см	168,25±5,67	167,42±5,97	171,18±6,44	169,07±6,11
Принимаемые лекарственные препараты	Каптоприл/Эналаприл, Бисопролол/Метопролол, Амлодипин	Каптоприл/Эналаприл, Бисопролол/Метопролол, Амлодипин, Убидекаренон	Бисопролол/Метопролол, Амлодипин	Бисопролол/Метопролол, Амлодипин, Этилметил-гидроксипиридина малат
Изучаемые лекарственные средства	Убидекаренон		Этилметилгидроксипиридина малат	
Схема отбора проб крови	Однократно — через 14 дней лечения		Однократно — через 3 дня лечения	
Анализируемое вещество в плазме крови	Убихинол, Убихинон, Общий СоQ10,	Убихинол, Убихинон, Общий СоQ10,	Убихинол, Убихинон, Общий СоQ10,	Убихинол, Убихинон, Общий СоQ10,

(S.E.), коэффициент вариации (C.V.), верхнюю и нижнюю границы 95 % доверительного интервала (DI). Нормальность распределения полученных данных оценивали при помощи теста Колмогорова–Смирнова. При условии $p > 0,10$ распределение считалось нормальным. При условии нормальности распределения для сравнения выборок применяли непарный двусторонний t-тест Стьюдента, при необходимости с коррекцией Уэлча. При $p < 0,05$ различия считались достоверными.

Результаты / Results

Для уточнения влияния этилметилгидроксипиридина малата и убидекаренона на эндогенный уровень общего CoQ10, убихинола, убихинона проводили сравнительный анализ значений их концентрации в плазме крови больных контрольной и тестируемой групп, результаты которого представлены в табл. 3 и 4. При проведении сравнительного анализа использовали двухвыборочный t-тест Стьюдента с коррекцией Уэлча, так как при помощи теста Колмогорова–Смирнова было доказано, что полученные данные подчинялись нормальному распределению Гауса. Динамика изменения концентрации убихинола, убихинона, общего

CoQ10 и его редокс-статуса в плазме крови больных с ХСН при применении этилметилгидроксипиридина малата и убидекаренона, выраженная в Δ % по сравнению с контрольной группой, приведена на рис. 1.

Обсуждение / Discussion

Полученные значения эндогенной концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных с ХСН I и II группы (табл. 3–4) статистически достоверно ниже данных литературы для здоровых добровольцев пожилого возраста [22, 23], что может быть обусловлено наличием оксидативного стресса у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями [24, 25] и согласуется с данными литературы для больных с ХСН [26, 27].

В ходе исследования выявили статистически значимые различия у больных первой группы (0–I ФК ХСН по NYHA), принимавших дополнительно к стандартной терапии убидекаренон, по сравнению с контрольной группой. Отмечено, что концентрация коэнзима Q10 в тестируемой группе статистически значимо выше, чем в контрольной группе, принимающей стандартную терапию (+25,0 Δ %). Помимо этого, наблюдался значительный достоверный рост концентрации убихинола (+43,4 Δ %), а также резкое

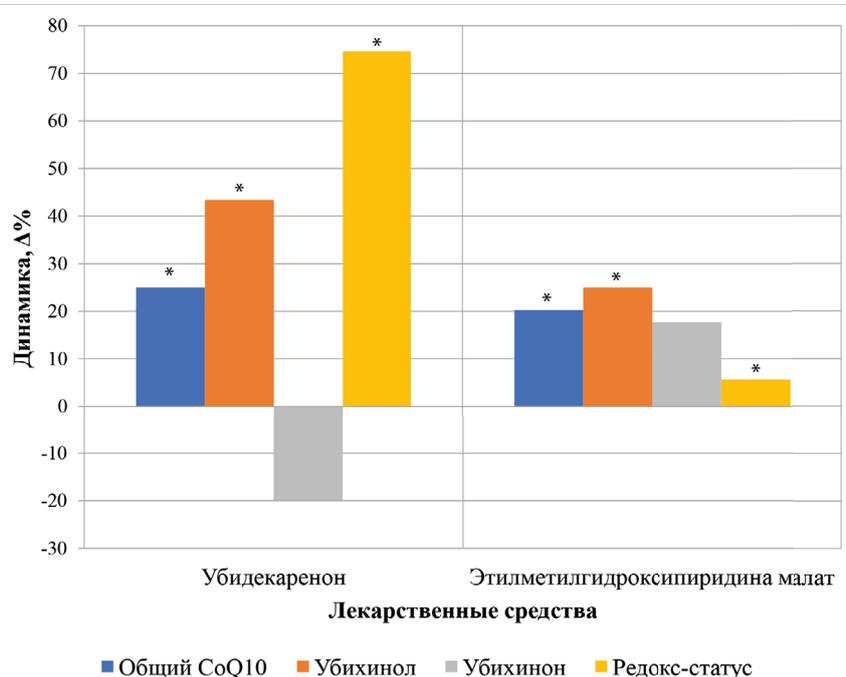


Рис. 1. Динамика изменения плазменной концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями при применении убидекаренона и этилметилгидроксипиридина малата

Fig. 1. Dynamics of changes in plasma concentrations of ubiquinol, ubiquinone, total CoQ10 and its redox state in patients with cardiovascular diseases during administration of ubidecarenone and ethylmethylhydroxypyridine malate

Примечание: * — статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой.
Note: * — statistically significant differences compared to the control group.

Таблица 3
Table 3

Оценка влияния убидекаренона на концентрации убихинола, убихинона, общего СоQ10 (мкг/мл) и его редокс-статус в плазме крови больных I группы

Evaluation of the effect of ubidesarenone on the concentrations of ubiquinol, ubiquinone, total CoQ10 (mcg/ml) and its redox state in the plasma of patients of group I

Параметр	Контрольная группа				Тестируемая группа			
	СоQ10	Убихинол	Убихинон	Редокс-статус	СоQ10	Убихинол	Убихинон	Редокс-статус
n	12	12	12	12	14	14	14	14
Mean	0,784	0,557	0,226	3,327	0,980*	0,799*	0,181	5,810*
S.D.	0,224	0,207	0,133	1,817	0,258	0,247	0,124	3,358
S.E.	0,064	0,059	0,038	0,524	0,069	0,066	0,033	0,897
S.V., %	28,65	37,13	58,90	54,58	26,39	30,95	68,74	57,77
Доверительный интервал 95 %	0,641 0,926	0,426 0,689	0,141 0,311	2,173 4,482	0,831 1,130	0,656 0,942	0,109 0,253	3,876 7,753
Тест Колмогорова-Смирнова	0,164 $p > 0,10$	0,137 $p > 0,10$	0,292 $p > 0,10$	0,218 $p > 0,10$	0,199 $p > 0,10$	0,212 $p > 0,10$	0,242 $p > 0,10$	0,208 $p > 0,10$
t-тест Стьюдента	—	—	—	—	2,073 $p = 0,049$	2,675 $p = 0,013$	0,892 $p = 0,380$	2,443 $p = 0,022$

Примечания: редокс-статус — отношение концентрации убихинола к концентрации убихинона; * — статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой.
Notes: redox state — the ratio of the concentration of ubiquinol to the concentration of ubiquinone; * — statistically significant differences compared to the control group.

Таблица 4
Table 4

Оценка влияния этилметилгидроксипиридина малата на концентрации убихинола, убихинона, общего СоQ10 (мкг/мл) и его редокс-статус в плазме крови больных II группы

Evaluation of the effect of ethylmethyldihydroxypyridine malate on the concentrations of ubiquinol, ubiquinone, total CoQ10 (mcg/ml) and its redox state in the plasma of patients of group II

Параметр	Контрольная группа				Тестируемая группа			
	СоQ10	Убихинол	Убихинон	Редокс-статус	СоQ10	Убихинол	Убихинон	Редокс-статус
n	18	18	18	18	14	14	14	14
Mean	0,613	0,228	0,385	0,633	0,737*	0,285*	0,453*	0,669
S.D.	0,053	0,069	0,062	0,329	0,063	0,078	0,078	0,313
S.E.	0,013	0,016	0,014	0,077	0,018	0,022	0,023	0,090
S.V., %	8,75	30,07	16,26	51,90	8,69	27,45	17,33	46,69
Доверительный интервал 95 %	0,588 0,64	0,194 0,262	0,354 0,417	0,470 0,797	0,697 0,777	0,235 0,334	0,403 0,502	0,471 0,898
Тест Колмогорова-Смирнова	0,1649 $p > 0,10$	0,2802 $p > 0,10$	0,2802 $p > 0,10$	0,2884 $p > 0,10$	0,1648 $p > 0,10$	0,2884 $p > 0,10$	0,2884 $p > 0,10$	0,2802 $p > 0,10$
t-тест Стьюдента	—	—	—	—	5,730 $p < 0,0001$	2,099 $p = 0,045$	2,606 $p = 0,015$	0,300 $p = 0,766$

Примечания: редокс-статус — отношение концентрации убихинола к концентрации убихинона; * — статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой.
Notes: redox state — the ratio of the concentration of ubiquinol to the concentration of ubiquinone; * — statistically significant differences compared to the control group.

увеличение редокс-статуса (+74,6 Δ %) у пациентов, принимающих убидекаренон. Не было отмечено значимых различий в концентрации убихинона у тестируемой и контрольной группы.

Согласно проведённым ранее клиническим исследованиям [28], биодоступность коэнзима Q10 в виде солюбилизированной формы в составе препарата убидекаренон в 2,5–3 раза выше и приводит не только к многократному повышению содержания коэнзима Q10 в плазме крови, но и к достоверному, но незначительному повышению его содержания в миокарде [28]. В ходе настоящего исследования выяснили, что значимо увеличивается содержание CoQ10 за счёт его восстановленной формы, убихинола, в то время как концентрация убихинона значительно не различается у пациентов с дополнительным назначением убидекаренона по сравнению с контрольной группой, получающих стандартную терапию. Значительное увеличение концентрации убихинола подтверждает антиоксидантный потенциал убидекаренона, так как именно убихинол обладает непосредственной антиоксидантной активностью.

При приёме этилметилгидроксипиридина малата в дополнение к стандартной терапии у больных второй тестируемой группы (II–III ФК ХСН по NYHA) наблюдался статистически значимый рост концентрации коэнзима Q10 (+20,22 Δ %) по сравнению с контрольной группой, принимающей стандартную терапию. Кроме того, наблюдалось достоверное увеличение концентрации убихинола (+25,0 Δ %) и убихинона (+17,7 Δ %). При этом наблюдалась положительная, хотя и незначительная, тенденция к росту редокс-статуса (+5,7 Δ %).

Положительный эффект этилметилгидроксипиридина малата на концентрации CoQ10, убихинола и убихинона может быть обусловлен тем, что повышая активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, приём этилметилгидроксипиридина малата приводит к снижению выраженности оксидативного стресса и тканевой гипоксии, что в свою очередь, приводит к повышению содержания АТФ и меньшему расходу CoQ10 [29]. Ранее установлено, что активность СОД была значительно выше у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями по сравнению с практически здоровыми лицами и отрицательно коррелирует с концентрацией CoQ10 в плазме. У пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями активность СОД может повышаться для защиты от пероксидного окисления липидов и активных форм кислорода (АФК) [30]. Коэнзим Q10 и СОД синергически активны в поглощении радикала супероксида с образованием кислорода и перекиси водорода [31].

Таким образом, дополнительное назначение к стандартной терапии антиоксиданта этилметилгидроксипиридина малата и препарата CoQ10 убидекаренона приводят к увеличению концентрации общего CoQ10, однако при приёме этилметилгидроксипиридина малата увеличивается концентрации как убихинона,

так и убихинола, в то время как убидекаренон действует более селективно, значительно увеличивая концентрацию восстановленной формы, убихинола, что в свою очередь приводит к резкому увеличению редокс-статуса CoQ10.

Ограничения исследования. Данное исследование имеет несколько ограничений. Одним из ограничений исследования является продолжительность приёма препаратов. Для первой группы продолжительной приёма составила 14 дней, в то время как во второй группе — 3 дня. Помимо этого, пациенты второй группы были диагностированы II–III ФК ХСН по NYHA, в то время как у пациентов первой группы наблюдали 0–I ФК ХСН по NYHA. Данные ограничения открывают возможности для дальнейшего изучения и сопоставления влияния антиоксидантов на эндогенную концентрацию убихинона, убихинола CoQ10 и редокс-статуса.

Заключение / Conclusion

При дополнительном приёме этилметилгидроксипиридина малата и убидекаренона к стандартной терапии наблюдается статистически значимый рост концентрации общего CoQ10. Однако при приёме убидекаренона наблюдается резкий рост редокс-статуса CoQ10 за счёт его восстановленной формы — убихинола. В то время как при приёме этилметилгидроксипиридина малата можно наблюдать недостоверную, но положительную тенденцию к увеличению редокс-статуса CoQ10 за счёт статистически достоверного увеличения концентрации как убихинона, так и убихинола.

Определение редокс-статуса коэнзима Q10 в плазме крови является важным показателем для диагностирования и оценки степени тяжести оксидативного стресса у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, а также для оценки эффективности и безопасности проводимой фармакотерапии, в том числе антиоксидантами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Authors' participation. All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Financing. The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Зозина Владлена Игоревна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: zozinavi@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2036-7435>

Аспирант кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Vladlena I. Zozina

Corresponding author

e-mail: zozinavi@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2036-7435>

Postgraduate student of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russian Federation

Кондратенко Светлана Николаевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1323-7894>

д. фарм. н., профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Svetlana N. Kondratenko

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1323-7894>

PhD, Dr. Sci. (Pharm.), Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russian Federation

Ших Евгения Валерьевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6589-7654>

SPIN-код: 2397-8414

д. м. н., профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Evgenia V. Shikh

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6589-7654>

SPIN code: 2397-8414

PhD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russian Federation

Красных Людмила Михайловна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3650-6014>

к. б. н., ведущий аналитик научного отдела клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Liudmila M. Krasnykh

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3650-6014>

Cand. Sci. (Biology), Leading Analyst of the Scientific Department of Clinical Pharmacology FSBI "SCEEMP" MoH Russia, Moscow, Russian Federation

Мельников Евгений Сергеевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>

к. фарм. н., старший преподаватель кафедры токсикологической и фармацевтической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Evgeny S. Melnikov

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>

PhD, Dr. Sci. (Pharm.), Senior Lecturer of the Department of Toxicological and Pharmaceutical Chemistry named after A.P. Arzamastsev FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russian Federation

Кукес Владимир Григорьевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5112-6928>

д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Vladimir G. Kukes

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5112-6928>

PhD, Dr. Sci (Med.), Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Sifuentes-Franco S, Sánchez-Macias DC, Carrillo-Ibarra S, et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coenzyme Q10 Supplementation on Infectious Diseases. *Healthcare (Basel)*. 2022 Mar 7; 10(3):487. DOI: 10.3390/healthcare10030487.
2. Testai L, Martelli A, Flori L, et al. Coenzyme Q10: Clinical Applications beyond Cardiovascular Diseases. *Nutrients*. 2021 May 17;13(5):1697. DOI: 10.3390/nu13051697.
3. Gutierrez-Mariscal FM, Yubero-Serrano EM, Villalba JM, Lopez-Miranda J. Coenzyme Q10: From bench to clinic in aging diseases, a translational review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(14):2240–2257. DOI: 10.1080/10408398.2018.1442316.
4. Tang PH, Miles MV, DeGrauw A, Hershey A, Pesce A. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q(10) in human plasma. *Clin Chem*. 2001 Feb;47(2):256–65.
5. Hargreaves IP. Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Apr;49:105–111. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.01.020.
6. Yubero D, Montero R, Martín MA, et al. Secondary coenzyme Q10 deficiencies in oxidative phosphorylation (OXPHOS) and non-OXPHOS disorders. *Mitochondrion*. 2016 Sep;30:51–58. DOI: 10.1016/j.mito.2016.06.007.
7. Ates O, Bilen H, Keles S, et al. Plasma coenzyme Q10 levels in type 2 diabetic patients with retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 2013 Oct 18;6(5):675–679. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2013.05.24.
8. Shen Q, Pierce JD. Supplementation of Coenzyme Q10 among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Healthcare (Basel)*. 2015 May 21;3(2):296–309. DOI: 10.3390/healthcare3020296.
9. Ayer A, Macdonald P, Stocker R. CoQ Function and Role in Heart Failure and Ischemic Heart Disease. *Annu Rev Nutr*. 2015;35:175–213. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071714-034258.
10. Cocchi MN, Giberson B, Berg K, et al. Coenzyme Q10 levels are low and associated with increased mortality in post-cardiac arrest patients. *Resuscitation*. 2012 Aug;83(8):991–995. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2012.03.023.
11. Xu Y, Liu J, Han E, et al. Efficacy of coenzyme Q10 in patients with chronic kidney disease: protocol for a systematic review. *BMJ Open*. 2019 May 14;9(5):e029053. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-029053.
12. Zhao S, Wu W, Liao J, et al. Molecular mechanisms underlying the renal protective effects of coenzyme Q10 in acute kidney injury. *Cell Mol Biol Lett*. 2022 Jul 22;27(1):57. DOI: 10.1186/s11658-022-00361-5.
13. Mantle D, Hargreaves I. Coenzyme Q10 and Degenerative Disorders Affecting Longevity: An Overview. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Feb 16;8(2):44. DOI: 10.3390/antiox8020044.
14. DiNicolantonio JJ, Bhutani J, McCarty MF, O’Keefe JH. Coenzyme Q10 for the treatment of heart failure: a review of the literature. *Open Heart*. 2015 Oct 19;2(1):e000326. DOI: 10.1136/openhrt-2015-000326.
15. Yamamoto Y, Yamashita S. Ubiquinol/ubiquinone ratio as a marker of oxidative stress. *Methods Mol Biol*. 2002;186:241–246. DOI: 10.1385/1-59259-173-6:241.
16. Shikh E, Zozina V, Kondratenko S, et al. The particulars of certain drugs’ effect on the endogenous coenzyme Q10 plasma level in patients with cardiovascular diseases. *Drug Metab Pers Ther*. 2020 Jun 30;35(2):/j/dmdi.2020.35.issue-2/dmpt-2020-0106/dmpt-2020-0106.xml. DOI: 10.1515/dmpt-2020-0106.
17. Zozina V, Melnikov E, Krasnykh L, et al. The impact of cardiovascular and bronchopulmonary diseases on Coenzyme Q10 plasma concentration. *Sechenov Medical Journal*. 2019;10(1):16–21. DOI: 10.47093/22187332.2019.1.16-21.
18. Zozina VI, Melnikov ES, Goroshko OA, et al. Analytical Method Development for Coq10 Determination in Human Plasma Using HPLC-UV and HPLC/MS/MS. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2019;15(7):795–807. DOI: 10.2174/1573412915666190328215854.

19. EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency Committee for medicinal products for human use: London. 2011. Available at: <https://clck.ru/36DvaY> Accessed May 5, 2003.
20. FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation (draft guidance). US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) 2013;U.S. Government Printing Office: Washington, DC. Available at: <https://clck.ru/36DvBS>. Accessed May 5, 2003.
21. Бондарева И.Б., Бунятян Н.Д., Жердев В.П. и др. Методические указания: оценка биоэквивалентности лекарственных средств. 2008.
22. Bondareva IB, Bunyatyan ND, Zherdev VP et al. Metodicheskie ukazaniya: oценка bioekvivalentnosti lekarstvennykh sredstv. 2008. (In Russ.).
22. Miles MV, Horn PS, Tang PH, et al. Age-related changes in plasma coenzyme Q10 concentrations and redox state in apparently healthy children and adults. *Clin Chim Acta*. 2004 Sep;347(1-2):139–144. DOI: 10.1016/j.cccn.2004.04.003.
23. Niklowitz P, Onur S, Fischer A, Laudes M, Palussen M, Menke T, Döring F. Coenzyme Q10 serum concentration and redox status in European adults: influence of age, sex, and lipoprotein concentration. *J Clin Biochem Nutr*. 2016 May;58(3):240–245. DOI: 10.3164/jcbs.15-73.
24. Quinzii CM, López LC, Von-Moltke J, et al. Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J*. 2008 Jun;22(6):1874–1885. DOI: 10.1096/fj.07-100149.
25. Ulla A, Mohamed MK, Sikder B, et al. Coenzyme Q10 prevents oxidative stress and fibrosis in isoprenaline induced cardiac remodeling in aged rats. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2017 Apr 20;18(1):29. DOI: 10.1186/s40360-017-0136-7.
26. Cirilli I, Damiani E, Dlundla PV, et al. Role of Coenzyme Q10 in Health and Disease: An Update on the Last 10 Years (2010–2020). *Antioxidants (Basel)*. 2021 Aug 23;10(8):1325. DOI: 10.3390/antiox10081325.
27. Khan NA, Abid M, Ahmad A, Abuzinadah MF, Basheikh M, Kishore K. Cardioprotective Effect of Coenzyme Q10 on Apoptotic Myocardial Cell Death by Regulation of Bcl-2 Gene Expression. *J Pharmacol Pharmacother*. 2017 Jul-Sep;8(3):122–127. DOI: 10.4103/jpp.JPP_47_17.
28. Мареев В.Ю., Минина Ю.В., Беграмбекова Ю.Л. Кудесан® (капли 3% для приема внутрь) в лечении больных сердечной недостаточностью: эффективность и безопасность в комбинации со стандартной терапией (Кудесник). Дизайн и результаты проспективного рандомизированного двойного слепого исследования Кудесник. *Сердечная Недостаточность*. 2016;17:236–249. DOI: 10.18087/rhfj.2016.4.2257.
28. Mareev VYu, Minina YuV, Begrambekova YuL. Kudesan® (kapli 3% dlya priema vnutr’) v lechenii bol’nykh serdechnoy nedostatochnost’yu: effektivnost’ i bezopasnost’ v kombinacii so standartnoy terapiey (Kudesnik). Dizajn i rezul’taty prospektivnogo randomizirovannogo dvojnogo slepogo issledovaniya Kudesnik. *Serdechnaya Nedostatochnost’*. 2016;17:236–249. (In Russ.). DOI: 10.18087/rhfj.2016.4.2257.
29. Кукес В.Г., Парфенова О.К., Романов Б.К. и др. Механизм действия Этоксидола на показатели окислительного стресса при сердечной недостаточности и гипертонии. *Современные технологии медицины*. 2020;12(2):67–72. DOI: 10.17691/stm2020.12.2.08.
29. Kukes VG, Parfenova OK, Romanov BK. Stress Indices in Heart Failure and Hypotension. *Sovrem Tekhnologii Med*. 2020;12(2):67–72. (In Russ.). DOI: 10.17691/stm2020.12.2.08.
30. Gupta S, Sodhi S, Mahajan V. Correlation of antioxidants with lipid peroxidation and lipid profile in patients suffering from coronary artery disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2009 Aug;13(8):889–894. DOI: 10.1517/14728220903099668.
31. Lee BJ, Lin YC, Huang YC, et al. The relationship between coenzyme Q10, oxidative stress, and antioxidant enzymes activities and coronary artery disease. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:792756. DOI: 10.1100/2012/792756.

Исследование острой токсичности нового производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на мышах

© Алексеева С. В., Сорокина А. В., Волкова А. В., Мирошкина И. А., Качалов К. С., Алексеев И. В., Захаров А. Д., Дурнев А. Д.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Исследование острой токсичности является общепринятой процедурой доклинического исследования безопасности потенциальных средств. **Целью** настоящего исследования явилось изучение острой токсичности соединения ГИЖ-272, нового производного оксима дибензофурана, обладающего противоишемическим и противосудорожным действием. **Методы.** Соединение вводили мышам внутривентриально и перорально однократно. В течение 14 дней проводили наблюдение за состоянием животных, фиксировали клинические проявления интоксикации, регистрировали изменения в динамике массы тела и её прироста. **Результаты.** Установлено, что исследуемое соединение в максимальных дозах не приводит к гибели мышей. Поэтому полученные данные по классификации Сидорова К.К. (1973 г.), позволяют отнести ГИЖ-272 к 5 классу токсичности — «практически нетоксичное вещество». В соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 соединение ГИЖ-272 относится к 4 классу опасности (вещество малоопасное) для перорального способа введения.

Ключевые слова: ГИЖ-272; острая токсичность; пероральное и внутривентриальное введение; мыши

Для цитирования:

Алексеева С. В., Сорокина А. В., Волкова А. В., Мирошкина И. А., Качалов К. С., Алексеев И. В., Захаров А. Д., Дурнев А. Д. Исследование острой токсичности нового производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на мышах. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):63–69. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-63-69>

Поступила: 02.10.2023. **В доработанном виде:** 11.11.2023. **Принята к печати:** 07.12.2023. **Опубликована:** 30.12.2023.

Acute toxicity study of a new dibenzofuran oxime derivative GIZH-272 in mice

© Svetlana V. Alekseeva, Alexandra V. Sorokina, Anna V. Volkova, Irina A. Miroshkina, Kirill S. Kachalov, Ivan V. Alekseev, Aleksey D. Zakharov, Andrei D. Durnev

Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. Acute toxicity testing is a common procedure for preclinical safety testing of potential agents. **The purpose** of this study was to study the acute toxicity of the compound GIZH-272, a new dibenzofuran oxime derivative with anti-ischemic and anticonvulsant effects. **Methods.** The compound was administered to mice intraperitoneally and orally once. Within 14 days, the condition of the animals was monitored, clinical manifestations of intoxication were recorded, and changes in the dynamics of body weight and its growth were recorded. **Results.** It was found that the test compound at maximum doses did not lead to the death of mice. Therefore, the data obtained according to the classification of Sidorov K.K. (1973), make it possible to attribute GIZH-272 to the 5th class of toxicity — "practically non-toxic substance". In accordance with GOST 12.1.007-76, the GIZH-272 compound belongs to the 4th hazard class (low-hazard substance) for oral administration.

Keywords: GIZH-272; acute toxicity; oral and intraperitoneal administration; mice

For citations:

Alekseeva SV, Sorokina AV, Volkova AV, Miroshkina IA, Kachalov KS, Alekseev IV, Zakharov AD, Durnev AD. Acute toxicity study of a new dibenzofuran oxime derivative GIZH-272 in mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):63–69. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-63-69>

Received: 02.10.2023. **Revision received:** 11.11.2023. **Accepted:** 07.12.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в течение многих лет ведётся активная разработка оригинальных дибензофурановых производных, обладающих противосудорожной и противоишемической активностью [1]. Одним из перспективных соединений в этом ряду является ГИЖ-272 — (О-(4-циннамоил) оксим-3,4,6,7,8,9-гексагидродибензо[*b,d*]фуран-1(2*H*)-она, фармакологическая ценность которого заключается не только в выраженном противосудорожном эффекте, но и в наличии противоишемической, противогипоксической и цереброваскулярной активности [2]. Широкий спектр фармакологических эффектов ГИЖ-272 предполагает дальнейшее его исследование как средства для лечения эпилепсии, пароксизмальных состояний, неврологических и когнитивных нарушений [1–3].

Обязательным этапом доклинического исследования является оценка и доказательства безопасности потенциальных лекарственных средств. Проведение токсикологических исследований в полном объёме является гарантией безопасности для дальнейших клинических испытаний [4–6].

Цель исследования / The purpose of the study

Целью настоящего исследования явилась оценка острой токсичности соединения ГИЖ-272.

Задачи исследования — определить среднелетальные дозы при однократном внутривентриальном и пероральном введении мышам, зарегистрировать сроки развития интоксикации и гибели мышей с подробным описанием наблюдаемой клинической картины, определить класс токсичности субстанции ГИЖ-272 [4].

Материалы и методы / Materials and methods

Исследование острой токсичности было проведено на аутбредных мышах обоего пола ($n = 120$, масса 18–20 г) при внутрибрюшинном и пероральном введении.

Мыши были получены из филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России и содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Работы с мышами выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБУН «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (в 2023 году реорганизован в ФГБУН «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»).

В эксперименте использовали субстанцию ГИЖ-272 (серия 140722), (О-(4-циннамоил) оксим-3,4,6,7,8,9-гексагидродибензо[*b,d*]фуран-1(2*H*)-он) в виде порошка белого цвета. Данное соединение было синтезировано в отделе химии лекарственных средств ФГБУН «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» под руководством член-корр. РАН Гудашевой Т.А.

Суспензию для введения готовили *ex tempore* дисперсионным методом на 1 % растворе крахмала, вводя перорально однократно в дозах 1, 2, 4 и 6 г/кг. Доза 6 г/кг достигалась при введении максимально возможного объёма (0,5 мл) перорального введения для мышей и максимально возможной концентрации ГИЖ-272 в суспензии (24 %), проходящей через зонд (18G×25 мм).

Однократное внутрибрюшинное введение суспензии ГИЖ-272 самкам и самцам мышей осуществляли с использованием стерильных одноразовых шприцев и игл (0,6×25) в дозах 0,5; 1, 2 и 3 г/кг, причём доза 3 г/кг достигалась при использовании предельно допустимого объёма (1 мл) и концентрации (6 %) при данном способе введения мышам [5].

В контроле использовали 1 % раствор крахмала, который вводили в максимально возможных объёмах для каждого из способов введения — 0,5 мл внутривентрикулярно и 1 мл внутрибрюшинно [6, 7].

Общая продолжительность наблюдения за всеми экспериментальными и контрольными животными составляла 14 суток. Первые 8 часов после введения препарата каждое животное находилось в индивидуальной, прозрачной, пластиковой камере и было доступно для непрерывного визуального наблюдения. Через 8 часов все мыши перемещались в клетки группового содержания. В последующие сутки ежедневно проводили осмотр утром и вечером для выявления возможной гибели, а также для регистрации общего состояния и поведения животных. При осмотре в клетке, оценивали следующие параметры — позы, признаки самотравмирования, конвульсии, тремор, аномальные движения, птоз. Осмотр на поверхности включал в себя оценку реакции на тактильные,

болевые, звуковые и световые раздражители, изменение исследовательского поведения и двигательной реакции, интенсивность и характер двигательной активности, наличие неврологического дефицита (нарушение координации движений, тремор и судороги), эмоциональную напряжённость и груминг, частоту и глубину дыхания.

В течение эксперимента фиксировали массу тела животных и суточное потребление корма и воды. Массу тела животных определяли перед введением исследуемого соединения, первую неделю ежедневно, в дальнейшем — на 7- и 14-е дни эксперимента.

На 15-е сутки после однократного введения ГИЖ-272 или 1 % раствора крахмала животные опытных и контрольных групп были выведены из эксперимента, способом дислокации шейных позвонков, в соответствии с ГОСТом [8–9]. После эвтаназии было проведено их патологоанатомическое вскрытие.

Нормальность распределения полученных данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — с помощью критерия Левена. Если нормальность распределения отсутствовала или дисперсии выборок статистически различались, использовали непараметрические методы статистики. В случае независимых выборок сравнение проводили с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа по Краскеллу–Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Сравнение зависимых выборок проводили с помощью критерия Фридмана с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету. В случае использования непараметрических критериев результаты были представлены в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей, в противном случае — в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [7].

На основании результатов, полученных при регистрации смертности в течение эксперимента, вычисляли LD_{50} , LD_{16} , $LD_{84} \pm$ стандартная ошибка по методу Литчфилда и Уилкоксона в среде соответствующего программного обеспечения.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Было установлено, что ГИЖ-272 при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении в дозах 1, 2, 4 и 6 г/кг (перорально) и 0,5; 1, 2 и 3 г/кг (внутрибрюшинно) не вызывает гибели животных.

В результате наблюдений регистрировалась сходная клиническая картина, однако отмеченные во время эксперимента токсические эффекты имели разную степень выраженности, что объясняется различием в биодоступности соединений при парентеральном и пероральном способах введения. Так, снижение двигательной активности отмечалось через 1–2 (в/бр) и 4–5 (*per os*) минуты после введения ГИЖ-272, мыши лежа-

ли (в/бр) или сидели сгорбившись (*per os*), периодически вытягивали задние лапы и хвост. Дыхание было частое и поверхностное. Видимые слизистые и кожные покровы были бледными. Следует отметить, что у мышей, получивших ГИЖ-272 в малых дозах 0,5 г/кг (в/бр) и 1 г/кг (*per os*), периодически появлялся кратковременный тремор. Восстановление двигательной активности при внутрибрюшинном введении регистрировали через 6–7 часов, при пероральном введении через 6–10 минут. Когда через 8 часов животных перемещали в клетки группового содержания, большинство мышей были уже активны (в/бр) или гиперактивны (*per os*), хотя оставались сгорбленными и взъерошенными, некоторые мыши вокализировали, хвост держали параллельно поверхности. После внутрибрюшинного введения первую неделю, помимо гиперактивности, у части мышей отмечались нейротоксические эффекты в виде тремора и нарушения координации движения, после перорального введения многие из животных вздрагивали, вокализировали и кусались при взятии в руки. Постепенное улучшение состояния животных наблюдали со второй недели (в/бр)

или со вторых–третьих суток (*per os*). К окончанию эксперимента все мыши были активны, дыхание, состояние шерстного покрова, кожи и видимых слизистых оболочек соответствовало норме.

Динамика массы / Mass dynamics. Наблюдение за динамикой массы тела мышей после перорального введения ГИЖ-272 показало, что отрицательная динамика прироста массы мышей во всех опытных группах, в том числе и в контроле, отмечалась только первые сутки. К окончанию эксперимента значимые различия в приросте с контролем сохранялись только у мышей, которым ввели соединение в дозе 1 г/кг, у самок данный показатель превышал контрольный в 3 раза, у самцов — в полтора (табл. 1 и рис. 1 и 2).

Наблюдение за динамикой массы и прироста массы тела мышей после внутрибрюшинного введения соединения ГИЖ-272 в дозах 0,5; 1, 2 и 3 г/кг позволило установить значимые различия между контрольной и экспериментальными группами животных. Установлено, что первые сутки наблюдения мыши после введения ГИЖ-272 во всех дозах потеряли от 8 (0,5 г/кг) до 14 % (2 и 3 г/кг) массы тела. На вторые сутки масса

Таблица 1

Динамика массы и её прироста у самцов и самок мышей в течение двух недель после перорального введения соединения ГИЖ-272

Table 2

Dynamics of weight and its gain in male and female mice within two weeks after oral administration of the compound GIZH-272

До введения		Фон	Масса, г	Прирост, %	Масса, г	Прирост, %	Масса, г	Прирост, %
		1 сутки		7 сутки		14 сутки		
Контроль	♀	22,7	22,3*	-1,8	24,1	5,0	25,7*	12,0
		21,5÷23,0	21,3÷22,5	-3,1÷-0,9	21,8÷24,4	0,9÷6,2	23,6÷26,3	9,3÷12,9
ГИЖ – 272 1 г/кг	♀	22,8	22,5*	-1,4	27,0**	18,5*	31,5**	37,9*
		22,5÷23,1	21,9÷23,0	-2,6÷-0,4	25,8÷27,9	10,7÷24,0	28,7÷32,2	23,2÷47,6
ГИЖ – 272 2 г/кг	♀	22,3	22,3	-0,7	24,0*	5,9	26,8*	17,5
		22,1÷23,3	21,9÷23,3	-1,4÷1,3	22,8÷24,7	4,2÷9,0	25,1÷27,4	15,6÷19,7
ГИЖ – 272 4 г/кг	♀	23,0	22,9	-1,1	24,7*	6,2	26,4*	16,3
		22,2÷23,1	22,0÷23,5	-1,4÷1,7	22,9÷26,1	2,6÷13,0	24,3÷27,3	7,3÷17,3
ГИЖ – 272 6 г/кг	♀	22,0	21,8*	-1,1	22,9*	5,3	24,7*	15,3
		21,7÷23,2	20,8÷22,3	-3,9÷-0,7	22,0÷24,6	3,2÷7,3	24,1÷27,1	3,9÷18,5
Контроль	♂	23,2	22,8*	-1,7	26,4*	11,6	28,8*	18,5
		22,3÷24,4	21,8÷24,3	-2,7÷-0,4	25,1÷28,0	2,9÷18,2	27,3÷29,0	10,3÷30,0
ГИЖ – 272 1 г/кг	♂	23,3	23,2	-1,1	27,7*	19,2	31,4**	33,3*
		22,9÷23,4	22,7÷23,4	-1,7÷2,2	27,1÷28,5	17,3÷20,1	30,5÷32,0	30,6÷36,4
ГИЖ – 272 2 г/кг	♂	22,5	22,5	-0,2	25,2*	12,0	28,2*	24,9
		21,8÷24,0	21,7÷24,3	-0,5÷1,3	24,3÷26,9	11,9÷12,6	27,6÷28,3	17,9÷28,9
ГИЖ – 272 4 г/кг	♂	22,4	21,8	-2,7	25,2*	11,6	27,4*	19,4
		21,5÷23,0	20,8÷22,2	-4,2÷0,5	23,0÷25,8	7,5÷14,2	23,5÷28,2	9,8÷28,8
ГИЖ – 272 6 г/кг	♂	22,2	21,1**	-3,7	23,5*	6,6	27,2*	22,3
		21,3÷22,4	20,5÷21,7	-5,3÷-3,1	22,5÷24,4	2,7÷8,9	26,2÷27,6	20,7÷23,2

Примечания: данные представлены в виде медианы и процентилей; оценку значимости различий между выборочными средними осуществляли при условии, что статистическая совокупность включает не менее 4 наблюдений (числовых значений); * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных; ■ — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с исходными данными.

Notes: the data are presented in the form of median and percentiles; the significance of the differences between the sample averages was assessed provided that the statistical population includes at least 4 observations (numerical values); * — statistically significant differences ($p < 0.05$) compared with the control group of animals; ■ — statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the original data.

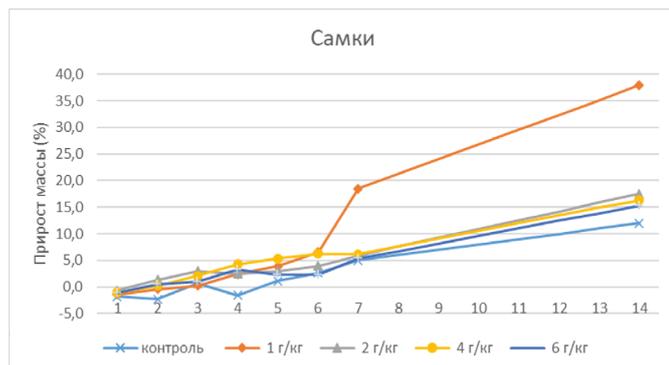


Рис. 1. Динамика прироста массы тела (%) у самок мышей при пероральном введении ГИЖ-272 в дозах 1, 2, 4 и 6 г/кг
Fig. 1. Dynamics of body weight gain (%) in female mice after oral administration of GIZH-272 at doses of 1, 2, 4 and 6 g/kg

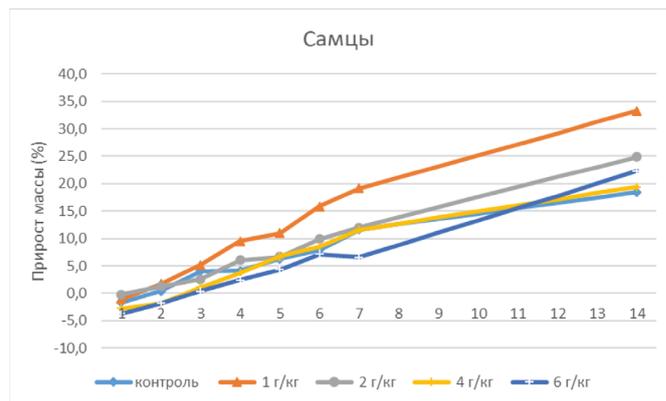


Рис. 2. Динамика прироста массы тела (%) у самцов мышей при пероральном введении ГИЖ-272 в дозах 1, 2, 4 и 6 г/кг
Fig. 2. Dynamics of body weight gain (%) in male mice after oral administration of GIZH-272 at doses of 1, 2, 4 and 6 g/kg

Таблица 2

Динамика массы и её прироста у самцов и самок мышей в течение двух недель после внутрибрюшинного введения соединения ГИЖ-272

Table 2

Dynamics of weight and its gain in male and female mice within two weeks after intraperitoneally administration of the compound GIZH-298

		Фон	Масса, г	Прирост, %	Масса, г	Прирост, %	Масса, г	Прирост, %
		До введения	1 сутки		7 сутки		14 сутки	
Контроль	♀	23,2	22,6*	-2,7	23,6*	1,7	25,3*	10,2
		22,3÷23,6	22,0÷23,0	-3,4÷-1,8	22,5÷24,4	1,2÷1,8	24,9÷25,9	8,6÷11,7
ГИЖ – 272 0,5 г/кг	♀	22,8	20,8**	-7,5*	23,6*	5,5*	26,1*	14,9
		22,1÷22,9	20,6÷21,0	-8,3÷-6,8	23,3÷24,7	4,9÷7,9	25,1÷26,5	11,3÷19,2
ГИЖ – 272 1 г/кг	♀	22,6	19,9**	-11,8*	22,9	1,3	25,4*	13,1
		22,3÷22,8	19,8÷19,9	-12,2÷-11,6	22,5÷24,0	-1,3÷8,4	24,6÷25,8	8,5÷17,7
ГИЖ – 272 2 г/кг	♀	23,0	20,1**	-13,8*	24,5*	4,8	25,9*	12,9
		22,3÷24,2	19,2÷20,8	-14,4÷-12,9	22,9÷26,2	3,1÷9,9	24,9÷27,4	9,7÷15,0
ГИЖ – 272 3 г/кг	♀	22,3	19,2**	-13,7*	22,0	2,0	25,1*	13,3
		20,3÷23,4	18,1÷19,7	-15,5÷-11,3	21,2÷23,5	-2,6÷5,0	23,8÷26,7	9,9÷19,0
Контроль	♂	23,6	23,2	-0,4	26,0*	10,1	28,6*	17,4
		18,5÷24,6	18,5÷25,0	-1,1÷1,6	19,6÷28,5	7,1÷13,8	25,5÷30,9	12,3÷21,6
ГИЖ – 272 0,5 г/кг	♂	23,9	21,4*	-8,6*	24,3	0,9	26,6*	10,2
		23,1÷24,2	21,2÷21,8	-11,3÷-5,6	23,8÷25,6	-1,7÷6,7	25,1÷27,1	3,7÷13,9
ГИЖ – 272 1 г/кг	♂	22,8	20,5*	-10,4*	25,0*	13,0	27,6*	23,0
		22,3÷23,8	20,0÷21,1	-12,7÷-9,4	24,8÷26,3	5,7÷15,9	27,0÷30,0	12,9÷33,8
ГИЖ – 272 2 г/кг	♂	23,3	20,0*	-14,9*	25,7*	7,8	30,9*	28,9*
		23,1÷24,0	19,6÷20,4	-15,7÷-13,9	25,1÷27,4	6,3÷17,6	29,7÷32,6	28,1÷39,9
ГИЖ – 272 3 г/кг	♂	19,6	16,9**	-11,5*	19,2	-2,5	21,8*	12,7
		18,2÷21,0	16,3÷18,1	-13,0÷-11,4	17,1÷22,1	-6,3÷3,8	20,6÷26,9	8,6÷26,3

Примечания: данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки; оценку значимости различий между выборочными средними осуществляли при условии, что статистическая совокупность включает не менее 4 наблюдений (числовых значений); * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных; ■ — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с исходными данными.

Notes: the data are presented in the form of an average and a standard error; the significance of the differences between the sample averages was assessed provided that the statistical population includes at least 4 observations (numerical values); * — statistically significant differences ($p < 0.05$) compared with the control group of animals; ■ — statistically significant differences

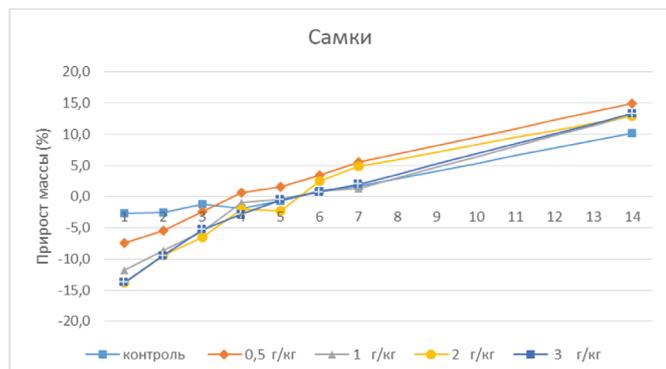


Рис. 3. Динамика прироста массы тела (%) у самок мышей при внутрибрюшинном введении ГИЖ-272 в дозах 0,5; 1, 2 и 3 г/кг

Fig. 3. Dynamics of body weight gain (%) in female mice after intraperitoneally administration of GIZH-272 at doses of 0,5; 1, 2 and 3 g/kg

тела мышей стала возрастать, но отрицательная динамика прироста массы тела сохранялась ещё и на 3-й день (все группы, кроме 0,5 г/кг), на 4–5 сутки (самки всех опытных групп, самцы — 3 г/кг). К окончанию недели и на седьмые сутки отрицательный показатель прироста массы тела регистрировался только у самцов в дозе 3 г/кг. Значимые различия в приросте экспериментальных групп с контролем имели место только первые трое суток. Исключение составили самцы, которым ввели ГИЖ-272 в дозе 3 г/кг. Всю первую неделю и на седьмые сутки прирост массы тела этих мышей был значимо ниже контрольного. И наоборот, прирост самок (0,5 г/кг) на 5-, 6- и 7-е дни превышал контрольный уровень в среднем в 2 раза. К окончанию эксперимента значимые различия с контролем сохранялись только у самцов (2 г/кг), где показатель прироста превысил контрольный на 71 % (табл. 2, рис. 3 и 4).

Заключение / Conclusion

При изучении острой токсичности соединения ГИЖ-272 на аутбредных мышах обоего пола при внутрибрюшинном и пероральном введении определение средней смертельной дозы не представлялось возможным из-за отсутствия гибели животных в условиях достижения максимально допустимых объёмов введения и концентраций соединения [10].

Исходя из полученных данных соединение ГИЖ-272 может быть отнесено к 5 классу токсичности —

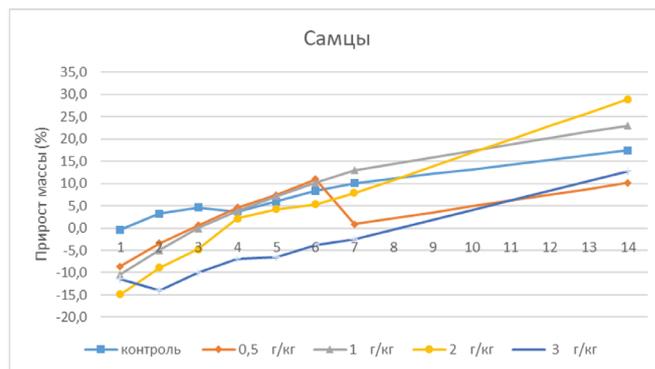


Рис. 4. Динамика прироста массы тела (%) у самцов мышей при внутрибрюшинном введении ГИЖ-272 в дозах 0,5; 1, 2 и 3 г/кг

Fig. 4. Dynamics of body weight gain (%) in male mice after intraperitoneally administration of GIZH-272 at doses of 0,5; 1, 2 and 3 g/kg

практически нетоксичное (по классификации Сидорова К.К. — 1973 г.). В соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 соединение ГИЖ-272 относится к 4 классу опасности (вещество малоопасное) для перорального способа введения.

Исследование выполнено в рамках темы 122020100334-2 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (в 2023 году реорганизован в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Authors' participation. All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Financing. The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Алексеева Светлана Витальевна*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1262-6997>

SPIN-код: 8985-3418

с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Svetlana V. Alekseeva*Corresponding author*

e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1262-6997>

SPIN code: 8985-3418

Senior researcher of the laboratory of drug toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Сорокина Александра ВалериановнаORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Alexandra V. SorokinaORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

PhD, Cand. Sci. (Biology), leading researcher of the laboratory of drug toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Волкова Анна Валерьевна

с. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Anna V. Volkova

Senior researcher of the laboratory of psychopharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Мирошкина Ирина АлександровнаORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN-код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Irina A. MiroshkinaORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN code: 4697-7938

Researcher scientist of the laboratory of drug toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Качалов Кирилл Сергеевич

SPIN-код: 2992-6789

м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Kirill S. Kachalov

SPIN code: 2992-6789

Junior researcher of the laboratory of drug toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Алексеев Иван Владимирович

SPIN-код: 9757-6210

инженер лаборатории фармакологии мутагенеза ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Ivan V. Alekseev

SPIN code: 9757-6210

engineer of the laboratory of pharmacology of Mutagenesis Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Захаров Алексей Дмитриевич

SPIN-код: 9013-6228

м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Aleksey D. Zakharov

SPIN code: 9013-6228

Junior researcher of the laboratory of drug toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Дурнев Андрей Дмитриевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

SPIN-код: 8426-0380

д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. отделом лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Andrei D. Durnev

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

SPIN code: 8426-0380

Dr. Sci. (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Кутепова И.С., Литвинова С.А., Воронина Т.А., и др. Противосудорожная активность производных дибензофурана в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019;82(8):3–8. DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-8-3-8.

Kutepova IS, Litvinova SA, Voronina TA, et al. Anticonvulsant activity of dibenzofuran derivatives: experimental screening. *Exper Clin Pharmacol*. 2019;82(8):3–8. (In Russ.). DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-8-3-8.

2. Литвинова С.А., Кутепова И.С., Курза Е.В., и др. Противоишемические и цереброваскулярные свойства производного оксима дибензофурана ГИЖ-272. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019;82(6):3–7. DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-6-3-7.

Litvinova SA, Kutepova IS, Kurza EV, et al. Anti-ischemic and cerebrovascular properties of dibenzofuran oxime derivative GIZh-272. *Exper Clin Pharmacol*. 2019;82(6):3–7. (In Russ.). DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-6-3-7.

3. Кутепова И.С., Литвинова С.А., Воронина Т.А., Жмуренко Л.А. Исследование нового производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на моделях очаговой эпилепсии и интрацеребральной посттравматической гематомы. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2020;83(9):3–8. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-9-3-8.

Kutepova IS, Litvinova SA, Voronina TA, Zhmurenko LA. Studying new dibenzofuran oxime derivative GIZh-272 on the models of focal epilepsy and intracerebral post-traumatic hematoma. *Exper Clin Pharmacol*. 2020;83(9):3–8. (In Russ.). DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-9-3-8.

4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. *Изучение острой токсичности*. М.: Гриф и К, 2012. С. 15–17.

Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part 1. Methodological recommendations for the study of the general toxic effect of medicines. *Study of acute toxicity*. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ.).

5. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств. РД 64-126-91. М.: МЗ России, ФК; 1992.

Rules of preclinical safety assessment of pharmacological agents. RD 64-126-91. Moscow: Ministry of Health of Russia, FC; 1992. (In Russ.).

6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. С. 41–47.

Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Methodological guidelines for the study of the general toxic effect of pharmacological substances. Moscow: Medicine, 2005. (In Russ.).

7. Проблема нормы в токсикологии [Текст] : (современные представления и метод. подходы, основные параметры и константы) / И.М. Трахтенберг, Р.Е. Сова, В.О. Шефтель, Ф.А. Оникиенко; под ред. И.М. Трахтенберга. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1991. 203.

Problema normy v toksikologii [Tekst] : (sovremennye predstavleniya i metod. podhody, osnovnye parametry i konstanty). IM Trahtenberg, RE Sova, VO SHeftel', FA Onikienko; Ed. by IM Trahtenberga. Moscow: Medicine, 1991. (In Russ.).

8. Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека / Г.Н. Красовский, Ю.А. Рахманин, Н.А. Егорова. М.: Медицина, 2009. 206. Ekstrapolyaciya toksikologicheskikh dannyh s zhivotnyh na cheloveka / GN Krasovskij, YuA Rahmanin, NA Egorova. Moscow: Medicina, 2009. (In Russ.).

9. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910.

10. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003;37(3):32–34.

Berezovskaya IV. Classification of chemicals according to the parameters of acute toxicity in parenteral methods of administration. *Chemical and pharmaceutical journal*. 2003;37(3):32–34. (In Russ.).

Сравнительная оценка лекарственных препаратов с действующим веществом фебуксостат различных производителей, представленных на рынке РФ, на основании исследования теста кинетики растворения

Денькина С. В., Гадаев М. Ю., Гребенкин Д. Ю., Рябова А. В., Кисляков И. В.

ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Введение. На фармацевтическом рынке РФ широко представлены лекарственные препараты для лечения подагры, в том числе с МНН фебуксостат. Данные препараты отличаются как по составу вспомогательных компонентов, так и по лекарственной форме (таблетки и капсулы) и технологии производства. Для оценки скорости и степени высвобождения действующего вещества для лекарственных препаратов с МНН фебуксостат различных производителей был выбран тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР), который позволяет в условия *in vitro* предположить высвобождение действующего вещества из лекарственной формы *in vivo*. Скорость и степень высвобождения действующего вещества являются факторами, которые оказывают непосредственное влияние на биодоступность лекарственных препаратов. Изучение кинетики растворения проводилось для трёх лекарственных препаратов фебуксостата: Подагрель капсулы 80 мг (АО «АКРИХИН», Россия), Аденирик® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг (Берлин-Хеми АГ Германия) и Азурикс® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг (АО «АЛИУМ», Россия) с использованием среды фосфатного буферного раствора с pH 6,8. Отбор проб среды осуществлялся на временных точках 0 мин, 5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 30 и 45 мин. Анализ полученных растворов производился с помощью метода УФ-спектрофотометрии при длине волны 317 нм. Сопоставление кинетики высвобождения осуществлялось в соответствии с требованиями Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов ЕАЭС.

Цель исследования. Целью настоящего исследования являлось сопоставление кинетики растворения лекарственных препаратов: Подагрель капсулы 80 мг (АО «АКРИХИН», Россия), Аденирик® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг (Берлин-Хеми АГ, Германия) и Азурикс® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг (АО «АЛИУМ», Россия) в целях выборочного сравнения препаратов с МНН фебуксостат, зарегистрированных на территории РФ в виде таблеток и капсул. **Материалы и методы.** Исследование ТСКР проводили с использованием тестера растворения Sotax AT Xtend, Швейцария. Каждый лекарственный препарат анализировали в 12 повторах в среде растворения фосфатный буфер pH 6,8, на аппарате «Лопастная мешалка», для капсульных лекарственных форм применялись специальные грузила. Отобранные пробы анализировали на УФ-спектрофотометре Shimadzu UV 1800, Япония, при длине волны 317 нм. **Результаты.** Изучена кинетика растворения для трёх лекарственных препаратов с действующим веществом фебуксостат: Подагрель капсулы 80 мг (АО «АКРИХИН», Россия), Аденирик® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг (Берлин-Хеми АГ Германия) и Азурикс® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг (АО «АЛИУМ», Россия) с использованием среды фосфатного буферного раствора с pH 6,8 и отбором проб среды, осуществлявшимся на временных точках 0 мин, 5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 30 и 45 мин. Для изученных лекарственных препаратов наблюдалось высвобождение фебуксостата более 85 % на 15-й минуте, что позволило установить эквивалентность профилей высвобождения без дальнейшей математической обработки. **Заключение.** На основании результатов ТСКР не было обнаружено различий в кинетике высвобождения фебуксостата из лекарственных препаратов, представленных в различных лекарственных формах (таблетками и капсулами).

Ключевые слова: фебуксостат; ТСКР; таблетки; капсулы; лекарственные формы

Для цитирования:

Денькина С. В., Гадаев М. Ю., Гребенкин Д. Ю., Рябова А. В., Кисляков И. В. Сравнительная оценка лекарственных препаратов с действующим веществом фебуксостат различных производителей, представленных на рынке РФ, на основании исследования теста кинетики растворения. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):70–82. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-70-82>

Поступила: 07.12.2023. **В доработанном виде:** 17.12.2023. **Принята к печати:** 24.12.2023. **Опубликована:** 30.12.2023.

In-vitro dissolution profiles comparison for various drugs with active ingredient Febuxostat commercially available on the Russian market

Sofia V. Denkina, Murtuzali Y. Gadaev, Dmitry Yu. Grebenkin, Anastasia V. Ryabova, Ivan V. Kislyakov

Exacte Labs LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. Introduction. Gout treatment drugs are widely represented on the pharmaceutical market of the Russian Federation, including those with INN febuxostat. These drugs differ in excipients composition, in the dosage form (tablets and capsules) and production technology. The Dissolution Kinetics Test was chosen to assess the rate and extent of active ingredient release for drugs with INN febuxostat for different manufacturers as *in vitro* test dissolution allows to suggest the release from the dosage form *in vivo*. The rate and percent of active substance release are factors that have a direct impact on the bioavailability of drugs. Drug release was studied in a phosphate buffer solution pH 6.8, sampling was carried out at time points 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 and 45 min. The analysis of the obtained solutions was carried out using the UV spectrophotometry method at a wavelength of 317 nm. The comparison of dissolution profiles was carried out in accordance with the requirements of Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated November 3, 2016 N 85 "On approval of the Rules for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union". The purpose of the study. The purpose of this study was to compare the kinetics of the release of the active substance febuxostat from drugs registered in the territory of the Russian Federation in the form of tablets and capsules. Materials and methods. Drug release studies were performed using the Sotax dissolution tester AT Xtend, Switzerland. Each drug was analyzed in 12 repetitions in a pH 6.8 phosphate buffer dissolution medium, on a "Paddle apparatus", special sinkers were used for capsule dosage forms. The selected samples were analyzed on a Shimadzu UV 1800 UV spectrophotometer, Japan, at a wavelength of 317 nm. Results. Dissolution profile studies for three drugs with the active substance febuxostat were conducted in a phosphate buffer solution pH 6.8. For the studied drugs, the release of febuxostat was observed to be more than 85 % at 15 minutes. The release profiles can be recognized as

equivalent without further mathematical processing. Conclusion. Based on the results of dissolution profile studies, no differences were found in dissolution profiles of febuxostat from drugs with different dosage forms (tablets and capsules).

Keywords: febuxostat; dissolution profile studies; tablets; capsules; dosage forms

For citations:

Denkina SV, Gadaev MY, Grebenkin DYu, Ryabova AV, Kislyakov IV. *In-vitro* dissolution profiles comparison of various drugs with the active ingredient Febuxostat commercially available on the Russian market. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):70–82. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-70-82X>

Received: 07.12.2023. **Revision received:** 17.12.2023. **Accepted:** 24.12.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

За последние несколько десятилетий распространённость заболеваемости подагрой увеличилась, а профиль клинической картины стал всё более сложным [1]. Данное заболевание сопровождается отложением кристаллов мочевой кислоты в суставах или в тканях вокруг суставов в результате гиперурикемии. Ингибиторы ксантиноксидазы по-прежнему остаются препаратами первой линии в соответствии с рекомендациями руководств по лечению. Фебуксостат является непуриновым селективным ингибитором фермента ксантиноксидазы, участвующим в катаболизме пуринов [2]. Лечение фебуксостатом подавляет превращение ксантина в мочевую кислоту, что в свою очередь приводит к снижению уровня мочевой кислоты в крови человека [3].

Для классификации фармацевтических субстанций по степени их растворимости и всасыванию через кишечный барьер в системный кровоток широко применяется биофармацевтическая классификационная система (БКС). В соответствии с данной классификацией фебуксостат (рис. 1) относится ко II классу и обладает высокой кишечной проницаемостью и низкой растворимостью [4]. Недостаточная растворимость может приводить к снижению биодоступности лекарственных препаратов для перорального применения, выпускаемых в твёрдых лекарственных формах, и как следствие, оказывать влияние на терапевтический эффект. Таким образом, одной из задач, которую необходимо решить в процессе производства препаратов с МНН фебуксостат — повышение растворимости субстанции.

На скорость и степень растворения лекарственного препарата влияют несколько факторов, среди которых характеристики действующего вещества: растворимость субстанции, форма и размер частиц, кристалличность, полиморфизм и стереохимические факторы [5], а также лекарственная форма и технология её получения.

Для улучшения растворения фебуксостата применяются разные технические подходы при производстве лекарственной формы. Биодоступность при пероральном приёме может быть улучшена получением аморфной твёрдой дисперсии с коллидоном и гидроксипропилметилцеллюлозой методом распылительной сушки [6]. Такая технология обеспечивает быструю скорость растворения и улучшенную проницаемость

препарата по сравнению со свободным лекарственным средством.

Иные стратегии увеличения растворимости и скорости растворения включают: уменьшение размера частиц; химическую модификацию, при которой соли и пролекарство образуются путём включения полярных или ионизируемых фрагментов в исходное лекарственное средство; использование поверхностно-активных веществ, комплексообразователей и т. д. [7, 8].

Наиболее доступным и популярным методом улучшения высвобождения таблетированного лекарственного средства является включение совместно обработанных вспомогательных веществ (СОВВ) (англ. *co-processed excipients*) в его состав. Разработка СОВВ начинается с выбора вспомогательных веществ, их технологии совместной обработки и соотношения, и заканчивается оптимизацией параметров процесса совместной обработки. Различные методы (распылительная сушка, влажная грануляция, грануляция распылением в псевдооживленном слое и т. д.), которые могут быть использованы для совместной обработки фармацевтических вспомогательных веществ, основаны на совместимости, термостабильности, кристалличности, растворимости в определённых растворителях и других физических свойствах вспомогательных веществ, которые будут использоваться в комбинации.

Имеющийся на сегодняшний день широкий ассортимент существующих вспомогательных веществ позволяет создавать различные комбинации с целью улучшения физических и технологических свойств [9–11].

Согласно данным ГРЛС, на территории РФ зарегистрированы лекарственные препараты с МНН фебуксостат в двух лекарственных формах — таблетки, покрытые плёночной оболочкой, и капсулы. Причём только у одного производителя зарегистрирована лекарственная форма фебуксостата — капсулы.

Технология производства капсул и таблеток отличается, в связи с этим, возникает необходимость сравнить коммерчески доступные препараты на основании кинетики высвобождения действующего вещества. В процессе выбора дизайна исследования в качестве среды растворения был выбран фосфатный буферный раствор pH 6,8, как имитирующий pH в среднем отделе тонкого кишечника и обладающий наибольшей дискриминаторной способностью для изучаемых препаратов.

Материалы и методы / Materials and methods

Действующее вещество

Фебуксостат — 4-Метил-2-[4-(2-метилпропокси)-3-цианофенил]-1,3-тиазол-5-карбоновая кислота (рис. 1) представляет собой белый кристаллический порошок, слегка гигроскопичный, который растворим при комнатной температуре в ацетоне, умеренно растворим в этилацетате и 1-октаноле, мало растворим в этаноле и метаноле и нерастворим в воде. Фебуксостат нерастворим в водных буферных растворах с pH 1,0 и 4,5 и мало растворим при 37 °С в водном растворе с pH 7,5 [4]. Фебуксостат обладает кислотными свойствами pKa 3,08 [12].

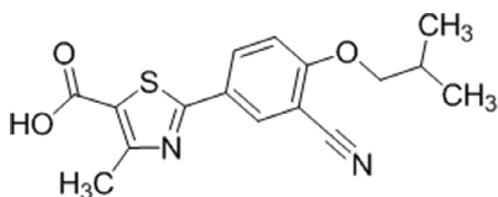


Рис. 1. Структурная формула фебуксостата
Fig. 1. Structure of febuxostat

Объекты исследования

Объектами исследования являлись три лекарственных препарата, отличающихся по составу вспомогательных компонентов, лекарственной форме и производителям:

Подагрель (фебуксостат), капсулы 80 мг (АО «АКРИХИН», Россия)¹;

Аденурик® (фебуксостат), таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг (Берлин-Хеми АГ, Германия)²;

Азурикс® (фебуксостат) таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг, (АО «АЛИУМ», Россия)³.

Оборудование

Изучение кинетики высвобождения действующего вещества проводили на тестере для определения растворения Sotax AT Xtend производства Швейцарии. Количественное определение высвободившегося АФИ проводили с помощью УФ-спектрофотометра Shimadzu UV 1800 производства Японии. Приготовление растворов проводили с применением электронных весов BM20, AND, Япония и аналитических весов PA 64 Pioneer, OHAUS Corporation, США. Контроль pH буферных растворов с точность до ±0,05 проводили на pH-метре SevenCompact pH/Ion, MettlerToledo, Швейцария. Воду очищенную для проведения исследования получали методом обратного осмоса на

системе УВОИ-МФ, Медиана Фильтр, Россия. На момент проведения исследования все оборудование прошло поверку/аттестацию.

Реактивы

Для проведения исследования использовали следующие реактивы: Дигидроортофосфат калия, ОСЧ, ХимМед, Россия; гидроксид натрия, ХЧ, ХимМед, Россия; кислота ортофосфорная, 85 %, Pallav, Индия; метанол для хроматографии, Carlo Erba, Франция. Все реактивы на момент исследования имели валидный срок годности.

Условие проведения испытания

Условия теста кинетики растворения определялись в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ и валидированной методики. Тест проводился с использованием аппарата «Лопастная мешалка» (Sotax AT Xtend) при скорости вращения 75 об/мин при температуре 37,0±0,5 °С в среде фосфатного буферного раствора с pH 6,8. При выборе дизайна исследования также принимали во внимание рекомендации Базы данных методов растворения FDA (Dissolution Methods Database FDA). В качестве контрольных точек были выбраны следующие: 0, 5, 10, 15, 20, 30 и 45 мин. Точки были распределены равномерно так, чтобы достоверно отображать критические этапы высвобождения действующего вещества и интервал высвобождения соответствующий плато. Точка 0 мин отбиралась непосредственно перед стартом исследования и использовалась для контроля чистоты среды растворения и оборудования на предмет контаминации действующим веществом.

Для приготовления среды растворения использовали воду очищенную, калия дигидрофосфат и натрия гидроксид. После растворения реактивов с применением ультразвуковой ванны, среду перемешивали на магнитной мешалке, измеряли pH и доводили до целевого значения pH 6,80 ± 0,05 путём добавления раствора фосфорной кислоты или натрия гидроксида. Среду растворения фильтровали через мембранный нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазировали при перемешивании под вакуумом в течение 5 мин непосредственно перед использованием. Для всех лекарственных препаратов методика приготовления среды была одинаковой.

Приготовление стандартного раствора проводили растворением точной навески субстанции фебуксостата производства Pliva Croatia Ltd (серия 7SM104330450320, срок годности до 05.2025) в метаноле при обработке на ультразвуковой ванне до получения прозрачного раствора. Далее проводили разведение полученного раствора в среде буферного раствора (фосфатного) с pH 6,8 для получения концентрации 5,32 мкг/мл. Стандартный раствор готовили в двух повторностях (1) и (2) из разных навесок для проведения проверки пригодности аналитической последовательности и проверки фактора сходимости.

¹ Серия 4460123, годен до 01.2025.

² Серия 29098, годен до 12.2025.

³ Серия 70322, годен до 03.2025.

В сосуд тестера растворения помещали 900 мл среды растворения и термостатировали при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С. После термостатирования помещали по одной лекарственной форме в каждый сосуд растворения и сразу начинали перемешивание. Во временные точки 0, 5, 10, 15, 20, 30 и 45 минут немедленно отбирали пробы (объём пробы — 10 мл) из каждого сосуда и фильтровали через мембранный фильтр из поливинилиденфторида (PVDF) с размером пор 0,45 мкм, утилизируя без использования первые 1–2 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 50 мл отмеряли 3 мл фильтрата, объём раствора довели средой растворения до метки и перемешивали. Исследование проводили на 12 единицах таблеток/капсул каждого исследуемого препарата.

Количественное определение фебуксостата в пробе проводили методом УФ-спектрофотометрии путём определения оптической плотности раствора при длине волны 317 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм с применением среды растворения в качестве раствора сравнения.

Количество фебуксостата в пробе рассчитывали по формуле (1):

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 900 \cdot P}{A_0 \cdot V \cdot 100 \cdot L}, \quad (1)$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 — оптическая плотность стандартного раствора фебуксостата; a_0 — навеска субстанции фебуксостата, использованная для приготовления стандартного раствора (миллиграмм, мг); V — объём фильтрата, использованный для приготовления испытуемого раствора (миллилитр, мл); P — содержание фебуксостата в субстанции с учётом поправки на содержание воды, %; L — заявленное содержание фебуксостат в лекарственной форме, мг.

В процессе отбора проб происходило снижение объёма среды растворения. Проводили расчёт процентного содержания высвободившего вещества Q_i с поправкой на снижение объёма среды в процессе отбора проб в i -ой временной точке (в среднем, в процентах) в соответствии с формулой ниже:

$$Q_i = \left[X_i \left(1 - (i-1) \cdot \frac{10}{V} \right) \right] + \left[\frac{10}{V} \sum_{n=2}^{n=i} X_{(n-1)} \right],$$

где X — количество действующего вещества, перешедшее в раствор в i -ой временной точке, %; V — начальный объём среды растворения (мл); 10 — объём отбираемой пробы (мл).

Испытуемые растворы распределяли по аналитическим последовательностям в порядке проведения исследования, сначала анализируя пробы, полученные в рамках первой загрузки в шести сосудах тестера растворения с порядковыми номерами от 1 до 6, затем в рамках новой аналитической последовательности пробы, полученные после второй загрузки тестера

растворения с 7 по 12. Внутри каждой отдельной аналитической последовательности испытуемые растворы располагали в порядке выполнения отбора проб (от 0 до 45 мин), по увеличению предполагаемых концентраций.

Для каждой аналитической последовательности каждый раз перед анализом испытуемых растворов проводили проверку пригодности на основании расчёта относительного стандартного отклонения для шести измерений стандартного раствора 1, а также на основании расчёта фактора сходимости для стандартного раствора 1 и 2.

Фактор сходимости между двумя стандартными растворами вычисляли по формуле:

$$F = \frac{A_{std1} \cdot a_{std2} \cdot 100}{A_{std2} \cdot a_{std1}} - 100,$$

где A_{std1} — средняя оптическая плотность по данным шести измерений стандартного раствора 1; A_{std2} — оптическая плотность стандартного раствора 2; a_{std1} — навеска для стандартного раствора 1 (миллиграмм); a_{std2} — навеска для стандартного раствора 2 (мг).

Критерии приемлемости: значения для ОСО по шести изменениям соответствовали параметру не более 2,0 %, для фактора сходимости стандартного раствора 1 и 2 отклонение не превышало по модулю 2,0 %. Все аналитические последовательности соответствовали указанным критериям, что подтверждает достоверность полученных результатов.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Качественное сравнение состава лекарственных средств

Как уже было упомянуто ранее, существуют способы улучшения высвобождения действующего вещества с помощью вспомогательных компонентов и модификации покрытия лекарственной формы, поэтому важно провести качественное сравнение составов исследуемых лекарственных препаратов.

В табл. 3 показаны входящие в состав ЛП вспомогательные компоненты, а также их назначения [13]. Составы вспомогательных веществ в препаратах Подагрель и Аденирикс® качественно сопоставимы несмотря на различные лекарственные формы (капсулы и таблетки, соответственно). В препарате Азурикс® некоторые вспомогательные компоненты заменены аналогичными по назначениям, что иногда может повлиять на высвобождение действующего вещества.

Значительный вклад в кинетику высвобождения вносит оболочка лекарственных препаратов. Из данных, приведённых из табл. 4, видно, что препараты Аденирикс® и Азурикс® отличаются покрывающим агентом и средней молекулярной массой макрогола. Прямое сравнение этих двух препаратов с Подагрелем,

Таблица 1

Пример аналитической последовательности

Table 1

Analytic Sequence Example

Наименование	Значение оптической плотности
Blank pH_6,8_1	-0,0001
Standard_1_1	0,3928
Standard_1_2	0,3924
Standard_1_3	0,3921
Standard_1_4	0,3922
Standard_1_5	0,3921
Standard_1_6	0,3918
Standard_2_1	0,3880
Standard_2_2	0,3880
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_0_min_1	0,0016
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_0_min_2	-0,0002
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_0_min_3	-0,0006
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_0_min_4	-0,0009
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_0_min_5	-0,0002
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_0_min_6	-0,0002
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_5_min_1	0,3598
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_5_min_2	0,3852
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_5_min_3	0,3764
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_5_min_4	0,3709
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_5_min_5	0,3684
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_5_min_6	0,3868
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_10_min_1	0,4020
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_10_min_2	0,3837
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_10_min_3	0,3957
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_10_min_4	0,4012
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_10_min_5	0,3838
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_10_min_6	0,4004
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_15_min_1	0,3865
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_15_min_2	0,3981
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_15_min_3	0,3958
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_15_min_4	0,3998
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_15_min_5	0,4001
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_15_min_6	0,3865
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_20_min_1	0,3950
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_20_min_2	0,3912
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_20_min_3	0,3896
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_20_min_4	0,3890
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_20_min_5	0,3916
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_20_min_6	0,4030
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_30_min_1	0,3865
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_30_min_2	0,4047
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_30_min_3	0,3946
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_30_min_4	0,3985
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_30_min_5	0,3933
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_30_min_6	0,4063
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_45_min_1	0,3909
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_45_min_2	0,4023
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_45_min_3	0,3997
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_45_min_4	0,3978
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_45_min_5	0,3941
Azurix_80mg_70322_pH_6,8_45_min_6	0,4055
Standard_1_7	0,3928
Standard_2_3	0,3891
Blank pH_6,8_2	0,0009

Таблица 2

Параметры пригодности для аналитических серий

Table 2

Suitability parameters for analytical sequence

Наименование препарата и порядковые номера проб	Наименование аналитической последовательности	ОСО оптической плотности стандартного раствора 1, %	Фактор сходимости между стандартным раствором 1 и 2, %
Подагрель, Образцы 1–6	Podagrel_6.8_4460123_1	0,05	0,59
Подагрель, Образцы 7–12	Podagrel_6.8_4460123_2	0,16	0,23
Аденурик®, Образцы 1–6	Adenuric_6.8_29098_1	0,04	0,20
Аденурик®, Образцы 7–12	Adenuric_6.8_29098_2	0,05	0,16
Азурикс®, Образцы 1–6	Azurix_6.8_70322_1	0,09	0,65
Азурикс®, Образцы 7–12	Azurix_6.8_70322_2	0,08	0,30

Таблица 3

Качественное сравнение состава вспомогательных веществ в исследуемых препаратах

Table 3

Qualitative comparison of the composition of excipients in the studied preparations

Компонент Component	Исследуемый препарат Test drug			Назначение Purpose
	Подагрель Podagrel	Аденурик® Adenuric®	Азурикс® Azurix®	
Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	+	+	–	Наполнитель и разбавитель
Целлюлоза микрокристаллическая Microcrystalline cellulose	+	+	+	Наполнитель
Гипролоза Hypromellose	+	+	–	Эмульгатор, загуститель, стабилизирующий агент
Кроскармеллоза натрия Croscarmellose Sodium	+	+	–	Разрыхлитель
Кремний диоксид коллоидный Colloidal silicon dioxide	+	+	+	Адсорбент; средство против слеживания; стабилизатор эмульсии; скользящий агент; суспендирующий агент; разрыхлитель таблеток; термостабилизатор; средство, повышающее вязкость
Магния стеарат Magnesium stearate	+	+	+	Смазка для таблеток и капсул
Маннитол Mannitol	–	–	+	Разбавитель; пластификатор; подсластитель; разбавитель для таблеток и капсул
Натрия гидрокарбонат Sodium bicarbonate	–	–	+	Подщелачивающий агент, разрыхлитель
Натрия лаурилсульфат Sodium lauryl sulfate	–	–	+	Анионное поверхностно-активное вещество; детергент; эмульгатор; средство, проникающее в кожу; смачивающий агент; смазывающий агент при производстве таблеток и капсул
Тальк Talcum	–	–	+	Противослеживающее, скользящее средство; смазывающий агент при производстве таблеток и капсул; применяется в качестве разбавителя для таблеток и капсул

Качественное сравнение состава оболочки исследуемых препаратов

Table 4

Shell composition qualitative comparison for drugs

Компонент Component	Исследуемый препарат Test drug			Функция Function
	Подагрель Podagrel	Аденурик® Adenuric®	Азурик® Azurix®	
Поливиниловый спирт Polyvinyl alcohol	–	+	–	Покрывающий агент; стабилизирующее, смазывающее вспомогательное вещество
Титана диоксид Titanium dioxide	+	+	+	Краситель; покрывающий агент;
Макрогол 3350 Macrogol 3350	–	+	–	Пластификатор; растворитель; используется в качестве основы суппозиторий; смазывающий агент при производстве таблеток и капсул
Тальк Talcum	–	+	+	Скользящее, противослеживающее средство; применяется как разбавитель для таблеток и капсул; смазка для таблеток и капсул
Железа оксид жёлтый Iron Oxide Yellow	+	+	+	Краситель
Гипромеллоза Hypromellose	–	–	+	Покрывающий агент; диспергирующий агент; усилитель растворения; эмульгирующий агент; стабилизирующий агент
Макрогол 6000 Macrogol 6000	–	–	+	Пластификатор; растворитель; основа для суппозиторий; смазка для таблеток и капсул
Желатин Gelatin	+	–	–	Покрывающий агент; плёнообразующее вещество
Железа оксид красный Iron Oxide Red	+	–	–	Краситель
Железа оксид чёрный Iron Oxide Black	+	–	–	Краситель

представленном в виде капсул некорректно, состав последнего приведён в табл.4 в информационных целях.

Подтверждение подлинности

УФ-спектры поглощения испытуемых растворов исследуемых лекарственных препаратов и стандартного образца фебуксостата в фосфатном буферном растворе в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм были проанализированы перед проведением исследования. Испытуемые растворы исследуемых лекарственных препаратов и стандартного образца фебуксостата имеют максимумы и минимумы при одних и тех же длинах волн (рис. 2–5).

Обсуждение результатов ТСКР

Индивидуальные и усреднённые значения процента высвобождения фебуксостата из исследуемых лекарственных препаратов представлены в табл. 5–8.

В соответствии с требованиями Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов ЕАЭС [14] в процессе оценки результатов высвобождения следует обращать внимание на скорость высвобождения действующего вещества, так

если в течение первых 15 мин более 85 % действующего вещества переходит в раствор, кинетику растворения можно рассматривать как эквивалентную без дальнейшего математического анализа данных. В данном случае нет необходимости проводить расчёт значений факторов подобия f_2 для исследуемого и референтного препаратов. Другим важным критерием оценки является величина относительного стандартного отклонения (ОСО) по результатам исследования 12 лекарственных форм в каждой временной точке. Величина ОСО среднего значения для первой временной точки не должна превышать 20 %, а для остальных точек — 10 %. Для изученных лекарственных препаратов полученные результаты соответствуют указанным критериям.

Заключение / Conclusion

Проведённое исследование не выявило значимых отличий в скорости высвобождения фебуксостата из различных лекарственных форм. Для всех исследуемых препаратов Подагрель (фебуксостат), капсулы 80 мг, серия 4460123, АО «АКРИХИН», Россия; Аденурик®

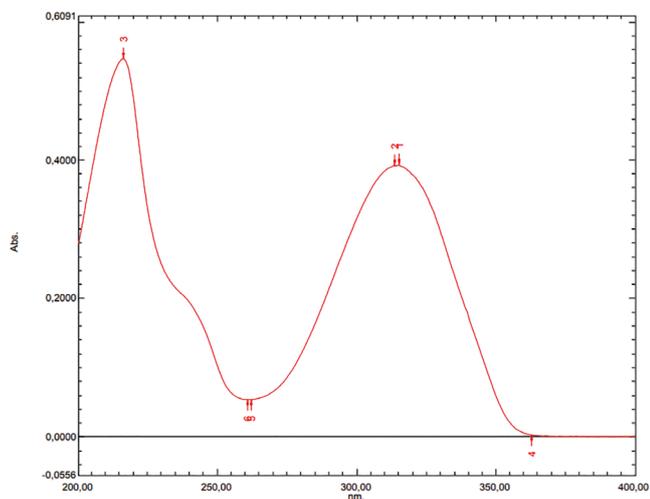


Рис. 2. УФ-спектр поглощения стандартного раствора фебуксостата
Fig. 2. Febuxostat standard solution UV absorption spectrum

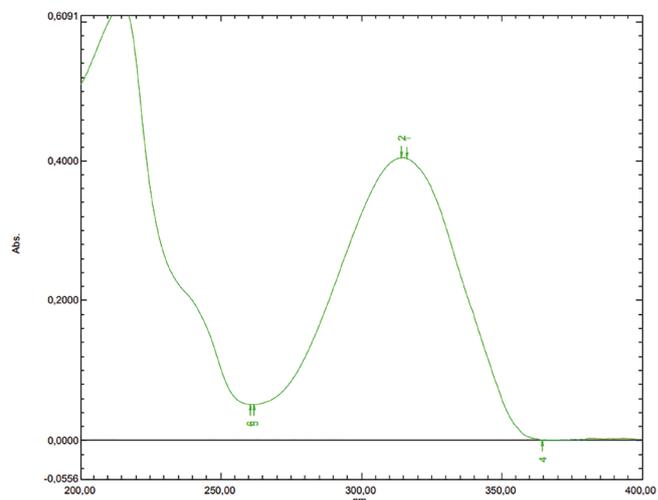


Рис. 3. УФ-спектр поглощения испытуемого раствора лекарственного препарата Подагрель
Fig. 3. Podagrel test solution UV absorption spectrum

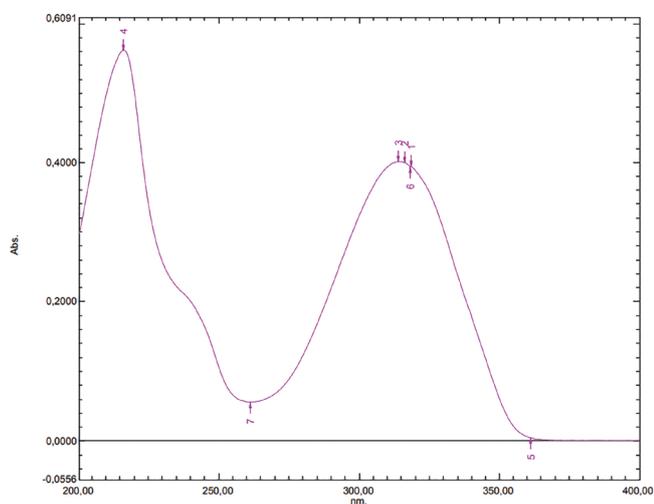


Рис. 4. УФ-спектр поглощения испытуемого раствора лекарственного препарата Аденурик®
Fig. 4. Adenuric® test solution UV absorption spectrum

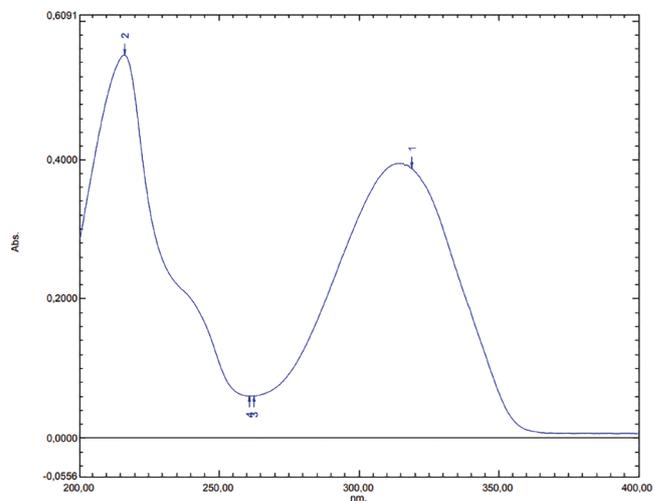


Рис. 5. УФ-спектра поглощения испытуемого раствора лекарственного препарата Азурикс®
Fig. 5. Azurix® test solution UV absorption spectrum

Таблица 5

Индивидуальные и усреднённые значения процента высвобождения фебуксостата из лекарственного препарата Подагрель капсулы 80 мг, серия 4460123, АО «АКРИХИН», Россия, фосфатный буферный раствор pH 6,8

Table 5

Individual and average febusostat release results for Podagrel capsules 80 mg, batch 4460123, "AKRIKHIN" JSC, Russia, phosphate buffer solution pH 6.8

№ пробы Sample number	0 мин 0 min	5 мин 5 min	10 мин 10 min	15 мин 15 min	20 мин 20 min	30 мин 30 min	45 мин 45 min
1	0	56,4	87,9	95,1	98,4	103,2	106,9
2	0	70,2	94,3	100,9	103,0	104,8	108,0
3	0	69,8	94,6	105,9	105,9	108,2	107,8
4	0	60,1	92,6	99,5	102,8	104,1	105,8
5	0	57,6	93,8	103,1	104,5	104,6	103,0
6	0	50,7	92,5	100,9	104,0	107,1	104,9
7	0	49,4	92,1	92,2	95,6	99,1	100,1
8	0	61,6	85,0	99,5	103,9	103,7	107,2
9	0	48,3	91,6	97,7	100,8	105,1	103,8
10	0	65,9	88,5	100,2	103,6	106,5	106,2
11	0	62,6	94,4	98,6	103,0	105,1	105,4
12	0	63,0	91,1	101,0	106,0	107,3	108,1
Среднее, % Average, %	0,0	59,6	91,5	99,6	102,6	104,9	105,6
OCO, % RSD, %	н/п	7,4	3,3	3,5	2,9	2,3	2,3

Таблица 6

Индивидуальные и усреднённые значения процента высвобождения фебуксостата из лекарственного препарата Аденирик® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг серия 29098, Берлин-Хеми АГ Германия, фосфатный буферный раствор pH 6,8

Table 6

Individual and average febusostat release results for Adenuric® film-coated tablets, 80 mg batch 29098, Berlin-Chemie AG Germany, phosphate buffer solution pH 6.8

№ пробы Sample number	0 мин 0 min	5 мин 5 min	10 мин 10 min	15 мин 15 min	20 мин 20 min	30 мин 30 min	45 мин 45 min
1	0	80,1	100,1	100,4	101,3	100,6	102,2
2	0	83,4	99,5	103,8	103,0	103,3	101,7
3	0	86,4	100,8	100,7	102,1	101,3	100,6
4	0	85,6	102,5	104,0	104,2	101,3	103,2
5	0	89,0	102,8	103,1	103,3	102,9	102,7
6	0	90,1	102,9	102,5	103,2	101,6	101,4
7	0	82,7	97,4	97,0	97,1	98,2	97,3
8	0	77,0	99,6	100,5	102,0	102,0	100,9
9	0	84,3	101,4	102,6	102,6	103,7	102,9
10	0	87,1	103,6	104,3	103,9	105,8	104,8
11	0	83,3	101,4	103,1	103,8	101,6	103,0
12	0	85,5	101,5	103,0	102,4	102,0	102,8
Среднее Average	0,0	84,6	101,1	102,1	102,4	102,0	101,9
OCO, % RSD, %	н/п	4,3	1,8	2,0	1,8	1,8	1,8

Таблица 7

Индивидуальные и усреднённые значения процента высвобождения фебуксостата из лекарственного препарата Азурикс® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг, серия 70322, АО «АЛИУМ», Россия, фосфатный буферный раствор pH 6,8

Table 7

Individual and average febusostat release results for Azurix® film-coated tablets, 80 mg, batch 70322, "ALIUM" JSC, Russia, phosphate buffer solution pH 6.8

№ пробы Sample number	0 мин 0 min	5 мин 5 min	10 мин 10 min	15 мин 15 min	20 мин 20 min	30 мин 30 min	45 мин 45 min
1	0	91,9	102,6	98,7	100,8	98,8	99,8
2	0	98,4	98,1	101,7	100,0	103,2	102,7
3	0	96,2	101,1	101,1	99,6	100,8	102,0
4	0	94,8	102,4	102,1	99,4	101,7	101,6
5	0	94,1	98,0	102,1	100,0	100,4	100,6
6	0	98,8	102,3	98,8	102,9	103,7	103,5
7	0	92,9	102,4	99,0	97,8	98,4	97,8
8	0	96,1	103,3	100,4	101,2	101,1	101,8
9	0	96,3	101,8	100,1	101,2	101,0	100,0
10	0	98,6	102,4	102,2	100,5	99,6	101,8
11	0	98,8	101,4	102,3	103,1	101,9	99,6
12	0	98,8	97,5	101,9	100,2	100,8	83,3
Среднее Average	0,0	96,3	101,1	100,9	100,6	101,0	99,5
OCO, % RSD, %	н/п	2,6	2,0	1,4	1,4	1,6	5,4

Таблица 8

Сводная таблица средних результатов высвобождения в процентах для фебуксостата из изученных лекарственных препаратов Подагрель капсулы 80 мг, серия 4460123, АО «АКРИХИН», Россия; Аденирикс® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг, серия 29098, Берлин-Хеми АГ Германия и Азурикс® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг серия 70322, АО «АЛИУМ», Россия, фосфатный буферный раствор pH 6,8

Table 8

Average febusostat release results for Podagrel capsules 80 mg, batch 4460123, AKRIHIN JSC, Russia; Adenuric® film-coated tablets 80 mg, batch 29098, Berlin-Chemie AG Germany and Azurix® film-coated tablets 80 mg batch 70322, ALIUM JSC, Russia, phosphate buffer solution pH 6.8

Время, мин/ наименования препарата Time, min/ names of the drug	Подагрель капсулы 80 мг АО «АКРИХИН», Россия, серия 4460123 Podagrel capsules 80 mg batch 4460123, «AKRIKHIN» JSC, Russia	Аденирикс® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг Берлин-Хеми АГ Германия, серия 29098 Adenuric® film-coated tablets 80 mg batch 29098, Berlin-Chemie AG Germany	Азурикс® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг АО «АЛИУМ», Россия, серия 70322 Azurix® film-coated tablets 80 mg batch 70322, «ALIUM» JSC, Russia
5	59,6	84,6	96,3
10	91,5	101,1	101,1
15	99,6	102,1	100,9
20	102,6	102,4	100,6
30	104,9	102,0	101,0
45	105,6	101,9	99,5

ФОСФАТНЫЙ БУФЕРНЫЙ РАСТВОР pH 6,8
PHOSPHATE BUFFER SOLUTION pH 6,8

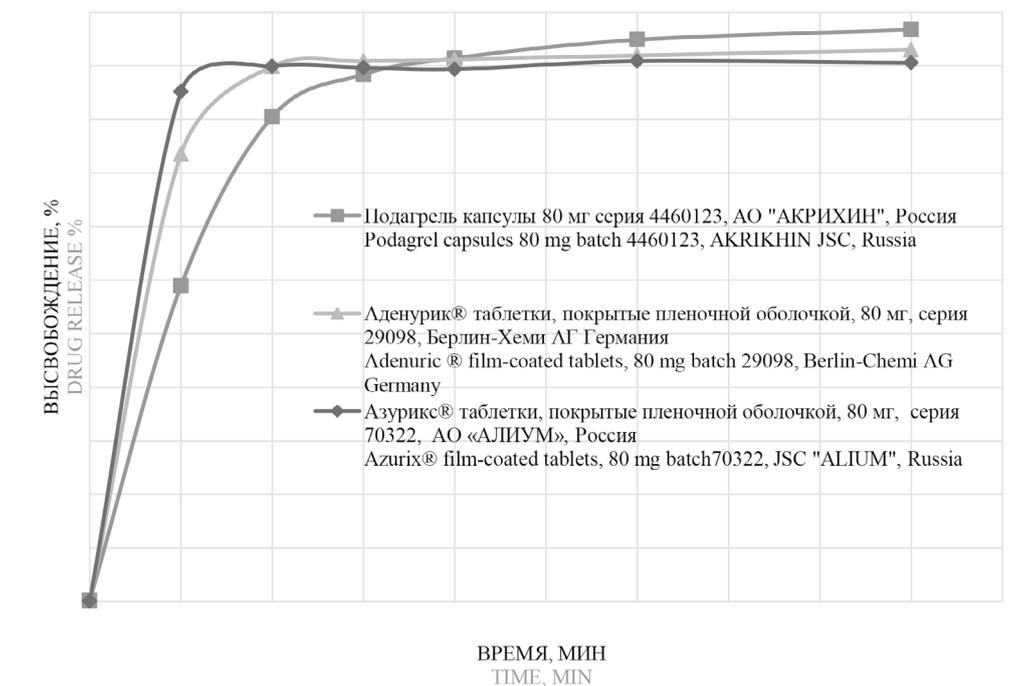


Рис. 6. Усреднённые профили процента высвобождения фебуксостата из лекарственных препаратов Подагрель капсулы 80 мг, серия 4460123, АО «АКРИХИН», Россия; Аденурик® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг, серия 29098, Берлин-Хеми АГ Германия и Азурикс® таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг, серия 70322, АО «АЛИУМ», Россия, фосфатный буферный раствор pH 6,8 (среда контроля качества)
Fig. 6. Febumostat release averaged profiles for Podagrel capsules 80 mg, batch 4460123, "AKRIKHIN" JSC, Russia, Adenurik® film-coated tablets, 80 mg, batch 29098, Berlin-Chemi AG Germany and Azurix® film-coated tablets, 80 mg, batch 70322, "ALIUM" JSC, Russia, phosphate buffer solution pH 6,8 (quality control medium)

(фебуксостат), таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг, серия 29098, Берлин-Хеми АГ, Германия и Азурикс® (фебуксостат), таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 80 мг, серия 70322, АО «АЛИУМ», Россия высвобождение фебуксостата составило более 85 % во временной точке 15 мин, что позволяет признать профили высвобождения действующего вещества эквивалентными. Результаты данного исследования подтверждают положительные результаты проведённого ранее исследования биоэквивалентности препарата Подагрель (фебуксостат), капсулы, АО «АКРИХИН», Россия и референтного препарата Аденурик® (фебуксостат), таблетки, покрытые плёночной оболочкой, Берлин-Хеми АГ, Германия [14], а совокупность этих данных позволяет рассматривать эффективность и безопасность препарата Подагрель как эквивалентные соответствующим характеристикам оригинального препарата Аденурик.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

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

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Участие авторов. Денькина С. В. и Рябова А. В. — координировали все этапы исследования ТКР; Гребенкин Д. Ю. — проводила аналитическую часть исследования и статистическую обработку полученных результатов; Кисляков И. В. и Гадаев М. Ю. — отвечали за оформление рукописи.

Participation of authors. Denkina SV and Ryabova AV coordinated all stages of dissolution profile studies; Grebenkin DYU conducted the analytical part of the study and statistical processing of the results; Kislyakov IV and Gadaev MY were responsible for the design of the manuscript.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Денькина Софья Владимировна

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-4411-8034>
к. х. н., Заведующая лабораторией
фармацевтического анализа ООО «Экзактэ
Лабс», Москва, Российская Федерация

Sofia V. Denkina

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-4411-8034>
PhD, Cand. Sci. Chem., Head of Laboratory, Phar-
maceutical Department of the Exacte Labs LLC,
Moscow, Russian Federation

Гадаев Муртузали Юнусович

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-1243-5749>
Ассистент отдела фармацевтического анализа
ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Российская
Федерация

Murtuzali Y. Gadaev

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-1243-5749>
Assistant, Pharmaceutical Department of the Exacte
Labs LLC, Moscow, Russian Federation

Гребенкин Дмитрий Юрьевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9304-8000>
к. фарм. н., заведующий лабораторией
исследований биотехнологических препаратов
ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Российская
Федерация

Dmitry Yu. Grebenkin

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9304-8000>
PhD, Cand. Pharm Sci., Head of the Laboratory for
Research of Biotechnological Drugs of the Exacte
Labs LLC, Moscow, Russian Federation

Рябова Анастасия Владимировна

Автор, ответственный за переписку
e-mail: anastasia.ryabova@exactelabs.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5785-2309>
Проектный менеджер отдела
фармацевтического анализа ООО «Экзактэ
Лабс», Москва, Российская Федерация

Anastasia V. Ryabova

Corresponding autor
e-mail: anastasia.ryabova@exactelabs.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5785-2309>
Project Manager, Pharmaceutical Department of
the Exacte Labs LLC, Moscow, Russian Federation

Кисляков Иван Владимирович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6306-857X>
Химик отдела фармацевтического анализа
ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Российская
Федерация

Ivan V. Kislyakov

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6306-857X>
Chemist, Pharmaceutical Department of the Exacte
Labs LLC, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Roddy E, Zhang W, Doherty M. The changing epidemiology of gout. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007 Aug;3(8):443–449. DOI: 10.1038/ncprheum0556.
2. Khosravan R, Grabowski BA, Wu JT, Joseph-Ridge N, Vernillet L. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of febuxostat, a non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase, in a dose escalation study in healthy subjects. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(8):821–841. DOI: 10.2165/00003088-200645080-00005.
3. Osada Y, Tsuchimoto M, Fukushima H, et al. Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents. *Eur J Pharmacol*. 1993 Sep 14;241(2-3):183–188. DOI: 10.1016/0014-2999(93)90201-r.
4. Committee for Medicinal Products for Human Use, Assessment report Febuxostat Krka, EMA/123663/2019. [online] Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/febuxostat-krka-epar-public-assessment-report_en.pdf [Accessed 05 June 2023].

5. Custodio JM, Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Mar 17;60(6):717–733. DOI: 10.1016/j.addr.2007.08.043.
6. Vaishali P, Anita P, Ashish S. Enhancing the dissolution rate of poorly soluble drug Febuxostat using spray dried amorphous solid dispersion technique. *Ars Pharm*. 2023;64(2):123–138. DOI: 10.30827/ars.v64i2.27058.
7. Kovvasu S, Kunamaneni P, Kunderu RS. Cyclodextrins and their application in enhancing the solubility, dissolution rate and bioavailability. *Innoriginal International Journal of Sciences*. 2018;5(5):25–34.
8. Zhang M, Li H, Lang B, et al. Formulation and delivery of improved amorphous fenofibrate solid dispersions prepared by thin film freezing. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012 Nov;82(3):534–544. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.06.016.
9. Kaur M, Mittal A, Gulati M, Sharma D, Kumar R. Formulation and *in vitro* Evaluation of Fast Dissolving Tablets of Febuxostat Using Co-Processed Excipients. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2020;14(1):48–62. DOI: 10.2174/1872211314666191224121044. P

10. Алексеев К.В., Блынская Е.В., Буева В.В. и др. Применение копроцессных вспомогательных веществ в технологии таблетированных лекарственных форм. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2019;3:43–48.

Alekseyev KV, Blynskaya EV, Bueva VV, et al. The use of co-processed excipients in solid dosage form technology. *Volgograd Journal of Medical Research*. 2019;3:43–48.

11. Vishal B, Ashwani KD, Bhawna C, Kumar G. Co-processed excipients: Recent advances and future perspective. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022;71(5-6):103316. DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103316

12. go.drugbank.com 2023. Febuxostat — DrugBank. [online] Available at: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB04854>> [Accessed 05 June 2023].

13. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2009. <http://repositorio.ub.edu.ar/handle/123456789/5143>.

14. Елисеев МС, Желябина ОВ. Рациональное использование рекомендаций по применению уратснижающей терапии: клинические примеры. *Современная ревматология*. 2022;16(3):85–90. doi: 10.14412/1996-7012-2022-3-85-90.

Eliseev MS, Zhelyabina OV. Rational use of recommendations for urate-lowering therapy: clinical examples. *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*. 2022;16(3):85–90. DOI: 10.14412/1996-7012-2022-3-85-90.

Разработка оптимальной схемы синтеза дипептидного лиганда TSPO, амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (ГД-102), потенциального анксиолитика

© Деева О. А.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация. Ранее в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был сконструирован и синтезирован дипептидный лиганд TSPO, соединение амид N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (лабораторный шифр ГД-102), для которого выявлена анксиолитическая активность в дозах 0,01–1,0 мг/кг внутривенно (в/в) у мышей. Дипептид ГД-102 также обладал антидепрессивной активностью в дозах 0,01 и 0,05 мг/кг в/б у мышей BALB/c в тесте вынужденного плавания по Порсолту. Лигандные свойства дипептида ГД-102 к TSPO были подтверждены методом фармакологического ингибиторного анализа и методом молекулярного докинга. Данная работа посвящена разработке оптимальной схемы синтеза дипептида ГД-102. Опробованы 3 метода: 1 метод — активированных сукцинимидных эфиров, 2 метод — активированных пентафторфениловых эфиров и 3 — имидазолидный метод. Проведено сравнение этих трёх схем синтеза по выходу и оптической чистоте конечного продукта. Показано, что оптимальной схемой синтеза является первая — с использованием сукцинимидных эфиров.

Ключевые слова: дипептид; ГД-102; лиганд TSPO; пептидный синтез

Для цитирования:

Деева О. А. Разработка оптимальной схемы синтеза дипептидного лиганда TSPO, амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (ГД-102), потенциального анксиолитика. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):83–94. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-83-94>

Поступила: 24.07.2023. **В доработанном виде:** 28.08.2023. **Принята к печати:** 07.09.2023. **Опубликована:** 30.12.2023

Development of the optimal scheme for the synthesis of the dipeptide TSPO ligand, N-phenylpropionyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide (GD-102), a potential anxiolytic drug

© Olga A. Deeva

Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract. Previously at the Zakusov Research Institute of Pharmacology the first dipeptide ligand TSPO, the compound N-phenylpropionyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide (laboratory code GD-102), was designed and synthesized. The anxiolytic activity was detected for this compound at the doses 0.01–1.0 mg/kg intraperitoneally (ip) in mice. Dipeptide GD-102 also possessed antidepressant-like activity at the doses 0.01 and 0.05 mg/kg ip in BALB/c mice in the Porsolt forced swim test. The ligand properties of dipeptide GD-102 to TSPO were confirmed by pharmacological inhibitory analysis and molecular docking. This work is devoted to the development of the optimal scheme for the synthesis of the GD-102. 3 methods were tried — 1 activated succinimide esters method, 2 activated pentafluorophenyl ethers method and 3 imidazolidine method. These three synthesis schemes have been compared in terms of yield and optical purity of the final product. It was shown that the optimal synthesis scheme is the first one, using succinimide esters.

Keywords: dipeptide; GD-102; TSPO ligand; peptide synthesis

For citations:

Deeva OA. Development of the optimal scheme for the synthesis of the dipeptide TSPO ligand, N-phenylpropionyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide (GD-102), a potential anxiolytic drug. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):83–94. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-83-94>

Received: 24.07.2023. **Revision received:** 28.08.2023. **Accepted:** 07.09.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

Дипептидные лиганды TSPO были получены нами впервые в мире [1, 2]. Конструирование проводилось с использованием оригинальной стратегии создания дипептидных лекарств “drug-based peptide design” (DBPD) [3, 4]. В качестве непептидного прототипа был использован алпидем, классический лиганд TSPO, представитель имидазо[1,2-а]пиридиновой группы [5]. Алпидем содержит в себе два ароматических ядра, фенильное и бициклическое азотсодержащее и разветвленную алифатическую цепь, которые могут имитировать боковые радикалы фенилаланина, триптофана и изолейцина или лейцина, соответственно. Кроме того, в структуру алпидема входит амидная группа, возможный прототип пептидной связи. На основании этих структурных особенностей алпидема

нами был сконструирован амид N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, получивший лабораторный шифр ГД-102 (см. рис. 1) [2, 6].

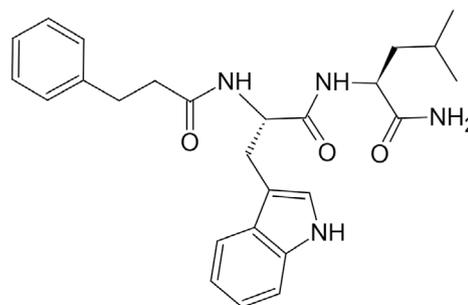


Рис. 1. Структура дипептидного лиганда TSPO ГД-102
Fig. 1. Structure of the dipeptide TSPO ligand GD-102

ГД-102 обладал анксиолитической активностью у мышей BALB/c при однократном внутривенном (в/в) введении в тесте открытого поля со световой вспышкой (ОП) в дозах 0,01–1,0 мг/кг, а также в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) в дозах 0,1–1,0 у мышей ICR. Было показано, что ГД-102 обладал антидепрессивной активностью в дозах 0,01 и 0,05 мг/кг в/в у мышей BALB/c в тесте вынужденного плавания по Порсолту. Лигандные свойства дипептида ГД-102 к TSPO были подтверждены методом фармакологического ингибиторного анализа с использованием селективного блокатора TSPO — соединения PK1195 [6] и методом молекулярного докинга в программе Glide Schrodinger [2]. Таким образом, дипептид ГД-102 можно рассматривать как потенциальный препарат для комплексного лечения тревожного и депрессивного расстройств.

Для разработки фармакологически активного соединения в качестве потенциального лекарственного средства необходимо выбрать оптимальный метод синтеза, который ляжет в основу лабораторного регламента. В данной работе опробованы три различные схемы синтеза дипептида ГД-102.

Для получения ГД-102 предпочтительно использование классических методов пептидного синтеза в растворе. Обычно процесс получения дипептидов состоит в конденсации требуемых аминокислот, как правило, в гомогенной фазе. При этом чаще всего используется аминокислота, имеющая активированную карбоксильную группу и защищённые другие реакционноспособные группы, и вторая аминокислота, которая имеет свободную аминогруппу и защищённые другие реакционноспособные группы. Из методов активации карбоксильной группы, применяемых в пептидном синтезе, наиболее популярны реагенты, образующие активированные эфиры в присутствии водоотнимающих агентов, а также имидазолиды аминокислот [7]. Метод активированных эфиров даёт меньше побочных продуктов по сравнению, например, с методом смешанных ангидридов. Из активированных эфиров чаще всего применяются *N*-оксисукцинимидные эфиры [8]. Это связано с тем, что выделяющийся в процессе конденсации *N*-гидроксисукцинимид легко переходит в водную фазу, что облегчает очистку продукта реакции. В некоторых случаях используют пентафторфениловые эфиры [9], достоинством которых является большая скорость реакции по сравнению с *N*-оксисукцинимидными эфирами, а в случае наличия функциональных боковых радикалов — селективный ход реакции по карбоксильной группе, а также возможность получить продукт в твёрдом виде. Недостатком является канцерогенность пентафторфенола. При активации карбоксильной группы аминокислоты имидазолидным методом использование водоотнимающего агента не требуется. Скорость реакции выше по сравнению с активированными эфирами, однако конечный имидазолид мало устойчив в растворе и

требует более тщательного подбора и осушения растворителей [10, 11].

В качестве защитных групп в пептидном синтезе наиболее часто используются *Woc* и *Z*-группы [12, 13]. Это связано с лёгкостью их введения и удаления. Постановка *Woc*-защитной группы предполагает использование ацидолиза для её удаления, а в случае *Z*-защитной группы — стадию гидрогенолиза [14]. Гидрогенолиз связан с использованием взрывоопасного водорода и дорогостоящего палладиевого катализатора. С другой стороны, он с почти 100 % выходом даёт продукт, практически не нуждающийся в дальнейшей очистке, который может быть использован на следующей стадии без выделения. Наличие остатка триптофана в структуре в конечном пептиде затрудняет применение *Woc*-защитной группы в синтезе, так как действие сильных кислот приводит к осмолению триптофана.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Нами опробованы 3 схемы синтеза дипептида ГД-102. Первая схема (схема 1) — с использованием метода активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров; вторая схема (схема 2) — с использованием метода активированных пентафторфениловых эфиров; третья схема (схема 3) — с применением карбонилдиимидазола. Все реакции конденсации проводили в ДМФА. В качестве критериев оптимальности принимались: 1) общий выход; 2) оптическая чистота конечного продукта; 3) стоимость исходных реагентов; 4) токсичность промежуточных продуктов.

Синтез по схеме 1, как и по схеме 2, состоит из 9 стадий. На первой стадии получали *Woc*-защищённый по аминогруппе лейцин. На второй стадии получали его активированный эфир — *N*-оксисукцинимидный или пентафторфениловый, которые в дальнейшем на третьей стадии подвергали аммонолизу в растворе разбавленного водного аммиака; затем удаляли *Woc*-защитную группу ацидолизом в присутствии трифторуксусной кислоты, получая, таким образом, трифторацетат амида лейцина. На следующем этапе проводилась активация карбоксильной группы *Z*-L-триптофана получением соответствующего активированного эфира — *N*-оксисукцинимидного или пентафторфенилового; затем ацилировали полученным активированным эфиром *Z*-L-триптофана деблокированный амид лейцина. Для удаления *Z*-защитной группы триптофана использовали метод каталитического гидрогенолиза. На следующем этапе получали активированный эфир фенилпропионовой кислоты, *N*-оксисукцинимидный или пентафторфениловый, с последующим ацилированием полученным эфиром деблокированного амида L-триптофанил-L-лейцина.

Принципиальное отличие третьей схемы (схема 3) синтеза дипептида ГД-102 от двух предыдущих в том, что в качестве исходных реагентов использовали за-

щищённый сложноэфирной группой по карбоксильной группе лейцин. В этом случае нет необходимости защищать аминокруппу лейцина, и, как следствие, в схеме будут отсутствовать две стадии: введение Вос-защитной группы и удаление её реакцией с трифторуксусной кислотой. Также активация карбоксильной группы аминокислоты с помощью карбонилдиимидазола не требует использование водоотнимающего агента, что упрощает выделение конечного продукта.

При синтезе дипептида ГД-102 по схеме 1 на первом этапе получали соответствующий amino-компонент — трифторацетат амида L-лейцина. Для этого синтезировали защищённый по аминокруппе лейцин (Вос-L-Leu-OH) стандартным методом постановки Вос-защиты по Поздневу [12] с выходом 90 %. Полученный Вос-защищённый L-лейцин превращали в N-оксисукцинимидный эфир по методике Андерсона [8] с выходом 73 %. В качестве растворителя использовали этилацетат, реакцию проводили при комнатной температуре. От твёрдого осадка дициклогексилмочевины избавлялись фильтрованием. Далее для получения амида (Вос-L-Leu-NH₂) сукцинимидный эфир подвергали аммонолизу разбавленным водным раствором аммиака. Реакция полностью проходила в течение получаса, получаемый амид хорошо кристаллизовался и легко отделялся фильтрованием. Вос-защиту удаляли ацидолизом с использованием трифторуксусной кислоты. Признаком окончания реакции было прекращение выделения пузырьков газа. Для удаления избытка трифторуксусной кислоты реакционную смесь трижды переупаривали с диэтиловым эфиром. Продукт выделяли в виде белого кристаллического вещества растиранием с диэтиловым эфиром. На следующей стадии получали сукцинимидный эфир Z-триптофана по стандартной методике Андерсона, используя в качестве растворителя этилацетат. Получали продукт в виде пены с высоким выходом (80–95 %). Синтезированный N-оксисукцинимидный эфир Z-триптофана вводили в реакцию с трифторацетатом амида лейцина, который предварительно нейтрализовывали добавлением эквимолярного количества диизопропилэтиламина. Реакцию проводили в ДМФА, предварительно очищенном от содержащихся аминов перегонкой над нингидрином. Продукт выделяли кристаллизацией добавлением воды, фильтровали, сушили на воздухе. Продукт содержал примесь N-гидроксисукцинимиды, от которой избавлялись перекристаллизацией из системы горячий этилацетат — гексан. Полученный защищённый дипептид подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии катализатора — 10 % Pd на активированном угле. Реакцию проводили в течение двух часов в закрытой системе, используя метанол в качестве растворителя. Водород подавали через газометр Берцелиуса. После прохождения реакции катализатор отделяли фильтрованием, раствор с продуктом упаривали. Важно не оставлять катализатор сухим на фильтре в связи с его пирофорностью. Полученный

N-свободный дипептид ацилировали сукцинимидным эфиром фенолпропионовой кислоты, получая конечный продукт с высоким выходом (71–80 %) кристаллизацией из дистиллированной воды. Для дополнительной очистки перекристаллизовывали из горячего этилацетата с добавлением гексана. Соединение ГД-102 имело вид белого порошка с температурой плавления 198 °С, углом вращения –27° при 25 °С, сигналы ¹H и ¹³C ЯМР спектра соответствовали структуре. Диастереомерная чистота по данным ЯМР не ниже 98 %.

Для проведения синтеза по схеме 2, защищённый лейцин (Вос-L-Leu-OH) вводили в реакцию с пентафторфенолом, в качестве водоотнимающего агента использовали дициклогексилкарбодимид, реакцию проводили в предварительно перегнанном безводном этилацетате. Продукт получали с выходом 97 %. Выход пентафторфенилового эфира выше, чем сукцинимидного эфира в схеме 1. Пентафторфениловый эфир растворяли в небольшом количестве ДМФА и подвергали аммонолизу с использованием разбавленного водного раствора аммиака. Реакция полностью проходила в течение получаса, получаемый амид хорошо кристаллизовался и легко отделялся фильтрованием. Продукт имел вид желтоватого порошка. Однако кристаллизация продукта происходит хуже, чем в случае аммонолиза сукцинимидного эфира этой же аминокислоты. Продукт имел запах пентафторфенола даже после многократных промывок дистиллированной водой и диэтиловым эфиром. Выход составил 60 %, что может быть связано с неустойчивостью пентафторфениловых эфиров в водно-щелочных средах. Вос-защиту удаляли ацидолизом трифторуксусной кислотой как и в схеме 1. Продукт получали с выходом 89 % в виде масла. Затем получали пентафторфениловый эфир Z-триптофана. Продукт получали в кристаллическом виде с выходом 96 %, который затем вводили в реакцию конденсации с трифторацетатом амида L-лейцина, предварительно нейтральзованным эквимолярным количеством диизопропилэтиламина. Полученный дипептид кристаллизовали из дистиллированной воды. Продукт имел вид жёлтого порошка. Затем полученный защищённый дипептид подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии катализатора — 10 % Pd/C по той же методике, как описано в схеме 1. Деблокированный дипептид H-L-Trp-Leu-NH₂ ацилировали пентафторфениловым эфиром фенолпропионовой кислоты. Конечный продукт плохо кристаллизовался в воде, поэтому его очищали последовательной промывкой этилацетатного раствора 5 % водным раствором NaHCO₃ и 3 % водным раствором H₂SO₄, упаривали, кристаллизовали добавлением холодной воды. Дополнительно промывали на фильтре дистиллированной водой и диэтиловым эфиром для удаления примеси пентафторфенола. Продукт содержал примесь мочевины, а также обладал жёлтым цветом и резким запахом. Попытка перекристаллизовать из системы

Имидазолид Z-L-триптофана получали в условиях Андерсона [11]. Для этого Z-Trp-OH вводили в реакцию с карбонилдимидазолом, реакцию проводили в течение получаса. Признаком окончания реакции являлось прекращение выделения пузырьков CO₂. Полученный активированный имидазолид триптофана без выделения вводили в реакцию с гидрохлоридом метилового эфира лейцина, который предварительно нейтрализовывали эквимолярным количеством диизопропилэтиламина. Реакцию проводили в предварительно перегнанном над нимгидрином ДМФА. Продукт Z-L-Trp-L-Leu-OMe выделяли в виде масла. Полученный метиловый эфир попытались подвергнуть прямому аммонолизу, для чего его растворяли в метаноле, пропускали газообразный аммиак в течение получаса, однако ТСХ контроль показал, что в реакции присутствовал только исходный метиловый эфир. Поэтому для получения целевого амида Z-L-Trp-L-Leu-OMe подвергали щелочному гидролизу, получая соединение со свободной карбоксильной группой Z-L-Trp-L-Leu-OH, которое, в свою очередь, вводили в реакцию с карбонилдимидазолом и через полчаса обрабатывали водным аммиаком. Получали продукт в виде белого порошка, однако выход реакции был значительно ниже, чем при аммонолизе N-оксисукцинимидных или пентафторфениловых эфиров. Возможно, это связано с высокой скоростью распада имидазолидов в водных средах. Полученный защищённый амид дипептида подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии катализатора — 10 % Pd на активированном угле по той же методике,

как в схемах 1 и 2. Деблокированный дипептид ацилировали имидазолидом фенолпропионовой кислоты, реакцию проводили в ДМФА, однако выход реакции опять же был невысоким (34 %). Возможно, это связано с малой стабильностью имидазолидов фенолалкиловых кислот. Конечный продукт выделяли кристаллизацией добавлением воды, однако он имел вид маслянистого порошка, поэтому для улучшения его физико-химических характеристик дополнительно очищали на колонке с силикагелем в системе хлористый метилен—метанол. После очистки дипептид ГД-102 имел вид белого порошка с температурой плавления 185–190 °С, углом вращения –23,6° при 24 °С. По данным ¹H ЯМР-спектроскопии, соединение находится в форме сольвата с метанолом в соотношении 1 молекула ГД-102 : 0,5 молекулы MeOH. Диастереомерная чистота, по данным ЯМР, не ниже 98 %.

Невысокие выходы реакций образования пептидной связи приводят к троекратно удорожанию синтеза конечного продукта по сравнению с методом N-оксисукцинимидных эфиров.

Для выбора наилучшего способа получения ГД-102 все преимущества и недостатки экспериментальных методов были тщательно проанализированы (табл. 1).

Как видно из табл. 1 общий выход по схеме 1 составил 42 %, по схеме 2 — 43 %, а в схеме 3 — 16 % в расчёте на коммерчески доступный Z-триптофан. Основное влияние на общий выход оказывала стадия образования пептидной связи между триптофаном и лейцином: метод N-оксисукцинимидных эфиров давал существенно больший выход по сравнению

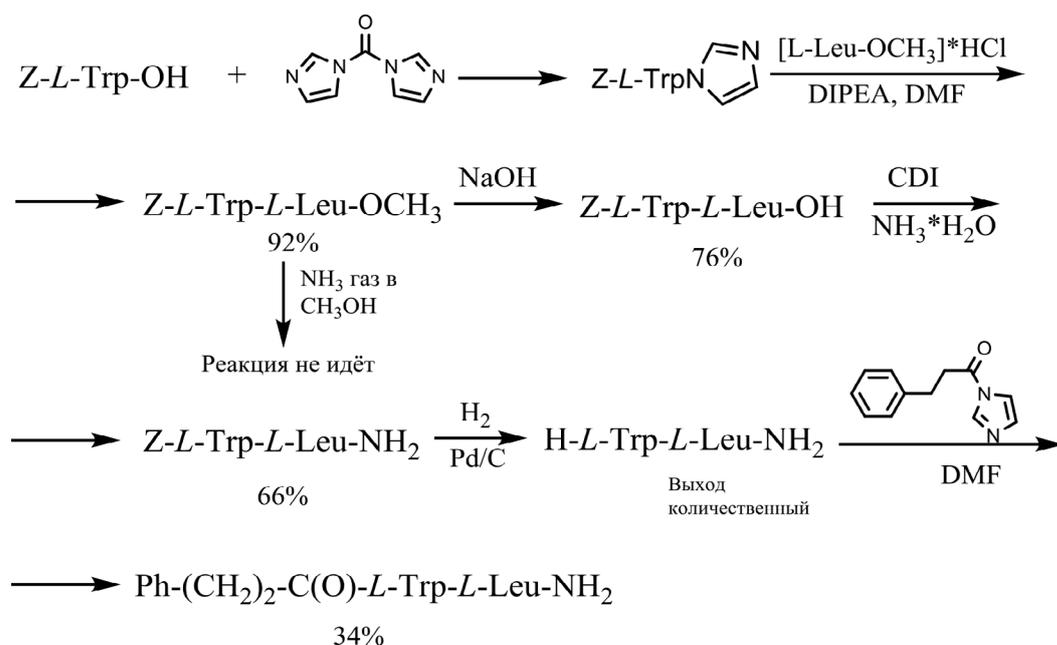


Схема 3. Получение ГД-102 имидазолидным методом
Scheme 3. Obtaining GD-102 by the imidazole method

Таблица 1

Сравнение методов получения дипептидного лиганда TSPO ГД-102

Table 1

Comparison of methods for obtaining the dipeptide ligand TSPO GD-102

Параметр	Метод активированных N-оксисукцинимидных эфиров	Метод активированных пентафтор-фениловых эфиров	Имидазольный метод
Метод очистки конечного продукта	1. Кристаллизация под водой 2. Перекристаллизация из системы этилацетат–гексан	1. Кристаллизация под водой 2. Колоночная хроматография на силикагеле в системе хлористый метилен–метанол	1. Кристаллизация под водой 2. Колоночная хроматография на силикагеле в системе хлористый метилен–метанол
Диастереомерная чистота	Подтверждена ЯМР	Подтверждена ЯМР	Подтверждена ЯМР
Температура плавления ГД-102	197–198 °С	178–183 °С	185–190 °С
Угол оптического вращения, с 1, ДМФА при 24 °С	–27,0°	–24,0°	–23,6°
Выход (на защищённый триптофан)	42 %	43 %	16 %
Стоимость в пересчёте на 100 г конечного продукта по ценам каталога Alfa Aesar на 2023 год	909 евро	2 323 евро	2 646 евро
Преимущества	Простота технологической схемы и используемого оборудования. Доступность исходных реагентов, возможность выделять промежуточные соединения в кристаллическом виде. Малая токсичность реагентов. Процессы протекают при комнатной температуре. Относительная дешевизна синтеза по сравнению с другими двумя схемами получения	Простота технологической схемы и используемого оборудования. Доступность исходных реагентов, возможность выделять промежуточные соединения в кристаллическом виде. Процессы протекают при комнатной температуре	Простота технологической схемы и используемого оборудования. Доступность исходных реагентов. Реакции протекают в малом промежуточном времени. Процессы протекают при комнатной температуре
Недостатки	Реакции протекают в большом промежутке времени	Возможность образования токсичных примесей. Дополнительная очистка с использованием диэтилового эфира. Высокая стоимость исходных реагентов. Физико-химические константы занижены, что возможно связано с образованием сольватов с метанолом	Метод требует более тщательной подготовки и очистки растворителей и промежуточных реагентов, так как реакции влажочувствительны. Угол оптического вращения ниже, что связано с образованием сольватов с метанолом. Малые выходы реакций и, как следствие, высокая стоимость синтеза

с методом пентафторфениловых эфиров. Оптическая чистота конечных продуктов синтеза при использовании метода N-оксисукцинимидных эфиров была выше. Общий выход по схеме 3 был наименьший, что вероятно связано с низкой стабильностью имидазидов. Получение по схемам 2 и 3 предполагает дополнительную очистку продукта на колонке, что приводит к образованию сольватов с метанолом, что было подтверждено ПМР спектром — присутствует сигнал метанола при 3,32 м. д. Метод получения ГД-102 по схеме 3 предполагает использование раствора щелочи, что также может привести к уменьшению оптической чистоты продукта.

Таким образом, оптимальной схемой для синтеза дипептидного лиганда TSP0 ГД-102 явилась схема 1 с использованием метода активированных N-оксисукцинимидных эфиров, преимущества которой — больший выход продукта по сравнению со схемами 2 и 3. Кроме того, при синтезе ГД-102 по схеме 1 промежуточные вещества и конечный дипептид легко выделялись кристаллизацией и имели более высокие физико-химические показатели. Используемые исходные реагенты коммерчески доступны, малотоксичны, проводимые реакции не требуют сложного технического оснащения и условий.

По выбранной схеме было наработано необходимое количество соединения ГД-102, амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина.

Материалы и методы / Materials and methods

Список сокращений

Ag	— арильный заместитель
Boc	— трет-бутилоксикарбонил
CDI	— карбонилдиимидазол
DCC	— дициклогексилкарбодиимид
DIPEA	— диизопропилэтиламин
DMSO	— диметилсульфоксид
Leu	— лейцил
OPFP	— пентафторфенил
OSu	— оксисукцинил
Pd/C	— катализатор: наночастицы палладия на поверхности активированного угля
TFA	— трифторуксусная кислота
Trp	— триптофанил
SuOH	— N-гидроксисукцинимид
Z	— бензилоксикарбонил
ДМПДА	— диметилпропилендиамин
ДМФА	— диметилформамид
ДЦГМ	— дициклогексилмочевина
ТГФ	— тетрагидрофуран
т.пл.	— температура плавления
ТСХ	— тонкослойная хроматография
ПМР	— протонный магнитный резонанс
УФ	— ультрафиолетовое излучение
ЭА	— этилацетат
ЯМР	— ядерный магнитный резонанс

Исходные вещества и вспомогательные реагенты

Аминокислоты: L-лейцин (Alfa Aesar, США), Z-L-триптофан (GL-Biochem, Шанхай). **Реагенты:** N-гидроксисукцинимид (Sigma-Aldrich, Германия), пентафторфенол, карбонилдиимидазол (Alfa Aesar, США), дициклогексилкарбодиимид (Sigma-Aldrich, Германия), дитретбутилпиракарбонат (Кемикал Лайн, Россия), трифторуксусная кислота (Химмед, Россия), катализатор Pd/C (Merck, Германия), фенилпропионовая кислота (КНР), водный аммиак (Химмед, Россия). **Растворители:** этилацетат, диметилформамид, тетрагидрофуран, диэтиловый эфир, дихлорметан, хлороформ, гексан, метанол были получены от ООО ТД Химмед (Россия).

Аналитические методы

Хроматография в тонком слое силикагеля. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системе хлороформ:метанол 9:1, если не указана другая. Аминосодержащие соединения и соединения с концевыми амидными группами обнаруживали хлор-толидиновой пробой, содержащие ароматические группы — в УФ-лучах. **ЯМР-спектроскопия.** Спектры регистрировали при 18 °С в растворах ДМСО-*d*₆, в шкале δ, м. д. ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Fourier 300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Температуру плавления синтезированных соединений измеряли в открытых капиллярах с использованием автоматического прибора OptiMelt MPA 100 (Stanford Research Systems, США) и не корректировали. **Поляриметрия.** Величины оптического вращения измеряли на автоматическом цифровом поляриметре ADP 410 (Bellingham + Stanley, Великобритания) при длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм) и длине кюветы 1 дм. Величины удельных оптических вращений рассчитывали по формуле:

$$[\alpha]_D = (\alpha \times V) / (l \times a),$$

где α — наблюдаемое оптическое вращение в градусах; V — объём раствора в мл; l — толщина слоя в дм; а — навеска вещества в г.

Схема 1

Синтез дипептида ГД-102 методом активированных сукцинимидных эфиров

1. Синтез N-трет-бутилоксикарбонил L-лейцина Boc-L-Leu-OH

К суспензии 25,00 г (0,19 моль) лейцина в 200 мл изопропилового спирта добавляли 200 мл раствора 1 N NaOH. При высоких оборотах мешалки прибавляли 49,75 г (0,228 моль, 20 % избыток) ди-трет-бутилпиракарбоната (Boc₂O). Поддерживали pH=9, прикапывая 2 N раствор NaOH. Смесь перемешивали 24 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ-контроль, R_f = 0,71) упаривали до 1/3 объёма, тем

самым удаляя в основном изопропиловый спирт. Полученный раствор экстрагировали гексаном (3×100 мл) для удаления избыточного Woc_2O . Водную фракцию отделяли, подкисляли при перемешивании 10 % раствором H_2SO_4 до выпадения осадка (pH = 3–4). Осадку давали сформироваться в холодильнике в течение 24 ч, после чего отфильтровывали, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Сушили в фарфоровой чашке на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы. Выход: 70,34 г (90 %), т. пл. 86–87 °С, $[\alpha]_{20}^D = -23$ (с 1, уксусная кислота). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,82–0,85 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,36 (9 H, с, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (2 H, м, C^{β}H Leu), 3,86–3,88 (1 H, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 6,72 (1 H, д, NH Leu).

2. Синтез сукцинимидного эфира N-трет-бутоксикарбонил-L-лейцина Woc-L-Leu-OSu

К суспензии 6,00 г (25,97 ммоль) Woc-L-Leu-OH в 150 мл ЭА добавили 3,58 г SuOH. Смесь охладил на водяной бане до 5–7 °С, после чего добавили 6,42 г (31,17 ммоль) DCC. Наблюдали выпадение осадка ДЦГМ. Реакционной массе дали самостоятельно нагреться до комнатной температуры, затем вели реакцию при перемешивании ещё в течение 5 часов. По окончании реакции (ТСХ контроль, $R_f = 0,81$) осадок ДЦГМ отфильтровали, ЭА удаляли в вакууме. Остаток растерли с диэтиловым эфиром, эфир декантировали. Получили 6,15 г (73 %) продукта в виде белого порошка с т.пл. 110–112 °С; $[\alpha]_{24}^D = -36^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,39 (9 H, с, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (2 H, т, C^{β}H Leu), 1,56–1,73 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 2,82 (4 H, м, OSu), 3,86–3,88 (1 H, м., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 7,93 (1 H, д, NH Leu).

3. Синтез амида N-трет-бутоксикарбонил L-лейцина Woc-L-Leu-NH₂

К раствору 6,00 г Woc-L-Leu-OSu в 30 мл ДМФА при перемешивании приливали 80 мл разбавленного в 2 раза продажного водного раствора аммиака, сразу выпадал белый творожистый осадок. Суспензию разбавляли дистиллированной водой для комфортного перемешивания. Реакцию вели в течение часа, после чего осадку давали сформироваться в холодильнике в течение 24 ч. Отфильтровывали и промывали полученный осадок дистиллированной водой до нейтральной реакции. Сушили в сушильном шкафу при 80 °С в течение 5 ч до постоянной массы. Выход 5,3 г, 60 %, т. пл 148–149 °С, $[\alpha]_{26}^D = -11^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,82–0,85 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,36 (9 H, с, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (2 H, м, C^{β}H Leu), 3,86–3,88 (1 H, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 6,72 (1 H, д, NH Leu), 6,89 и 7,19 (2 H, два с, NH_2 амид).

4. Синтез трифторацетата амида L-лейцина [L-Leu-NH₂]×TFA

К 12,00 г Woc-Leu-NH₂, (52,1 ммоль) добавляли 30 мл дихлорметана и затем к полученной суспензии при перемешивании одномоментно прибавили 60 мл

TFA (89,1 г, 1500 % избыток). Перемешивали получившийся светло-жёлтый раствор 2 часа. Избыток TFA упаривали, остаток затем трижды переупаривали с диэтиловым эфиром. Полученный легко кристаллизующийся остаток вновь залили эфиром, растёрли, дали сформироваться в течение 2 ч, затем отфильтровали, промывали диэтиловым эфиром, высушивали в сушильном шкафу при 45–50 °С. Выход 11,88 г (99 %), т. пл. 118–119 °С, $[\alpha]_{25}^D = -18^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,83–0,89 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,36 (9 H, с, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (2 H, м, C^{β}H Leu), 3,69 (1 H, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 7,52 и 7,93 (2 H, два с., NH_2 амид), 8,12 (3 H, уш. с., N^+H_3 Leu).

5. Синтез сукцинимидного эфира N-бензилоксикарбонил-L-триптофана Z-L-Trp-OSu

К раствору 10,00 г (29,6 ммоль) Z-L-TrpOH в 300 мл этилацетата добавляли 3,98 г (34,6 ммоль, 17 % избыток) N-гидроксисукцинимид, смесь охладил на водяной бане до 5–7 °С и затем прибавляли 7,25 (35,2 ммоль, 19 % избыток) дицилогексилкарбодиимида. Реакционную массу перемешивали 30 мин при температуре +5 – +7 °С и затем 12 ч при комнатной температуре. Осадок дицилогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное масло растирали с гексаном, гексан декантировали, масло упаривали досуха. Получали продукт в количестве 11,84 г (92 %) в виде белой пены, которую измельчали до состояния порошка с т.пл. 137–140 °С $[\alpha]_{25}^D = -60,0^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР ДМСО- d_6 , δ м.д.: 2,78 (4 H, м, OSu), 3,01 и 3,25 (2 H, два д.д., C^{β}H Trp), 3,98 (1 H, м, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 4,97 (2 H, с, $-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 6,73–7,62 (10 H, м, $-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, индол), 8,56 (1 H, д, NH Trp), 10,78 (1 H, с, NH индол).

6. Синтез амида N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина Z-L-Trp-Leu-NH₂

Растворяли 7,06 г (13,52 ммоль) [L-Leu-NH₂]×TFA в 10 мл ДМФА. Добавляли DIPEA (2,35 мл, 5 % избыток) для нейтрализации трифторуксусной кислоты, перемешивали в течение 30 мин. Затем добавляли этот раствор к раствору – 7,06 г Z-L-Trp-OSu (16,22 ммоль 20 % избыток) в 100 мл ДМФА. Реакцию вели сутки при перемешивании при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ-контроль, $R_f = 0,76$) растворитель упаривали, результирующее масло растворяли в 100 мл ЭА, этот раствор экстрагировали 5 % NaHCO_3 (2×100 мл), 3 % водным раствором H_2SO_4 (2×100 мл) и затем дистиллированной водой (2×100 мл). Органическую фракцию сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут, осушитель отфильтровывали, промывали небольшим количеством ЭА, упаривали. К ещё подвижному маслу приливали 100 мл дистиллированной воды, образовывался белый осадок, которому давали сформироваться в холодильнике в течение 12 ч, затем фильтровали, промывали 100 мл дистиллированной воды, 50 мл гексана, 50 мл диэтилового эфира, высушили на воздухе. Выход: 6,78 г, (75 %), т.пл.: 166–169 °С,

$[\alpha]_{26}^D = -31,5^\circ$ ($c = 1$, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д д, $2\text{C}^\delta\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Leu), 1,45 (2 H, м, C^βH Leu), 2,90 и 3,09 (2 H, два дд, C^βH Trp), 4,28–4,31 (2 H, м, C^αH Leu и C^αH Trp), 4,93 (2 H, м, CH_2CO), 6,99–7,30 (10 H, м, Ar), 7,25 и 7,33 (2 H, два с, NH_2 амид), 7,62 (1 H, д, NH Leu), 7,97 (1 H, д, NH Trp), 10,81 (1 H, с, NH индол).

7. Синтез амида L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Trp-L-Leu-NH₂

К 6,78 г (15,0 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-NH₂ приливали 50 мл метанола, к полученной суспензии добавляли суспензию 0,50 г 10 % Pd/C предварительно смоченного 2 мл дистиллированной воды. Через полученную суспензию при перемешивании пропускали ток водорода в течение 3 часов при интенсивном перемешивании. Через 3 часа исходный продукт растворялся, что свидетельствовало о прохождении реакции. По окончании реакции катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, подложив на дно фильтра бумагу маркировки «чёрная лента». Фильтрат упаривали, получали продукт в виде пены серого цвета. Выход: 4,71 г (99 %) без чёткой т.пл., $[\alpha]_{26}^D = -25^\circ$ ($c = 1$, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 дд, $2\text{C}^\delta\text{H}_3$ Leu), 1,09–1,26 (1 H, м, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Leu), 1,45 (2 H, м, C^βH Leu), 2,90 и 3,08 (2 H, два дд, C^βH Trp), 3,50 (1 H, м, C^αH Trp), 4,14 (1 H, дд, C^αH Leu), 6,94–7,55 (5 H, м, индол), 7,05 и 7,41 (2 H, 2 д, NH_2 амид), 7,60 (1 H, д, NH Leu), 8,05 (1 H, д, NH Trp), 10,85 (2 H, уш с, NH_2 индол).

8. Синтез сукцинимидного эфира фенилпропионовой кислоты Ph-(CH₂)₂-C(O)-OSu

К раствору 4,00 г (26,66 ммоль) фенилпропионовой кислоты в 100 мл THF прибавляли 3,68 г (32 ммоль, 20 % изб.) SuOH, затем 6,59 г (32 ммоль, 20 % изб.) DCC, охлаждение реакционной смеси не требовалось, реакцию вели при комнатной температуре 12 ч, по мере прохождения реакции выпадал осадок ДЦГМ. По окончании реакции осадок ДЦГМ отфильтровывали, растворитель упаривали в вакууме, получали белый порошок, который сушили в вакуумном эксикаторе над безводным Na_2SO_4 . Выход 6,55 г (99 %) продукта в виде белого порошка с т.пл. = 113–114 °С, $R_f = 0,81$, ^1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 2,81 (4 H, м, OSu), 2,97–3,01 (2 H, м, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 3,34 (2 H, с, CH_2CO) 7,16–7,31 (5 H, м, C_6H_5).

9. Синтез амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина Ph-(CH₂)₂-C(O)-L-Trp-L-Leu-NH₂ (ГД-102)

Растворяли 4,50 г (14,3 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH₂ в 50 мл ДМФА, добавляли 3,86 г (15,6 ммоль, 10 % изб.) сукцинимидного эфира фенилпропионовой кислоты, перемешивали 24 ч. Затем добавляли 0,30 мл ДМПДА, для удаления избытка $\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{OSu}$, перемешивали ещё полчаса, растворитель удаляли в вакууме. Результирующее масло разбавляли 200 мл дистиллированной воды, получали белый «молочный» осадок. Осадку давали выстоять 12 ч в холодильнике

ке при температуре +8 °С, затем отфильтровывали. Полученный порошок промывали 100 мл дистиллированной воды, 100 мл гексана и 50 мл диэтилового эфира. Затем перекристаллизовывали из системы этилацетат–гексан, растворяя в горячем этилацетате и при перемешивании прибавляя гексан до выпадения осадка. Сушили в вакуумированном эксикаторе над CaCl_2 . Выход составил 4,49 г (70 %) продукта в виде белого порошка с т.пл. 197–198 °С, $[\alpha]_{26}^D = -27^\circ$ ($c = 1$, ДМФА), $R_f = 0,73$ ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д д, $2\text{C}^\delta\text{H}_3$ Leu), 1,45 (2 H, т, C^βH Leu), 1,56–1,73 (1 H, м, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Leu), 2,38 (2 H, т, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2,69 (2 H, т, CH_2CO), 2,90 и 3,09 (2 H, два дд, C^βH Trp), 4,22 (1 H, дд, C^αH Leu), 4,54 (1 H, м, C^αH Trp), 6,99–7,20 (10 H, м, Ar), 7,33 и 7,60 (2 H, два с, NH_2 амид), 7,93 (1 H, д, NH Leu), 8,08 (1 H, д, NH Trp), 10,78 (1 H, с, NH индол).

Схема 2

Синтез дипептида ГД-102 методом активированных пентафторфениловых эфиров

1. Синтез пентафторфенилового эфира N-трет-бутилоксикарбонила-L-лейцина Вос-L-Leu-OPfP

К раствору 2,50 г (10,82 ммоль) Вос-L-Leu-OH в этилацетате при перемешивании добавили 2,32 г (12,65 ммоль, 17 % изб.) пентафторфенола, затем 2,60 г (12,65 ммоль, 17 % изб.) DCC. Наблюдали выпадение ДЦГМ. Реакцию перемешивали 3 часа при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль) осадок ДЦГМ отфильтровывали. Полученный раствор в этилацетате экстрагировали 5 % водным раствором NaHCO_3 (2×100 мл) и 5 % водным раствором NaCl (1×100 мл). Органическую фракцию сушили над безводным Na_2SO_4 полчаса. Фильтровали, растворитель удаляли в вакууме, получали 4,2 г продукта в виде масла. Выход 97 %. Дополнительного подтверждения структуры не требовалось.

2. Синтез амида N-трет-бутилоксикарбонил-L-лейцина, Вос-L-Leu-NH₂

К раствору 4,2 г (10,57 ммоль) Вос-L-Leu-OPfP в 5 мл ДМФА приливали 70 мл разбавленного (продажный раствор разбавляли в 2 раза) водного раствора аммиака. Смесь перемешивали в течение 20 минут, после чего оставили для кристаллизации на 24 часа при температуре +5 °С. Выпавший кристаллический осадок белого цвета отфильтровывали. Получили 1,45 г продукта. Выход 60 % в виде желтоватого порошка, т.пл. 142–143 °С, $[\alpha]_{26}^D = -8,7^\circ$ ($c = 1$, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 0,84 (6 H, м, $2\text{C}^\delta\text{H}_3$ Leu), 1,22–1,26 (2 H, т, C^βH Leu), 1,36 (9H, с, Вос), 1,57–1,79 (1 H, м, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Leu), 3,86–3,88 (1 H, дд, C^αH Leu,), 6,72 (1 H, д, NH Leu), 6,89 и 7,19 (2 H, два с, NH_2 амид),

3. Синтез трифторацетата амида L-лейцина, [L-Leu-NH₂] \times TFA

К 1,31 г Вос-L-Leu-NH₂ (5,69 ммоль) в 40 мл хлористого метилена при перемешивании добавили 6,54 мл

(85,43 ммоль) TFA, реакцию вели 2 часа. По окончании реакции (ТСХ контроль) смесь упарили, затем упарили с диэтиловым эфиром 3×30 мл и оставили для кристаллизации под 60 мл диэтилового эфира на 24 часа, после чего эфир декантировали. Кристаллический остаток отфильтровали, высушили в сушильном шкафу при 45–50 °С. Выход составил 1,23 г (89 %) в виде белого порошка, с т.пл. 135–136 °С, $[\alpha]_{25}^D = +17,5^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 0,83–0,88 (6 Н, 2 д д, $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 Н, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,45 (2 Н, м, C^{β}H Leu), 3,69 (1 Н, д д, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 7,52 и 7,93 (2 Н, два с, NH_2 амид), 8,12 (3 Н, уш. с, N^+H_3 Leu).

4. Синтез пентафторфенилового эфира N-бензилоксикарбонила-L-триптофана, Z-L-Trp-OPfP

К 4,00 г (11,83 ммоль) суспензии Z-L-Trp-OH в 150 мл этилацетата. добавили 2,6 г (14,20 ммоль, 20 % избыток) пентафторфенола и 2,93 г (14,20 ммоль, 20 % избыток) дицилогексилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. Наблюдали выпадение белого осадка ДЦГМ. По окончании реакции (ТСХ контроль) осадок ДЦГМ отфильтровали. Фильтрат экстрагировали однократно по 100 мл 5 % раствором NaHCO_3 , затем 3 % H_2SO_4 и насыщенным раствором NaCl. Органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали в вакууме. Получали продукт в виде вязкого жёлтого масла с крупинками. Выход составил 5,7 г (95 %). Характеристики соответствуют литературным данным, дополнительного подтверждения структуры не требовалось.

5. Синтез амида N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-NH₂

В 20 мл ДМФА растворили 1,11 г (4,55 ммоль) TFA×L-Leu-NH₂, добавили 0,99 мл (5,69 ммоль) DIPEA для нейтрализации и оставили при перемешивании на 30 минут. После этого внесли в этот раствор 2,64 г (5,23 ммоль, 20 % изб.) Z-L-Trp-OPfP. Реакцию вели при комнатной температуре 12 ч. По окончании реакции (ТСХ контроль) добавили 0,114 мл DMAPA для удаления избытка Z-L-Trp-OPfP и перемешивали в течение 10 минут. ДМФА упаривали, остаток растворили в 100 мл этилацетата. Экстрагировали двукратно по 100 мл 3 % раствором H_2SO_4 , 5 % раствором NaHCO_3 и затем однократно 100 мл дистиллированной воды. Органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали. К ещё подвижному тёплому маслу добавили 200 мл дистиллированной воды для кристаллизации. Выпавшему осадку давали выстоять в холодильнике 12 ч, затем фильтровали, промывали водой, затем гексаном. Получили 1,3 г (65 %) продукта в виде белого порошка с т. пл. 166–169 °С, $[\alpha]_{26}^D = -31^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 0,83–0,85 (6 Н, 2 д д, $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,17 (1 Н, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,46–1,49 (2 Н, м, C^{β}H Leu), 2,90 и 3,09

(2 Н, два д.д., C^{β}H Trp), 4,26–4,31 (2 Н, м., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu и $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 4,95 (2 Н, м, CH_2CO), 6,69–7,22 (10 Н, м, Ar) 7,25 и 7,33 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7,62 (1 Н, д, NH Leu), 7,97 (1 Н, д, NH Trp), 10,82 (1 Н, с, NH индол).

6. Синтез амида L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Trp-L-Leu-NH₂

К 2,05 г (4,55 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-NH₂ приливали 50 мл метанола, добавляли 0,346 г 10 % Pd/C в качестве катализатора, предварительно смоченного несколькими каплями воды. Через полученную суспензию при перемешивании пропускали ток водорода в течение 3 часов при интенсивном перемешивании. По окончании реакции (ТСХ контроль) катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, подложив на дно фильтра бумагу маркировки «чёрная лента», промывали 50 мл метанола. Фильтрат упаривали, получали продукт с выходом 1,4 г (97 %) в виде серой пены без четкой температуры плавления, $[\alpha]_{26}^D = -25^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 Н, 2 д д, $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,09–1,26 (1 Н, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,45 (2 Н, м, C^{β}H Leu), 2,90 и 3,08 (2 Н, два д.д., C^{β}H Trp), 3,50 (1 Н, м, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 4,14 (1 Н, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 6,94–7,55 (5 Н, м, Ar), 7,05 и 7,41 (2 Н, 2 д, NH_2 амид), 7,60 (1 Н, д, NH Leu), 8,05 (1 Н, д, NH Trp), 10,85 (1 Н, уш. с, NH индол).

7. Синтез амида фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, Ph-(CH₂)₂-C(O)-L-Trp-L-Leu-NH₂

К 1,4 г (4,22 ммоль) в 30 мл ДМФА добавляли 1,6 г (5,07 ммоль, 20 % изб.) Ph(CH₂)₂C-(O)-OPfP. Реакционную смесь оставляли на 12 часов с хлоркальциевой трубкой при перемешивании. По окончании реакции (ТСХ контроль) ДМФА упарили, остаток растворили в 100 мл этилацетата. Экстрагировали двукратно по 100 мл 3 % H_2SO_4 , 5 % NaHCO_3 и затем однократно 100 мл дистиллированной воды. Органическую фракцию сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали. Получали 1,3 г продукта в виде желтоватого порошка, с т. пл. 168–172 °С. Продукт дополнительно очищали на колонке с силикагелем для повышения показателей чистоты и улучшения физико-химических характеристик. Набивали колонку силикагелем 60 Å в соотношении 1:15 к массе очищаемого вещества. Прогоняли системы: 100 мл хлористый метилен 100 %, 30 мл хлористый метилен:метанол 99:1, 30 мл хлористый метилен:метанол 90:10, 30 мл хлористый метилен:метанол 85:15, 30 мл хлористый метилен:метанол 80:20, 30 мл хлористый метилен:метанол 70:30. Выход продукта в виде белого порошка 0,780 г (60 %) с т. пл. 178–183 °С, $[\alpha]_{24}^D = -24^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 Н, 2 д д, $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,45 (2 Н, т, C^{β}H Leu), 1,56–1,73 (1 Н, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 2,37 (2 Н, т, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2,69 (2 Н, т, CH_2CO), 2,90 и 3,09 (2 Н, два д.д., C^{β}H Trp), 4,22 (1 Н, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 4,56 (1 Н, м, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 6,99–7,29 (10 Н, м, Ar), 7,20 и 7,58 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7,93 (1 Н, д, NH Leu), 8,05 (1 Н, д, NH Trp), 10,79 (1 Н, с, NH индол).

Схема 3

Синтез дипептида ГД-102 имидазольным методом

1. Синтез метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-OCH₃

К Z-L-Trp-OH 1 г (2,956 ммоль), растворённому в 15 мл ТГФ, добавляли 0,479 г (2,956 ммоль) CDI. Отдельно растворяли 0,537 г (2,956 ммоль) [L-Leu-OCH₃] \times HCl в ТГФ и 0,515 мл DIPEA. Оба раствора перемешивали полчаса, затем объединяли и перемешивали ещё час при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе бутанол:уксусная кислота:вода 4:1:1, R_f = 0,78, УФ и толидиновая проба) упаривали до густого жёлтого масла, разбавляли 50 мл ЭА и экстрагировали NaHCO₃ 5 % (2 \times 50 мл) и дист. водой (1 \times 30 мл). Органическую фракцию высушивали над безводным MgSO₄ в течение 30 минут, осушитель отфильтровывали и упаривали до состояния аморфной жёлтой пены, которую затем дважды переупаривали с диэтиловым эфиром. Выход составил 1,26 г (92 %) продукта с $[\alpha]_{24}^D = -21,6^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ , м.д.: 0,83–0,88 (6 H, м, 2C ^{δ} H₃ Leu), 1,06–1,35 (2 H, т, C ^{β} H Leu), 1,58 (1 H, м, C ^{γ} H₂ Leu), 2,90 и 3,06 (2 H, два д.д., C ^{β} H Trp), 3,63 (3 H, с, -OCH₃), 4,29 (1 H, д.д., C ^{α} H Leu), 4,41 (1 H, м, C ^{α} H Trp), 4,96 и 5,02 (2 H, 2 д, -OCH₂C₆H₅), 6,98–7,51 (10 H, м, Ar), 7,67 (1 H, д, NH Trp), 8,27 (1 H, д, NH Leu), 10,83 (1 H, с, NH индол).

2. Синтез N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-OH.

Растворяли 1,38 г (2,96 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-OMe в 10 мл метанола, при перемешивании приливали раствор 0,24 г (5,2 ммоль, 100 % избыток) NaOH в 5 мл воды. Перемешивали в течение 3 часов до полного растворения реакционной массы. После чего разбавляли 100 мл воды, при перемешивании прикапывали 10 % H₂SO₄ до pH 4–5, при этом выпадал молочный осадок, которому давали выстоять 12 ч в холодильнике при +8 °С. Затем раствор над осадком аккуратно декантировали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, экстрагировали дистиллированной водой (2 \times 100 мл), органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na₂SO₄ в течение получаса. Осушитель отфильтровывали, раствор упаривали, после чего переупаривали 3 раза с диэтиловым эфиром до получения белой устойчивой пены. Пену измельчали, переносили на стеклянный фильтр и промывали гексаном. Выход составил 2,18 г (76 %) продукта с т. пл. 91–92 °С, $[\alpha]_{29}^D = -19,8^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ , м.д.: 0,83–0,88 (6 H, м, 2C ^{δ} H₃ Leu), 1,06–1,35 (2 H, т, C ^{β} H Leu), 1,58 (1 H, м, C ^{γ} H₂ Leu), 2,34 (2 H, м, CH₂ Leu), 2,69 (H, м, CH Leu), 2,92 и 3,08 (2 H, два д.д., C ^{β} H Trp), 3,61 (3 H, с, -OCH₃), 4,32 (1 H, д.д., C ^{α} H Leu), 4,61 (1 H, м, C ^{α} H Trp), 6,91–7,61 (10 H, м, Ar), 8,02 (1 H, д, NH Trp), 8,35 (1 H, д, NH Leu), 10,91 (1 H, с, NH индол), 12,63 (1 H, ушир. с, OH).

3. Синтез амида N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-NH₂

К 2,00 г (4,43 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-OH в растворе 15 мл ТГФ добавляли 0,79 г (4,87 ммоль, 10 % изб.) CDI, перемешивали полчаса, затем добавляли смесь 50 мл ДМФА и 10 мл водного аммиака, получили ярко-жёлтый раствор. По окончании реакции (ТСХ контроль, R_f = 0,62) упаривали растворители в вакууме, разбавляли 50 мл ЭА, экстрагировали дистиллированной водой (2 \times 30 мл), органическую фазу сушили над Na₂SO₄ в течение 30 минут, затем осушитель отфильтровывали и упаривали. Выход составил 1,32 г (66 %) продукта в виде белого порошка с т.пл. = 180–182 °С $[\alpha]_{23}^D = -25,9^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д.д., 2C ^{δ} H₃ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, C ^{γ} H₂ Leu), 1,45 (2 H, м, C ^{β} H Leu), 2,96 и 3,12 (2 H, два д.д., C ^{β} H Trp), 4,28–4,91 (1 H, м, C ^{α} H Leu), 4,38 (1 H, м, C ^{α} H Trp), 4,93 (2 H, 2 д, -OCH₂C₆H₅), 6,94–7,30 (10 H, м, -OCH₂C₆H₅, индол), 7,14 и 7,30 (2 H, два с, NH₂ амид), 7,62 (1 H, д, NH Trp), 7,97 (1 H, д, NH Leu), 10,81 (1 H, с, NH индол).

4. Синтез амида L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Trp-L-Leu-NH₂.

В колбу, содержащую суспензию из 1,26 г (3,72 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-NH₂ в 100 мл метанола добавили 500 мг 10 % Pd/C смоченного 1 мл дистиллированной воды. Через полученную смесь пропускали водород в течение 2 часов при интенсивном перемешивании. Получали растворимый в метаноле продукт, что свидетельствовало о прохождении реакции. Катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, проложив фильтрующее дно бумагой маркировки «чёрная лента», промывали метанолом. Фильтрат упаривали, получали 4,15 г продукта в виде кремовой аморфной пены с $[\alpha]_{26}^D = -28,6^\circ$ (с = 1, ДМФА), R_f = 0,35, без чёткой т.пл. Выход количественный. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д.д., 2C ^{δ} H₃ Leu), 1,09–1,26 (1 H, м, C ^{γ} H₂ Leu), 1,45 (2 H, м, C ^{β} H Leu), 2,75 и 3,11 (2 H, два д.д., C ^{β} H Trp), 3,50 (1 H, м, C ^{α} H Trp), 4,14 (1 H, д.д., C ^{α} H Leu), 6,94–7,55 (5 H, м, индол), 7,05 и 7,41 (2 H, 2 д, NH₂ амид), 7,95 (1 H, д, NH Leu), 10,85 (2 H, уш с, NH₂ Trp).

5. Синтез амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, N-Ph(CH₂)₂C(O)-L-Trp-L-Leu-NH₂ (ГД-102)

Растворяли 2,04 г (13,61 ммоль) фенилпропиононой кислоты в 30 мл ДМФА, добавляли 2,20 г (13,61 ммоль) CDI, перемешивали полчаса при комнатной температуре. Затем к этому раствору прибавили 4,10 г (12,37 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH₂ в 20 мл ДМФА, перемешивали ещё 5 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривали, остаток растворили в 100 мл этилацетата. Экстрагировали двукратно по 100 мл 3 % водным раствором H₂SO₄, 5 % раствором NaHCO₃, и затем однократно 100 мл насыщенного раствора NaCl. Органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na₂SO₄ в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали.

К образовавшемуся подвижному маслу добавляли 5 мл ДМФА и 200 мл дистиллированной воды для кристаллизации. Получали жёлтое карамелеобразное масло, которое выдерживали в холодильнике до кристаллизации (48 часов). Выход составил 1,95 г (34 %) порошка кремового цвета с т.пл. 178–180 °С. Продукт дополнительно очищали на колонке с силикагелем для повышения показателей чистоты. Набивали колонку силикагелем 60 Å в соотношении 1:15 к массе очищаемого вещества. Прогоняли системы: 100 мл хлористый метилен 100 %, 30 мл хлористый метилен:метанол 99:1, 30 мл хлористый метилен:метанол 90:10, 30 мл

хлористый метилен:метанол 85:15, 30 мл хлористый метилен:метанол 80:20, 30 мл хлористый метилен:метанол 70:30. Выход 1,61 г (82 %) продукта в виде белого порошка с т. пл. 185–190 °С, $[\alpha]_{24}^D = -23,6^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^\delta\text{H}_3$ Leu), 1,45 (2 H, т, C^βH Leu), 1,56–1,73 (1 H, м, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Leu), 2,38 (2 H, т, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2,69 (2 H, т, CH_2CO), 2,90 и 3,09 (2 H, два д.д., C^βH Trp), 4,22 (1 H, д.д., C^αH Leu), 4,54 (1 H, м, C^αH Trp), 6,99–7,20 (10 H, м, Ar), 7,33 и 7,60 (2 H, два с, NH_2 амид), 7,93 (1 H, д, NH Leu), 8,08 (1 H, д, NH Trp), 10,78 (1 H, с, NH индол).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Деева Ольга Алексеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: olga.angstrem@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9842-1545>

SPIN-код: 8877-9489

н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов
отдела химии лекарственных средств ФГБНУ
«ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация

Olga A. Deeva

Corresponding author

e-mail: olga.angstrem@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9842-1545>

SPIN code: 8877-9489

Researcher of the peptide bio regulators labora-
tory at the medicinal chemistry department
Federal Research Center for Innovator and
Emerging Biomedical and Pharmaceutical
Technologies, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

- Gudasheva TA, Deeva OA, Mokrov GV, et al. Design, Synthesis and Anxiolytic Activity Evaluation of N-Acyltryptophanyl-Containing Dipeptides, Potential TSPo Ligands. *Med Chem.* 2019;15(4):383–399. DOI: 10.2174/1573406415666181119164846.
- Деева О.А., Пантеев А.С., Рыбина И.В. и др. Новый дипептидный лиганд TSPo. *Доклады академии наук.* 2018;484(2):228–232.
- Deeva OA, Pantileev AS, Rybina IV, et al. A novel dipeptide ligand of TSPo. *Dokl Biochem Biophys.* 2019;484(1):17–20. (In Russ.). DOI: 10.1134/S1607672919010046.
- Гудашева Т.А. Теоретические основы и технологии создания дипептидных лекарств. *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2015;64(9):2012–2021.
- Gudasheva TA. Theoretical grounds and technologies for dipeptide drug development. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya.* 2015;64(9):2012–2021. (In Russ.). DOI: 10.1007/s11172-015-1112-2.
- Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. Novel Technologies for Dipeptide Drugs Design and their Implantation. *Curr Pharm Des.* 2018;24(26):3020–3027. DOI: 10.2174/1381612824666181008105641.
- Zivkovic B, Morel E, Joly D, et al. Pharmacological and behavioral profile of alpidem as an anxiolytic. *Pharmacopsychiatry.* 1990 May;23 Suppl 3: 108–113. DOI: 10.1055/s-2007-1014545.
- Gudasheva TA, Deeva OA, Pantileev AS, et al. The New Dipeptide TSPo Ligands: Design, Synthesis and Structure-Anxiolytic Activity Relationship. *Molecules.* 2020 Nov 4;25(21):5132. DOI: 10.3390/molecules25215132.
- Химический синтез пептидов / Гершкович А.А., Кибирев В.К.; Отв. ред. Серебряный С. Б.; АН Украины. Ин-т биоорган, химии и нефтехимии. Киев : Наук, думка, 1992. 360 с.

- Himicheskij sintez peptidov. Gershkovich AA, Kibirev VK; Ed. Silver SB.; AN Ukrainy. In-t bioorgan, himii i neftekhimii. Kiev. Nauk, dumka. 1992. (UKR.).
- Anderson GW, Zimmerman JE, Callahan FM. (1963). N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society.* 1963;85(19):3039–3039. DOI: 10.1021/ja00902a047.
- Kisfaludy L, Roberts JE, Johnson RH, et al. Synthesis of N-carbobenzoylamino acid and peptide pentafluorophenyl esters as intermediates in peptide synthesis. *J Org Chem.* 1970 Oct;35(10):3563–3565. DOI: 10.1021/jo00835a086.
- Anderson GW, Paul R. N,N'-Carbonyldiimidazole, a new reagent for peptide synthesis. *J Am Chem Soc.* 1958;80:4423–4431. DOI: 10.1021/ja01549a078.
- Anderson GW, Paul R. N,N'-Carbonyldiimidazole, a new peptide forming reagent. *J Am Chem Soc.* 1960;82:4596–4603. DOI: abs/10.1021/ja01502a038.
- Позднев В.Ф. Применение Ди-трет-бутилпирокarbonата для получения N-трет-бутилоксикарбонильных производных аминокислот. *Химия природных соединений.* 1974;6:764–767.
- Pozdnev VF. Primenenie Di-tret-butilpirokarbonata dlya polucheniya N-tret-butiloksikarbonil'nyh proizvodnyh aminokislot. *Himiya prirodnyh soedinenij.* 1974;6:764–767. (In Russ.).
- Bergmann M, Zervas L. Über ein allgemeines verfahren der peptid-synthese. *Ber chem.* 1932;65(7):1192–1201 (In German). DOI: 10.1002/cber.19320650722.
- МакОми Дж. Защитные группы в органической химии. М.: Издательство «Мир», 1973.
- McOmie JFW. Protective groups in organic chemistry. Plenum Press. London and New York, 1973.

Определение состава фармацевтической субстанции, используемой в средстве, обладающем антиаритмическим действием

© Рогов А. В.¹, Мокров Г. В.²

¹ — АО «Фармцентр ВИЛАР», Москва, Российская Федерация

² — ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Нарушения сердечного ритма наиболее распространены среди патологий сердечно-сосудистой системы. Препараты Аллапинин® и Аллафорте® компании АО «Фармцентр ВИЛАР» являются эффективными антиаритмическими средствами IC-класса. Основным компонентом этих препаратов является фармацевтическая субстанция с МНН – лаппаконитина гидробромид, которая помимо самого лаппаконитина гидробромида содержит примеси других дитерпеновых алкалоидов. Настоящая работа посвящена подробному анализу алкалоидного состава новой фармацевтической субстанции, выделенной из корней и корневищ, а также из наземной части растений рода *Aconitum* (борец) семейства *Ranunculaceae* (лютиковые) с использованием хромато-масс спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Кроме того, проведена оценка количественных соотношений алкалоидов в нескольких образцах фармацевтических субстанций, выделенных из разных партий лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Ключевые слова: антиаритмики; дитерпеновые алкалоиды; лаппаконитин; хромато-масс спектрометрия; ЯМР-спектроскопия

Для цитирования:

Рогов А. В., Мокров Г. В. Определение состава фармацевтической субстанции, используемой в средстве, обладающем антиаритмическим действием. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):XX–XX. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-XX-XX>

Поступила: 19.07.2023. **В доработанном виде:** 25.08.2023. **Принята к печати:** 21.11.2023. **Опубликована:** 30.12.2023.

Determination of the composition of pharmaceutical substances used in drugs with antiarrhythmic activity

© Anton V. Rogov¹, Grigory V. Mokrov²

¹ — “Pharmcenter VILAR” JSC, Moscow, Russian Federation

² — Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract. Cardiac arrhythmias are the most common pathologies of the cardiovascular system. Allapinin® and Allaforte® from “Pharmcenter VILAR” are effective IC-class antiarrhythmic agents. The main component of these drugs is a pharmaceutical substance with INN: lappaconitine hydrobromide, which in addition to lappaconitine hydrobromide itself, contains impurities of other diterpene alkaloids. This work is devoted to a detailed analysis of the alkaloid composition of a new pharmaceutical substance isolated from roots and rhizomes, as well as from the aerial part of plants of the genus *Aconite* (monkshood, wolfsbane) of the *Ranunculaceae* family (buttercups) using chromato-mass spectrometry and NMR spectroscopy. In addition, an assessment was made of the quantitative ratios of alkaloids in several samples of pharmaceutical substances isolated from different batches of medicinal plant raw materials.

Keywords: antiarrhythmics; diterpene alkaloids; lappaconitine; chromato-mass spectrometry; NMR spectroscopy

For citations:

Rogov AV, Mokrov GV. Determination of the composition of pharmaceutical substances used in drugs with antiarrhythmic activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):95–109. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-95-109>

Received: 19.07.2023. **Revision received:** 25.08.2023. **Accepted:** 21.11.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

По данным Всемирной Организации Здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются ведущей причиной смерти во всём мире. В 2019 году от ССЗ умерло около 17,9 миллионов человек, что составило 32 % от общего количества смертей. Ожидается, что к 2030 году распространённость ССЗ увеличится на 40 %, и они будут причиной почти 24 миллионов смертей во всём мире [1].

Пандемия COVID-19 внесла существенный дополнительный вклад в распространённость и тяжесть течения ССЗ. Больные с сопутствующими ССЗ относятся к особо уязвимой когорте, отличающейся тяжёлым течением COVID-19 и высокой госпитальной летальностью. Имеются доказательства формирования вызванной COVID 19 сердечно-сосудистой патологии *de novo*, названной острым COVID-19-

ассоциированным сердечно-сосудистым синдромом, выраженным в различных видах аритмии, миокардитах, острых кардиальных повреждениях и тромботических нарушениях [2, 3].

Среди патологий сердечно-сосудистой системы нарушения сердечного ритма наиболее распространены. Сообщалось о вызывающем тревогу количестве людей с внезапной сердечной смертью в качестве первого симптома сердечной аритмии, что составляет около 20 % всех смертей ежегодно. Кроме того, пациенты, склонные к предсердным тахикардиям, таким как трепетание и фибрилляция предсердий, часто имеют сопутствующие заболевания, включая артериальную гипертензию, ишемическую болезнь сердца, клапанную кардиомиопатию и повышенный риск инсульта [4].

Препараты Аллапинин® и Аллафорте® компании АО «Фармцентр ВИЛАР», содержащие в качестве

основного активного компонента лаппаконитина гидробромид, являются эффективными антиаритмическими средствами IC-класса по классификации Vaughan–Williams. Они успешно применяются в клинической практике на территории Российской Федерации для лечения желудочковых и наджелудочковых экстрасистолий, пароксизмальных форм фибрилляций и трепетаний предсердий, пароксизмальных желудочковых и наджелудочковых тахикардий [5, 6].

Активные компоненты препаратов Аллапинин® и Аллафорте® выделяются из травы, корневищ и корней растений рода *Aconitum* (борец) семейства *Ranunculaceae* (лютиковые): борца северного (борца высокого) — *Aconitum septentrionale* Koelle, а также борца белоустого — *Aconitum leucostomum* (далее — ЛРС). Известно, что в этих растениях содержится большая смесь дитерпеновых алкалоидов, таких как лаппаконитин, N-дезацетиллаппаконитин, ранаконитин, сепаконитин, N-ацетилсепаконитин и ряд других. Вследствие этого в составе препаратов Аллапинин® и Аллафорте® помимо основного действующего вещества — лаппаконитина гидробромида, также содержится сопутствующая смесь родственных алкалоидов [7, 8].

На сегодняшний день в литературе отсутствуют исследования по анализу количественного состава субстанции, выделяемой из борца северного и борца белоустого. В то же время фармакологическое действие лекарственных средств, созданных на базе смеси алкалоидов из этих растений, может быть обусловлено именно определённой суммой биологических эффектов каждого из их компонентов. В связи с этим актуальным является создание новых безопасных и эффективных лекарственных средств на основе алкалоида лаппаконитина и других родственных алкалоидов, содержащихся в ЛРС. Для этого перед авторами стояли следующие задачи: 1) разработать способы выделения из ЛРС новых фармацевтических композиций, содержащих в своём составе, помимо лаппаконитина, другие родственные алкалоиды; 2) установить количественный и качественный состав алкалоидов в новых фармацевтических композициях, чему и посвящена настоящая работа.

Данная работа является одним из этапов создания средства, обладающего антиаритмическим действием, и разработки способа получения фармацевтической субстанции, в составе которой будут содержаться алкалоиды дитерпенового ряда, обеспечивающие дополнительные (помимо антиаритмического) лечебные эффекты. Описанные в настоящей статье эксперименты были проведены в период с 2013 по 2014 гг.

Материалы и методы / Materials and methods

ЯМР-спектроскопия / NMR spectroscopy

Строение соединений устанавливали методами одномерной ¹H- , ¹³C- и двумерной ЯМР-спектроскопии

(ядерная магнитно-резонансная спектроскопия). В качестве двумерных методов проводились следующие эксперименты: COSY — гомоядерная корреляция, HMBC — гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия, HSQC — гетероядерная одно-квантовая корреляционная спектроскопия, NOESY — ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера. Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали в шкале δ, м. д. на спектрометре Bruker Fourier 300 HD (Bruker Corporation, Leipzig, Germany, 300 и 75 МГц для ядер ¹H- и ¹³C, соответственно) в растворах DMSO-d₆ и CDCl₃, внутренний стандарт тетраметилсилан (0 м.д.). Константа спин-спинового взаимодействия J, Гц. Для обозначения резонансных сигналов использовали следующие сокращения: с (s) — синглет, д (d) — дублет, т (t) — триплет, кв (q) — квартер, м (m) — мультиплет.

Хромато-масс спектрометрия / Chromatography-mass spectrometry

В работе был использован высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent LC/MS 1200 с использованием диодно-матричного детектора и масс-детектора. В качестве аналитической хроматографической колонки использовалась ReproSil — Pur Basic C18,5 мкм 250×4,6 мм производства Dr. Maisch GmbH. Для хроматографии использовался ацетонитрил Acetonitrile for UHPLC Supergradient фирмы Panreac; вода высокой степени очистки, пригодная для работы в UHPLC; формиат аммония фармакопейного качества; муравьиная кислота фармакопейного качества; трифторуксусная кислота.

Приготовление формиатно-аммонийного буферного раствора для приготовления подвижной фазы / Preparation of formate-ammonium buffer solution for the preparation of the mobile phase

200 мг (точная навеска) формиата аммония взвешивают в стеклянном стакане на аналитических весах с точностью до 0,2 мг. 1000 мл чистой воды отмеряют, пользуясь мерным цилиндром. Полностью смывают 1000 мл воды взвешенный формиат аммония из стеклянного стакана для взвешивания в ёмкость для приготовления буферного раствора. В ёмкость для приготовления буферного раствора помещают магнитный мешалник, помещают ёмкость на магнитную мешалку. После 3–5 минут перемешивания, когда формиат аммония полностью растворится, в ёмкость опускают электрод рН-метра и замеряют полученный уровень рН. Доводят уровень рН до значения 5,00 с помощью 1 % раствора муравьиной кислоты. После получения раствора с необходимым уровнем рН содержимое стакана переливают в бутылку объёмом 1 л из тёмного стекла с герметичной крышкой. Готовый формиатно-аммонийный буферный раствор годен для употребления в течение 24 часов при хранении в тёмном месте при комнатной температуре.

Приготовление подвижной фазы / Preparation of the mobile phase

В чистый сухой мерный цилиндр объёмом 500 мл наливается 100 мл ацетонитрила. После этого ацетонитрил из цилиндра переливается (как можно более полно) в ёмкость для получения подвижной фазы. Далее в этот же цилиндр наливается 300 мл формиатно-аммонийного буферного раствора для приготовления подвижной фазы. Буферный раствор из цилиндра переливается (как можно более полно) в ёмкость для получения подвижной фазы. Содержимое ёмкости для получения подвижной фазы перемешивается. Полученная подвижная фаза переливается в бутылку из тёмного стекла с герметичной крышкой. Подвижная фаза годна для употребления в течение 24 часов.

Приготовление раствора испытуемой субстанции (испытуемый раствор) / Preparation of the solution of the test substance (test solution)

Около 50 мг (точная навеска) испытуемой субстанции вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и растворяют в подвижной фазе, доводят объём до метки тем же растворителем и перемешивают.

Приготовление раствора субстанции с идентифицированными примесями (стандартный раствор) / Preparation of a solution of a substance with identified impurities (standard solution)

Около 50 мг (точная навеска) субстанции с идентифицированными (методом LCMS или с помощью внешних стандартов) примесями вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и растворяют в подвижной фазе, доводят объём до метки тем же растворителем и перемешивают.

Приготовление раствора для промывки / Preparation of the washing solution

В 500 мл ацетонитрила добавляют 500 мкл трифторуксусной кислоты и перемешивают. Переливают в бутылку тёмного стекла. Раствор для промывки годен для употребления в течение 1 месяца с момента приготовления.

Проведение анализа / Conducting an analysis

По 5 мкл испытуемого раствора и стандартного раствора попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе, получая не менее 2 хроматограмм для каждого раствора в следующих условиях:

- элюирование проводят в изократическом режиме;
- скорость потока подвижной фазы 1,0 мл в мин;
- время интегрирования 40 минут (длительность цикла анализа);
- детектирование при длине волны 220 нм;
- чувствительность детектора устанавливается опытным путём.

Промывка колонки / Flushing the column

После проведения каждого 8–12 циклов анализа колонка нуждается в промывке, что становится заметно по возрастающему уровню давления. Промывка осуществляется раствором для промывки в течение не менее 60 минут при скорости 1 мл в минуту. Колонка считается промытой, если после 60 минут промывки базовая линия не даёт отклонения от «нулевого значения» более 10 mAU.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Состав фармацевтических композиций был установлен при помощи высокочувствительного инструментального метода анализа — высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием диодно-матричного детектора и масс-детектора, позволяющего определить не только времена удерживания, но и молекулярные массы компонентов, а также при помощи ключевого метода анализа структурного строения соединений — ЯМР-спектроскопии. При этом, помимо стандартных одномерных ^1H - и ^{13}C -спектров, для полного отнесения сигналов и подтверждения структур молекул использовались эксперимент по неискаженному усилению переносом поляризации (DEPT) и набор двумерных экспериментов: COSY, HMBC, HSQC и NOESY.

По данным хроматографии, исследуемые фармацевтические композиции содержат 7 основных компонентов и микропримеси в количестве не менее 5 минорных алкалоидов (рис. 1).

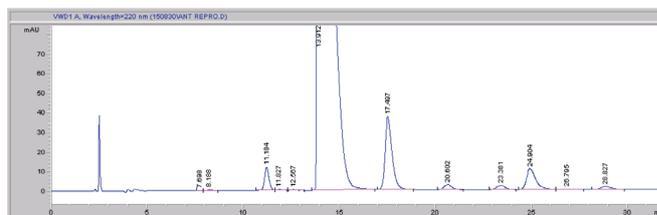


Рис. 1. Типичная хроматограмма одной из фармацевтических композиций

Fig. 1. Typical chromatogram of one of the pharmaceutical compositions

С использованием методов хромато-масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии было установлено, что основными алкалоидами в составе фармацевтической композиции являются лаппаконитин, N-ацетилсепаконитин, 1-дезметиллаппаконитин, ранаконитин, N-дезацетиллаппаконитин, изолаппаконитин, 9 деоксилаппаконитин (рис. 2). В таблицах 1 и 2 представлены установленные при помощи комплекса одномерных и двумерных методик химические сдвиги протонов и углеродов компонентов смеси алкалоидов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C , соответственно. Далее в работе представлен процесс идентификации

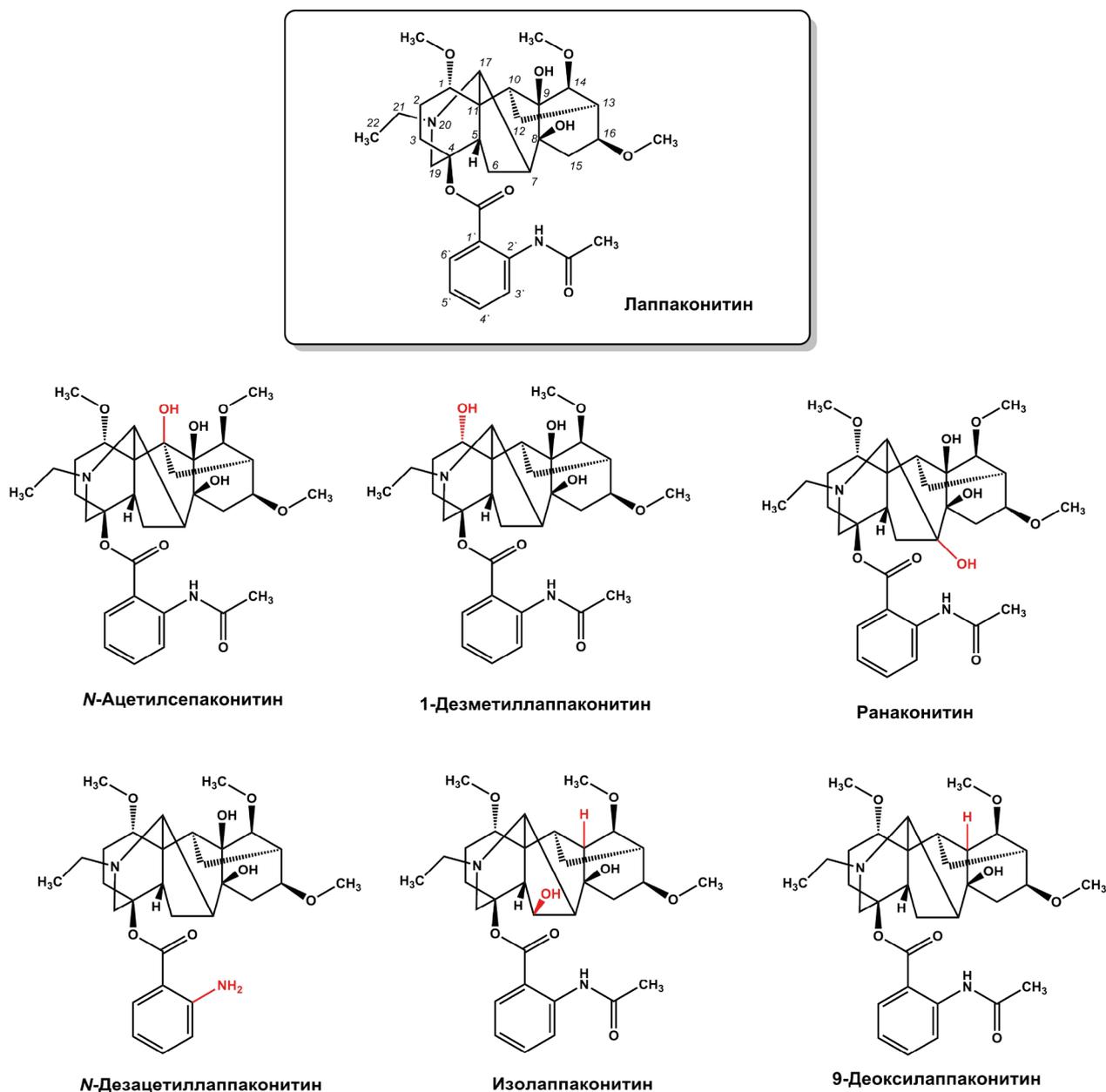


Рис. 2. Структуры алкалоидов, идентифицированных с использованием методов хромато-масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии в исследуемых фармацевтических композициях

Fig. 2. Structures of alkaloids identified using chromato-mass spectrometry and NMR spectroscopy in the studied pharmaceutical compositions

Примечание: красным цветом выделены отличия в структурах алкалоидов от основного компонента композиции — лаппаконитина.
Note: the differences in the structures of alkaloids from the main component of the composition — lappaconitine are highlighted in red.

Таблица 1

Химические сдвиги компонентов смеси алкалоидов в спектрах ¹H ЯМР

Table 1

Chemical shifts of the components of the alkaloid mixture in the ¹H NMR spectra

Номера протонов	Лаппаконитин	1-Дезметиллаппаконитин	Ранаконитин	N-Дезацетиллаппаконитин	N-Ацетилсепаконитин	Изолаппаконитин	9-Деоксилаппаконитин
H1	3,26 dd (10,1, 7,2)	3,82 t (3)	3,00 m	3,20 dd (7&10)	3,29 m	3,04 m	3,11 m
H2	2,20 m, 2,28 m	2,33 m, 2,42 m	2,12 m	2,01 m, 2,53 m	2,15 m, 2,31 m	2,11 m, 2,42 m	2,15 m
H3	1,92 m, 2,60 m	1,75 m, 2,00 m	1,85 m, 2,53 m	1,77 m, 2,72 m	2,06 m, 2,43 m	1,83 m, 2,51 m	1,67 m, 2,52 m
H5	2,09 d (8,4)	2,73 s	1,89 m	2,37 m	2,10 d (8,4)	2,75 s	2,35 m
H6	1,54 m, 2,79 m	1,78 m, 2,20 m	1,38 d (14), 2,99 m	2,20 m, 2,30 m	1,64 m, 2,51 m	4,68 d (7)	1,91 m, 2,36 m
H7	2,40 d (7,5)	2,19 m	—	2,16 d (8)	2,45 d (7,5)	2,56 d (7)	2,15 m
H9	—	—	—	—	—	3,19 m	1,92 m
H10	2,05 m	2,17 m	2,25 m	2,01 m	—	2,32 m	2,39 m
H12	2,03 m, 2,45 m	1,70 m, 2,70 m	1,89 m, 2,32 m	1,65 m, 2,67 m	1,93 m, 2,64 m	1,90 m, 1,13 m	1,80 m, 2,07 m
H13	2,37 dd (7,9, 4,7)	2,52 t (5)	2,18 m	2,38 t (5)	2,29 m	2,53 m	2,29 m
H14	3,39 dd (4,8, 1,1)	3,50 d (5)	3,31 d (5)	3,43 d (5)	3,28 dd (4,8, 1,1)	3,25 m	3,19 d (7)
H15	2,15 m, 2,22 m	2,13 m, 2,36 m	1,73 m, 2,71 m	2,03 m, 2,40 m	2,18 m, 2,21 m	2,16 m, 2,30 m	1,95 m, 2,29 m
H16	3,29 m	3,42 m	3,12 m	3,32 m	3,30 m	3,56 m	3,21 m
H17	3,02 s	2,92 s	2,68 s	3,00 s	2,91 s	3,58 s	2,95 s
H19	2,45 d (11,4), 3,56 d (11,4)	2,60 d (12), 3,36 d (12)	3,06 d (11), 3,47 d (11)	2,55 d (11), 3,62 d (11)	2,58 d (11,4), 3,57 d (11,4)	2,82 d (13), 4,51 d (13)	2,52 d (12), 3,56 d (12)
H21 CH2	2,52 q (7,0)	2,60 q (7)	2,87 q (7)	2,54 q (7,2)	2,58 q (7,0)	3,07 q (7)	2,55 q (7)
H22 CH3	1,12 t (7,0)	1,20 t (7)	1,00 t (7)	1,24 t (7,2)	1,14 t (7,0)	1,41 t (7)	1,14 t (7)
1-OMe	3,31 s	—	3,19 s	3,30 s	3,35 s	3,38 s	3,31 s
14-OMe	3,37 s	3,43 s	3,26 s	3,42 s	3,44 s	3,44 s	3,43 s
16-OMe	3,29 s	3,35 s	3,18 s	3,32 s	3,34 s	3,35 s	3,35 s
H3'	8,42 d (8,8)	8,70 d (8)	8,30 d (8)	6,62 d (8,2)	8,68 d (8,8)	8,49 d (8)	8,69 d (8)
H4'	7,52 dd (8,4, 7,3)	7,05 t (8)	7,16 t (8)	7,23 t (8,2)	7,52 t (8,4)	7,12 t (8)	7,05 t (8)
H5'	7,12 dd (8,0, 7,3)	7,53 t (8)	7,57 t (8)	6,60 t (8,2)	7,04 t (8,0)	7,56 t (8)	7,53 t (8)
H6'	7,93 d (8,0)	7,93 d (8)	7,85 d (8)	7,78 d (8,2)	7,92 d (8,0)	7,97 d (8)	7,94 d (8)
CO-CH3	2,19 s	2,26 s	2,12 s	—	2,25 s	2,24 s	2,25 s
NH	broad	11,07 bs	broad	5,67 bs	broad	10,5 bs	11,06 bs

Примечания: s – синглет; d – дублет; t – триплет; q – квартет; dd – дублет дублетов; m – мультиплет; bs – широкий синглет; broad – уширенный сигнал без определенного химсдвига.

Notes: s is a singlet; d is a doublet; t is a triplet; q is a quartet; dd is a doublet of doublets; m is a multiplet; bs is a broad singlet; broad is a widened signal without a certain chemical shift.

каждого компонента смеси, за исключением основного широкоизученного алкалоида лаппаконитина и пяти минорных алкалоидов, выделение и идентификация которых в чистом виде затруднена вследствие их крайне малого содержания в исследуемой фармацевтической композиции.

N-Ацетилсепаконитин / N-Acetylsepaconitine

Установлено, что соединение со временем удерживания 10–12 минут при заданных условиях хроматографирования и массой молекулярного иона 602 г/моль является N-ацетилсепаконитином, который отличается от лаппаконитина наличием дополнительной гидроксильной группы в 10-м положении дитерпеновой системы. В спектре ЯМР ¹H этого вещества в сравнении с лаппаконитином (см. табл. 1) исчезает сигнал протона H(10) и смещаются химсдвиги протонов при C(12). Химсдвиг протона H(12a) изменяется от 2,03 до 1,93 м.д., а протона H(12b) — смещается в слабое поле с 2,45 до 2,64 м.д. Существенное измене-

ние химсдвига углерода C(10) наблюдается в спектре ЯМР ¹³C с 52,3 до 70,6 м.д. вследствие появления при этом атоме гидроксигруппы (см. табл. 2).

Масс-спектр образца также полностью соответствует N-ацетилсепаконитину. На рис. 3 приведён этот спектр и соответствующая ему схема фрагментации N-ацетилсепаконитина. В области тяжёлых фрагментов распада основными пиками являются пики с массами 583,6; 551,5; 533,6, которые соответствуют последовательному отщеплению молекул воды и метанола от исходного соединения. При отщеплении антраилового фрагмента фиксируется молекулярный ион дитерпенового каркаса с m/z = 440,4. Последующее отщепление молекул метанола и воды даёт интенсивные пики 422,4; 404,4; 372,3 и 340,3.

1-Дезметиллаппаконитин / 1-Desmethyllappaconitin

Массой молекулярного иона 572 г/моль и временем удерживания 19–22 минут обладало соединение, соответствующее структурной формуле 1-дезметиллап-

Таблица 2

Химические сдвиги компонентов смеси алкалоидов в спектрах ¹³C ЯМР

Table 2

Chemical shifts of the components of the alkaloid mixture in the ¹³C NMR spectra

	Лаппаконитин	1-Дезметиллаппаконитин	Ранаконитин	N-Дезацетиллаппаконитин	N-Ацетилсепаконитин	Изолаппаконитин	9-Деоксиллаппаконитин
C1	85,4	72,1	83,9	84,4	77,7	83,7	84,3
C2	28,0	30,3	27,1	26,3	26,6	26,7	26,9
C3	32,9	29,9	31,9	32,0	31,6	31,8	32,0
C4	86,1	82,7	84,8	82,9	84,7	84,2	84,3
C5	49,4	43,9	50,9	48,8	44,5	51,6	46,5
C6	25,2	27,3	32,3	26,9	24,5	70,4	29,2
C7	49,5	46,5	86,9	47,7	46,7	50,2	46,2
C8	76,0	76,2	76,5	75,7	74,6	76,1	74,1
C9	80,1	77,5	78,4	78,6	78,8	44,5	45,5
C10	52,3	48,3	36,3	49,9	79,6	44,0	37,1
C11	52,5	50,3	50,9	51,0	56,4	50,2	50,7
C12	27,4	23,6	26,3	24,1	37,4	22,5	25,2
C13	37,7	36,3	48,7	36,4	34,4	36,9	49,7
C14	91,3	90,3	89,7	90,2	87,8	81,9	84,2
C15	44,5	45,3	36,0	44,8	44,9	42,3	42,1
C16	84,7	82,8	83,6	83,0	82,7	80,2	82,7
C17	62,2	63,3	62,2	61,6	61,6	63,6	61,4
C19	55,9	58,0	55,0	55,7	55,4	58,9	55,0
C21 (CH ₂)	49,9	48,3	50,3	49,1	48,9	50,7	48,9
C22 (CH ₂)	13,7	13,0	14,4	13,6	13,5	10,1	13,5
1-OMe	56,7	-	55,9	56,5	56,2	56,4	56,6
14-OMe	58,2	58,0	57,5	57,9	58,0	57,8	57,8
16-OMe	56,4	56,3	56,3	56,1	56,3	56,0	56,2
C1'-C=O	168,4	167,2	166,6	167,2	167,4	166,7	167,7
C1'	118,7	115,5	118,5	111,9	115,7	115,9	115,8
C2'	141,9	141,9	140,5	150,4	141,7	141,1	141,9
C3'	122,0	120,4	121,5	116,6	120,2	121,1	120,3
C4'	135,1	122,3	123,5	133,8	134,4	123,2	122,4
C5'	124,2	134,6	134,3	116,2	122,3	135,1	134,5
C6'	132,1	130,9	131,1	131,6	131,0	131,0	131,0
N-C=O	171,4	169,1	169,0	-	169,1	169,1	169,0
CO-CH ₃	25,0	25,6	25,2	-	25,6	25,6	25,6

паконитина, у которого в отличие от лаппаконитина вместо метоксигруппы в первом положении присутствует гидроксильная. Это изменение оказывало существенное влияние на химсдвиг протона Н(1) в спектре ЯМР ¹H, который сместился от 3,26 м.д. (в лаппаконитине) до 3,82 м.д. (см. табл. 1). Сильное смещение в слабое поле относительно лаппаконитина наблюдалось также для протона Н(5) (2,73 м.д. в 1-дезметиллаппаконитине против 2,09 м.д. в лаппаконитине). В спектре ЯМР ¹³C наблюдалось смещение атома углерода С(1) в более сильное поле (72,1 м.д.) в сравнении с этим же атомом лаппаконитина (85,4 м.д.) (см. табл. 2).

В масс-спектре 1-дезметиллаппаконитина (рис. 4) основным является пик с массой 553,6, который соответствует фрагменту исходной молекулы с отщеплен-

ной водой. Дальнейший распад с отделением молекулы метанола приводит к массе 521,5. Отщепление антраилового фрагмента с последующим элиминированием молекул воды и метанола приводит к фрагментам с массами 392,4; 374,4; 356,4; 342,4 и 324,4.

Ранаконитин / Ranaconitin

Временем удерживания 15–16 минут и массой молекулярного иона 602 г/моль обладало соединение, соответствующее структурной формуле ранаконитина, у которого в сравнении с лаппаконитином в седьмом положении дитерпеновой системы присутствует гидроксильная группа. Такое изменение приводило к изменению химсдвигов протонов при атоме С(6): сигналы двух протонов Н(6) фиксировались при 1,38 и 2,99 м.д. в отличии от соответствующих сигналов

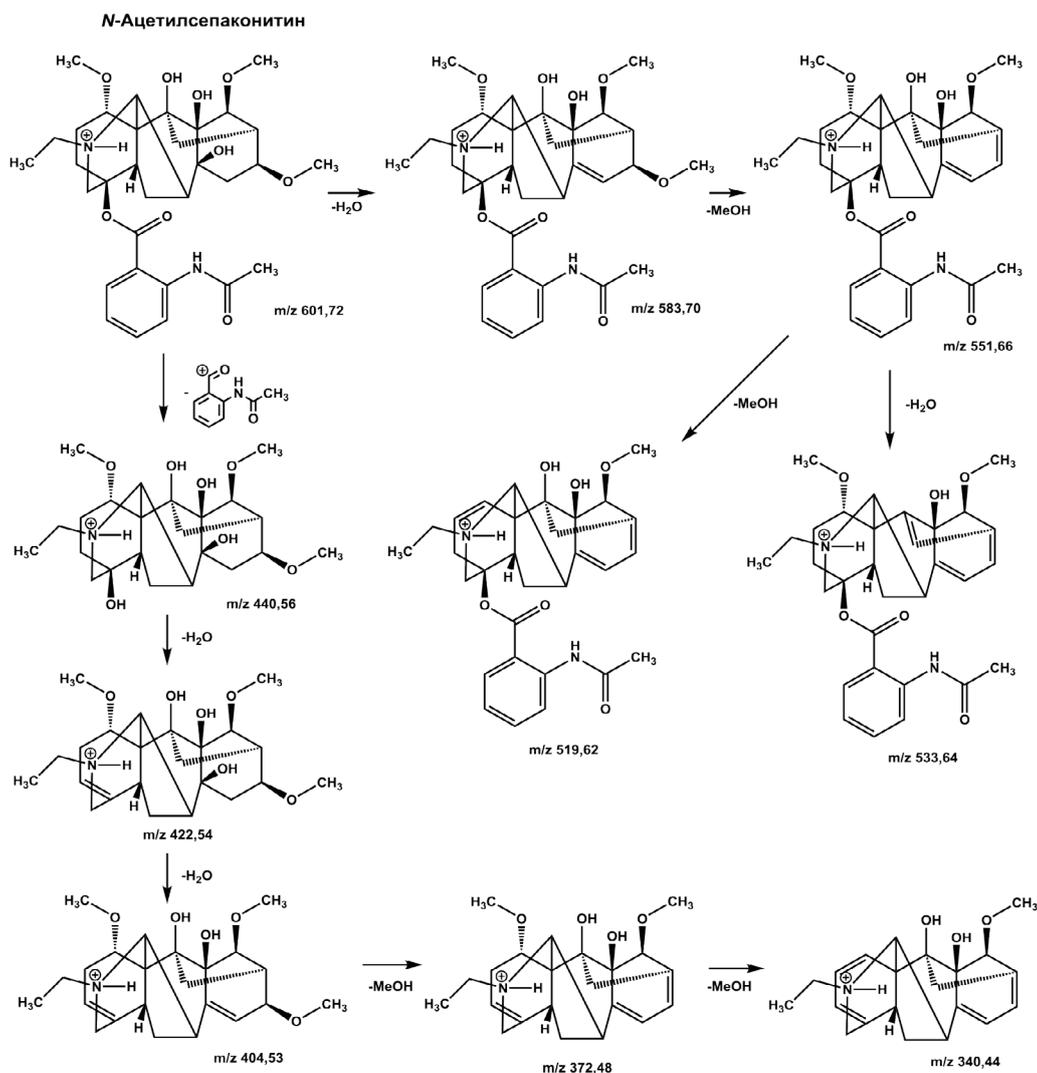
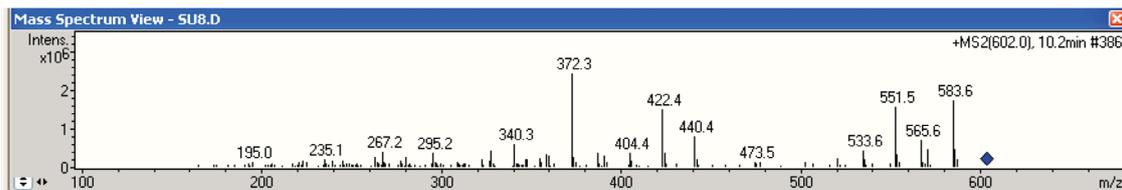


Рис. 3. Масс-спектр и соответствующая ему схема фрагментации N-ацетилсепаконитина
Fig. 3. Mass spectrum and corresponding scheme of fragmentation of N-acetylsepaconitine

лаппаконитина (1,54 и 2,79 м.д.) (см. табл. 1). Существенные изменения наблюдались и для протонов при атоме С(15). В ранаконитине атомы Н(15) наблюдались при 1,73 и 2,71 м.д. при таковых значениях для лаппаконитина в 2,15 и 2,22 м.д. В спектре ЯМР ¹³С благодаря появлению в 7-м положении гидроксильной группы происходило существенное смещение атома углерода С(7) в слабое поле (86,9 м.д.) в сравнении с этим же атомом лаппаконитина (49,5 м.д.) (см. табл. 2).

Масс-спектр соответствует структуре ранаконитина (рис. 5). Отщепление воды от молекулярного иона с массой 602,0 даёт интенсивный пик с массой 583,5. При последующем отщеплении метанола образуется фрагмент с массой 551,5. При отщеплении антранилового фрагмента фиксируется фрагмент с массой 440,5. Последующее элиминирование молекул воды и метанола приводит к интенсивным пикам фрагментов с массами 422,4; 404,5 и 372,4, а также к менее интенсивному пику фрагмента 340,3.

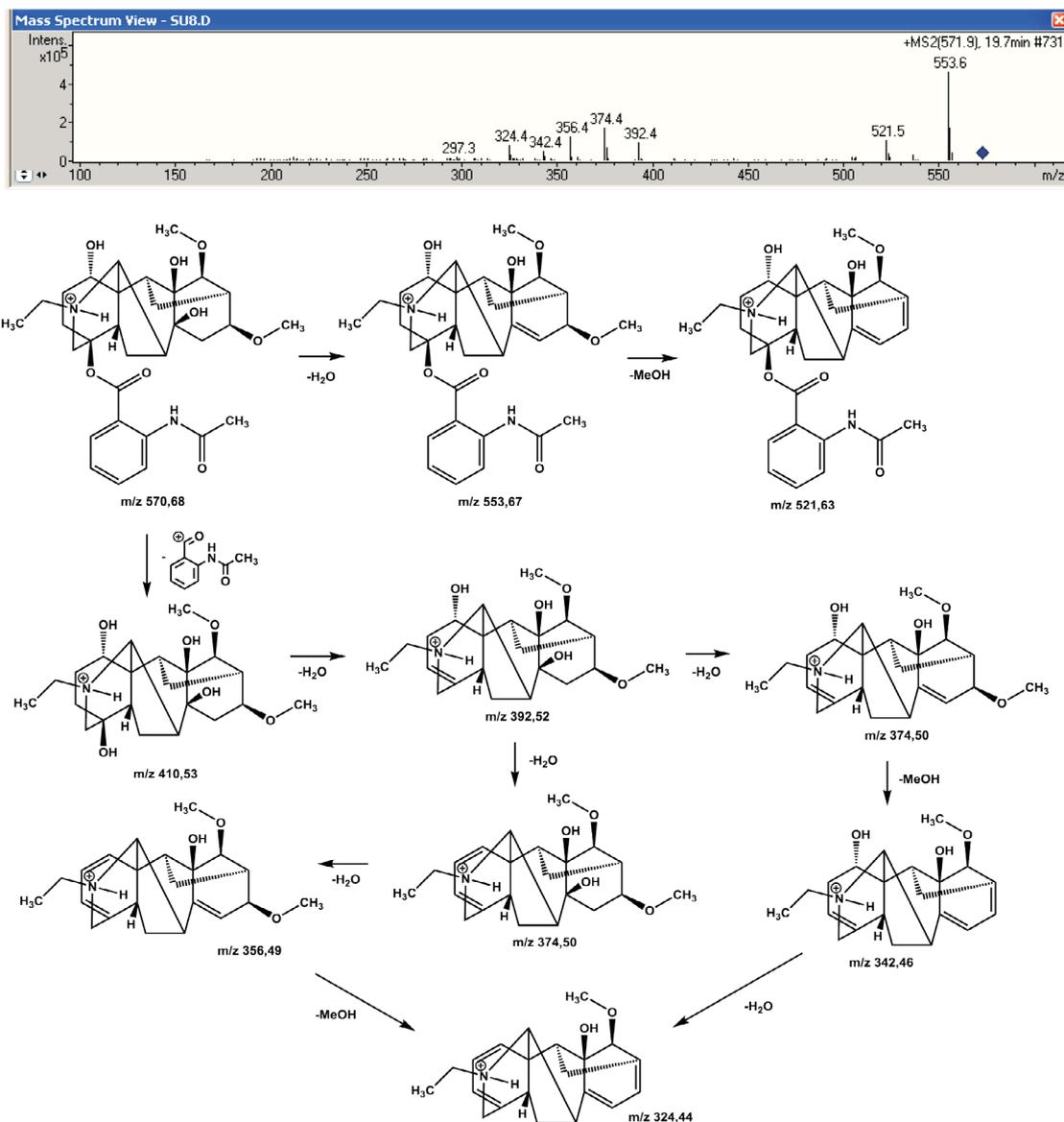


Рис. 4. Масс-спектр и соответствующая ему схема фрагментации 1-дезметиллаппаконитина
Fig. 4. Mass spectrum and corresponding fragmentation scheme of 1-desmethyllappaconitine

***N*-Дезацетиллаппаконитин / *N*-Deacetylappaconitin**

N-Дезацетиллаппаконитин, отличающийся от лаппаконитина отсутствием *N*-ацетильной группы при хроматографировании имел время удерживания 24–26 минут. Несмотря на структурное изменение в антралиновом фрагменте, в спектре ЯМР ¹H наблюдались довольно существенные изменения в химсдвигах некоторых протонов и в дитерпеновой системе (см. табл. 1). Так, протон H(5) в *N*-дезацетиллаппаконитине смещался в более слабое поле (2,37 м.д.) относительно такого в лаппаконитине (2,09 м.д.). Напротив, протон H(7) наблюдался в более сильном поле (2,16), чем в лаппаконитине (2,40 м.д.). По-видимому, такие изменения в химсдвигах обусловлены некоторым изменением геометрии молекулы за счёт удаления

ацетильной группы. Наибольшее изменение химсдвига фиксировалось для протона H(3') в ароматическом кольце за счёт экранирующего влияния аминогруппы (6,62 в *N*-дезацетиллаппаконитине; 8,42 в лаппаконитине). В спектре ЯМР ¹³C небольшие изменения наблюдались лишь в ароматической системе: химсдвиги углеродов в фенильных кольцах изменялись в пределах 10 м.д (см. табл. 2).

В масс-спектре *N*-дезацетиллаппаконитина (рис. 6) при отщеплении воды от молекулярного иона с массой 543,7 наблюдается пик с массой 525,6. Дальнейшее отщепление метанола приводит к интенсивному пику фрагмента с массой 493,5. Последующее отделение молекулы метанола даёт пик 461,4. Фрагментация с отщеплением антралинового фрагмента приводит

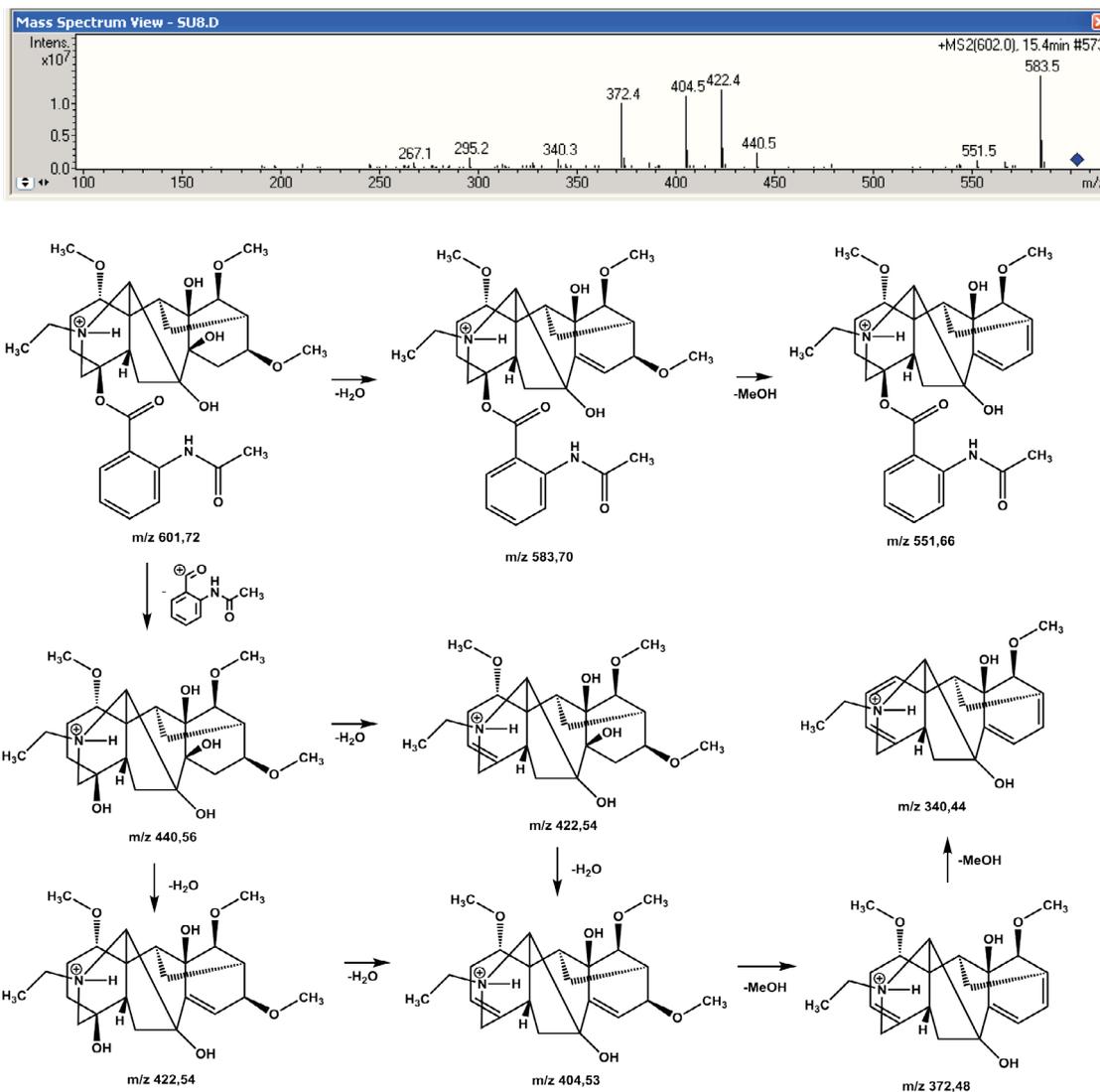


Рис. 5. Масс-спектр и соответствующая ему схема фрагментации ранаконитина
Fig. 5. Mass spectrum and corresponding fragmentation scheme of ranaconitine

к пику с массой 424,6. При дальнейшем элиминировании молекул воды и метанола фиксируются интенсивные пики фрагментов с массами 406,4; 388,4; 374,5; 356,4 и 324,3.

Изолаппаконитин / Isolappaconitin

При заданных условиях хроматографирования установлено, что соединение с временем удерживания 18–19 минут и массой молекулярного иона 585,9 г/моль является изолаппаконитином, который отличается от лаппаконитина положением одной из гидроксильных групп: вместо 9-го положения в лаппаконитине, в изолаппаконитине ОН группа находится в 6-ом положении дитерпеновой системы. За счёт такого изменения в спектре ЯМР ¹H этого вещества в сравнении с лаппаконитином (см. табл. 1) появляется протон Н(9) при 3,19 м.д. Протон Н(6) за счёт появления гидроксильной группы находится

в слабом поле (4,68 м.д.). В спектре ЯМР ¹³C атом углерода С(9) смещается в сильное поле (44,5 м.д.) в сравнении с лаппаконитином (80,1 м.д.). Напротив, сигнал атома С(6) существенно сдвигается в слабое поле (70,4 м.д.) по отношению к таковому для лаппаконитина (25,2 м.д.) (см. табл. 2).

Масс-спектр образца полностью соответствует изолаппаконитину (рис. 7). В области тяжёлых фрагментов распада основными являются пики с массами 567,6; 549,5; 535,6 и 517,6, которые соответствуют последовательному отщеплению молекул воды и метанола от исходного изолаппаконитина. При отщеплении антрапилового фрагмента наблюдается малоинтенсивный фрагмент с массой 424,6. Последующее отщепление молекул метанола и воды даёт малоинтенсивные пики фрагментов с массами 406,5; 388,4 и 356,4.

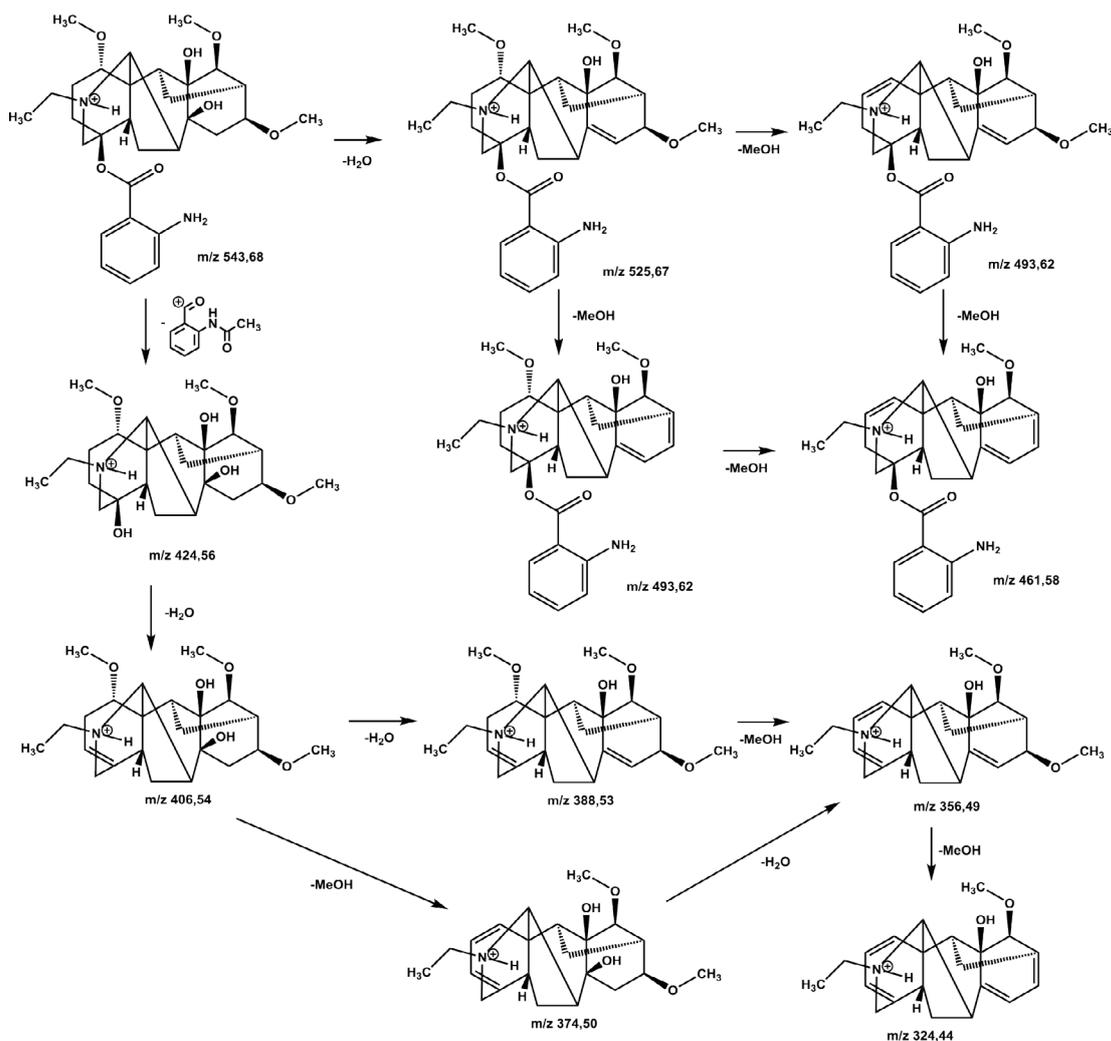
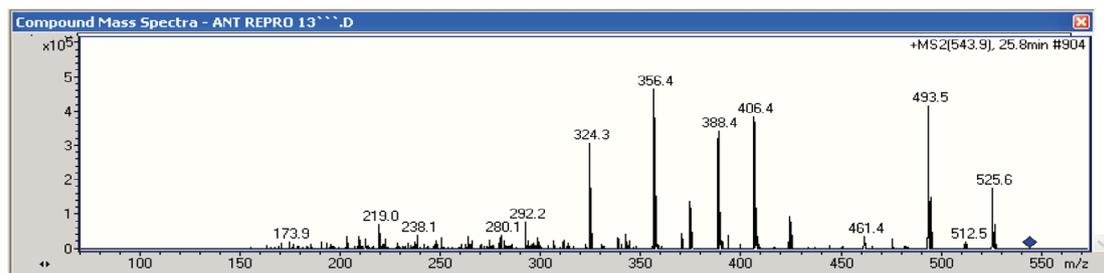


Рис. 6. Масс-спектр и соответствующая ему схема фрагментации N-дезацетиллаппаконитина
 Fig. 6. Mass spectrum and corresponding fragmentation scheme of N-desacetylilappaconitine

9-Деоксилаппаконитин / 9-deoxyilappaconitine

Соединение со временем удерживания 25–26 минут и массой молекулярного иона 570,0 г/моль было идентифицировано как 9-деоксилаппаконитин, который отличается от лаппаконитина отсутствием в 9-м положении дитерпеновой системы гидроксильной группы. В спектре ЯМР ^1H этого вещества в сравнении с лаппаконитином (см. табл. 1) аналогично изолаппаконитину появляется протон H(9) при 1,92 м.д.

В сильное поле смещается протон H(14) (3,19 м.д. против 3,39 м.д. в лаппаконитине); протон H(7) (2,15 м.д. против 2,40 м.д. в лаппаконитине). Интересно отметить, что протон H(10), напротив, у 9-деоксилаппаконитина располагается в более слабом поле (2,39 м.д.), чем у лаппаконитина (2,05 м.д.). В спектре ЯМР ^{13}C атом углерода C(9) смещён в сильное поле (45,5 м.д.) в сравнении с лаппаконитином (80,1 м.д.) (см. табл. 2).

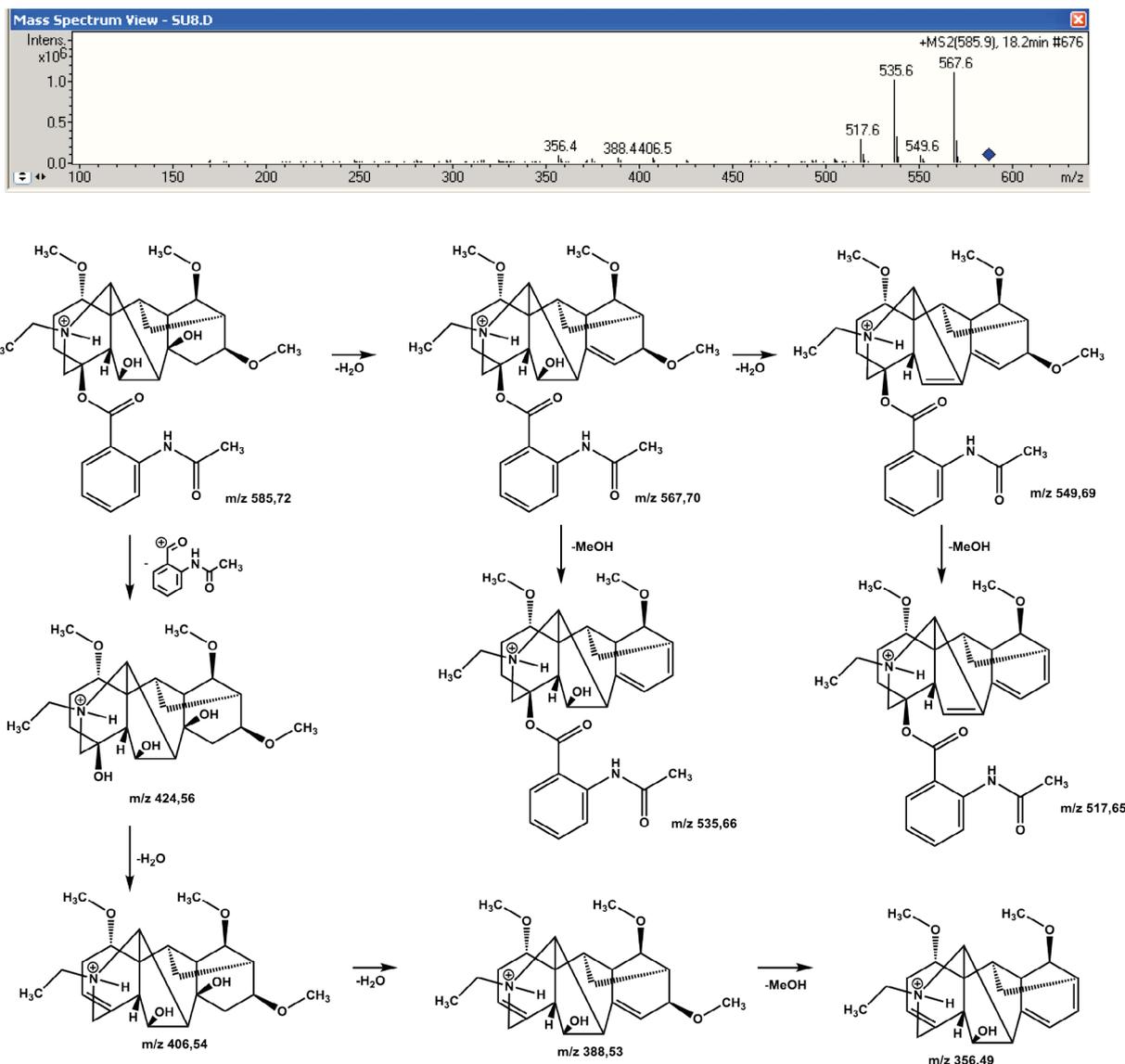


Рис. 7. Масс-спектр и соответствующая ему схема фрагментации изолаппаконитина
 Fig. 7. Mass spectrum and corresponding fragmentation scheme of isolappaconitine

В масс-спектре 9-деоксилаппаконитина (рис. 8) за счёт последовательного отщепления молекул воды и метанола наблюдаются пики с массами 551,6; 519,5 и 487,6. В области более лёгких фрагментов фиксируются малоинтенсивные пики с массами 408,5; 390,5; 372,4; 340,4 и 308,4, которые соответствуют фрагменту, образованному в результате отщепления от исходной молекулы антранилового фрагмента и дальнейшего отщепления молекул метанола и воды.

Определение количественного содержания алкалоидов в фармацевтических композициях / Determination of the quantitative content of alkaloids in pharmaceutical compositions

Для оценки количественного содержания идентифицированных алкалоидов в фармацевтических ком-

позициях нами были использованы различные образцы фармацевтических композиций, выделенные из травы, корневищ и корней как борца северного (*Aconitum septentrionale Koelle*), так и борца белоустого (*Aconitum leucostomum*), произрастающих в разных географических поясах. Кроме того, нами были получены фармацевтические композиции, содержащие алкалоиды лаппаконитин, N-ацетилсепаконитин, 1-дезметиллаппаконитин, ранаконитин, N-дезацетиллаппаконитин, изолаппаконитин, 9-деоксилаппаконитин как в несвязанном виде, т. е. в виде основания, так и в виде солей с органическими и неорганическими кислотами, в том числе в виде гидробромидов. Составы фармацевтических композиций устанавливались при помощи ВЭЖХ с использованием диодно-матричного детек-

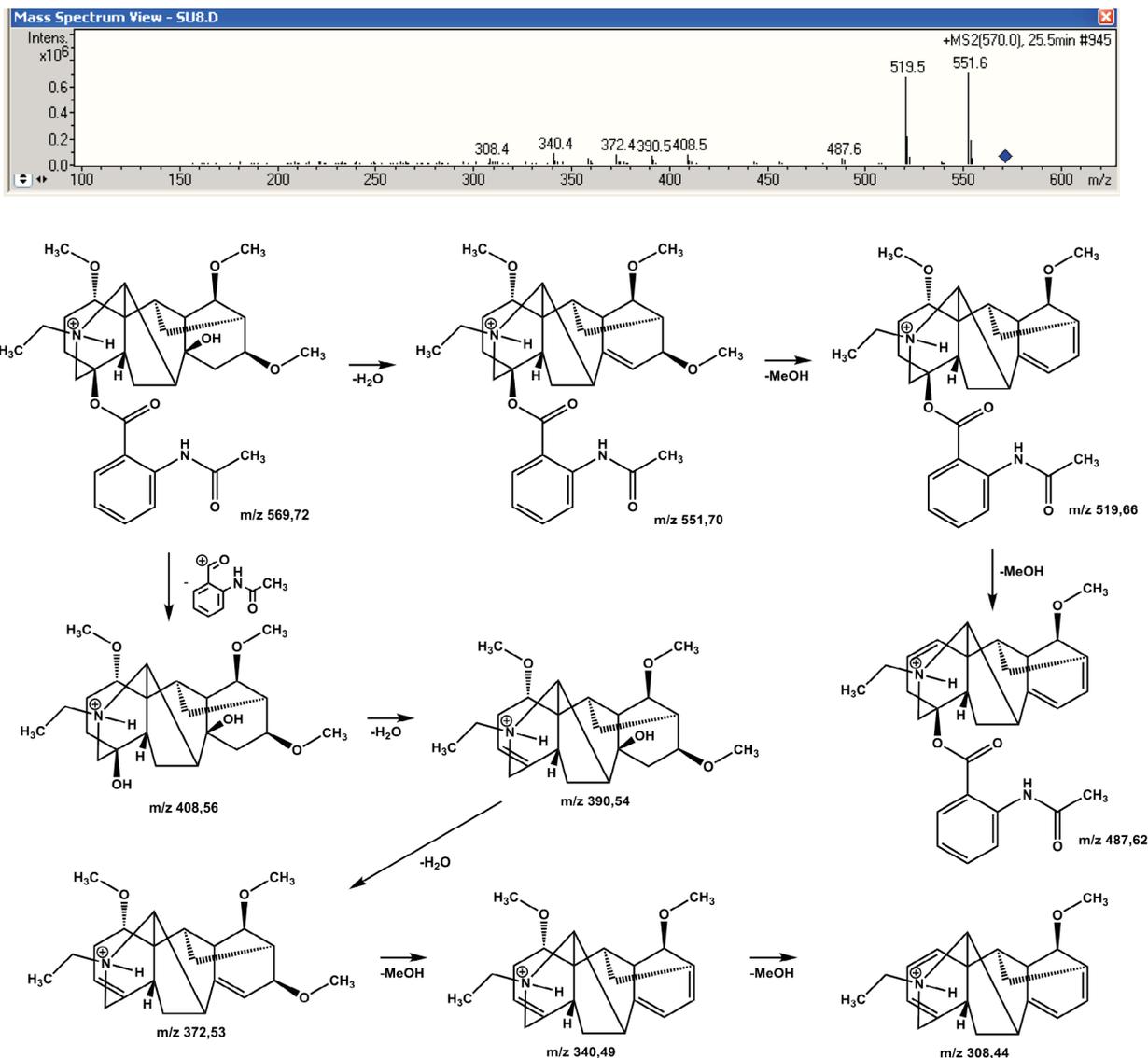


Рис. 8. Масс-спектр и соответствующая ему схема фрагментации 9-деоксилапаконитина
Fig. 8. Mass spectrum and corresponding fragmentation scheme of 9-deoxylapaconitine

тора и масс-детектора в соответствии с разработанной методикой (см. материалы и методы). Эта методика позволяет с высокой точностью идентифицировать все семь основных компонентов субстанций, а также позволяет определить относительное массовое содержание каждого компонента.

В табл. 3 и 4 приведены характеристики компонентов 9 образцов фармацевтических композиций, содержащих алкалоиды—лапаконитин, N-ацетилсепаконитин, 1-дезметиллапаконитин, ранаконитин, N-дезацетиллапаконитин, изолапаконитин, 9-деоксилапаконитин как в несвязанном виде, т. е. в форме оснований (табл. 3), так и в виде солей с бромистоводородной кислотой (гидробромидов) (табл. 4).

Диапазон относительного содержания алкалоидов выражен в массовых процентах, поскольку определение этих величин опосредованно связано с массой молекулярного иона. Следует также отметить, что в данном случае речь идёт не о физической массе компонентов как таковой, а о величине площади пика, возникающего на хроматограмме испытуемого раствора при проведении анализа в соответствии с методикой определения компонентов. При этом площадь пика рассчитывается прибором как произведение условных единиц (A.U.) и времени элюирования компонента из хроматографической колонки:

$$S_{\text{пика}} = I \times t,$$

где $S_{\text{пика}}$ — площадь пика на хроматограмме, условные единицы в секунду, I — величина отклика детектора

Таблица 3

Относительное содержание алкалоидов: лаппаконитина, N-ацетилсепаконитина, 1-дезметиллаппаконитина, ранаконитина, N-дезацетиллаппаконитина, изолаппаконитина, 9-деоксилаппаконитина в форме оснований в девяти образцах фармацевтических композиций

Table 3

The relative content of alkaloids: lappaconitin, N-acetylsepaconitin, 1-desmethyllappaconitin, ranaconitin, N-deacetylappaconitin, isolappaconitin, 9-deoxylappaconitin in the form of bases in nine samples of pharmaceutical compositions

Номер субстанции	Относительное содержание, % масс.							
	Ранако- нитин	N-ацетил- сепаконитин	Изолап- паконитин	1-дезметил- лаппаконитин	N-дезацетил- лаппаконитин	9-деокси- лаппако- нитин	Лаппако- нитин	Примеси
Субстанция 1	5,619	11,651	0,833	0,461	4,439	0,24	75,408	1,349
Субстанция 2	5,831	12,643	0,787	0,332	3,305	0,139	75,873	1,09
Субстанция 3	0,85	0,429	1,02	0,138	1,112	0,174	96,187	0,09
Субстанция 4	2,17	7,490	0,557	0,701	3,407	0,132	85,171	0,372
Субстанция 5	1,309	4,638	0,694	0,424	2,485	0,391	89,625	0,434
Субстанция 6	2,15	17,643	0,301	0,525	3,14	0,299	74,91	1,032
Субстанция 7	2,17	17,23	0,291	0,486	2,679	0,237	76,119	0,788
Субстанция 8	2,452	21,51	0,37	0,773	2,986	0,269	70,585	1,055
Субстанция 9	1,4	0,569	1,131	0,159	1,561	0,38	94,579	0,221

Примечание: в столбце «Примеси» табл. 3 и 4 указано суммарное относительное содержание всех неидентифицированных минорных компонентов.
 Note: The "Impurities" column of Tables 3 and 4 shows the total relative content of all unidentified minor components.

Таблица 4

Относительное содержание бромистоводородных солей алкалоидов: лаппаконитина, N-ацетилсепаконитина, 1-дезметиллаппаконитина, ранаконитина, N-дезацетиллаппаконитина, изолаппаконитина, 9-деоксилаппаконитина в девяти образцах фармацевтических композиций

Table 4

The relative content of hydrobromic salts of alkaloids: lappaconitin, N-acetylsepaconitin, 1-desmethyllappaconitin, ranaconitin, N-deacetylappaconitin, isolappaconitin, 9-deoxylappaconitin in nine samples of pharmaceutical compositions

Номер субстанции	Относительное содержание, % масс.							
	Ранако- нитин	N-ацетил- сепаконитин	Изолап- пако- нитин	1-дезметил- лаппаконитин	N-дезацетил- лаппаконитин	9-деокси- лаппако- нитин	Лаппако- нитин	Примеси
Субстанция 1	5,623	11,643	0,831	0,465	4,436	0,238	75,400	1,364
Субстанция 2	5,828	12,647	0,785	0,329	3,299	0,135	75,868	1,109
Субстанция 3	0,846	0,426	1,023	0,141	1,109	0,168	96,180	0,107
Субстанция 4	2,19	7,492	0,553	0,693	3,403	0,139	85,167	0,363
Субстанция 5	1,311	4,634	0,691	0,419	2,479	0,399	89,619	0,448
Субстанция 6	2,141	17,645	0,306	0,519	3,147	0,293	74,926	1,023
Субстанция 7	2,167	17,226	0,289	0,491	2,673	0,242	76,123	0,789
Субстанция 8	2,453	21,5	0,366	0,777	2,995	0,264	70,596	1,049
Субстанция 9	1,402	0,568	1,129	0,162	1,555	0,384	94,582	0,218

на компонент анализируемой смеси, выраженная в условных единицах, t — время элюирования компонента из хроматографической колонки, в секундах. При этом относительное массовое содержание компонента рассчитывается как отношение площади пика этого компонента к сумме площадей пиков всех остальных компонентов субстанции за исключением пиков, соответствующих самому растворителю:

$$(S_{\text{пика компонента}} / \sum S_{\text{пиков всех компонентов}}) \times 100 \%$$

Следует также отметить, что интенсивность сигнала прибора не всегда линейно зависит от количества, т. е. от массового содержания конкретного компонента в субстанции, а определяется также особенностями его химического строения.

В результате суммирования всех данных по 9 исследованным сустанциям были получены следующие данные (табл. 5). Основным компонентом всех изученных фармацевтических композиций всегда является лапаконитин (70,00–96,50 %). Тремя основными сопутствующими алкалоидами являются N-дезацетиллапаконитин (1,00–4,50 %), ранаконитин (0,83–5,90 %) и N-ацетилсепаконитин с большим разбросом содержания от 0,41 до 21,60 %. В меньшей степени содержится изолапаконитин (0,25–1,20 %). Наконец, в наименьшем количестве (<1 %) среди идентифицированных алкалоидов, фиксируются 1-дезметиллапаконитин (0,12–0,80 %) и 9-деоксилапаконитин (0,15–0,42 %). Кроме того, во всех исследуемых образцах фармацевтических композиций содержатся микропримеси неидентифицированных алкалоидов.

Заключение / Conclusion

Таким образом, в результате проведённой работы методами хромато-масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии было установлено, что образ-

цы фармацевтических композиций, полученных из ЛРС новым способом, разработанным в компании АО «Фармцентр ВИЛАР», содержат 7 основных дитерпеновых алкалоидов: лапаконитин, N-ацетилсепаконитин, 1-дезметиллапаконитин, ранаконитин, N-дезацетиллапаконитин, изолапаконитин, 9-деоксилапаконитин. Определены количественные соотношения этих алкалоидов в 9 различных образцах, отличающихся видом и местом произрастания растений, из которых они были выделены. Показано, что главным компонентом фармацевтических композиций всегда является лапаконитин. Алкалоиды N-дезацетиллапаконитин, ранаконитин и N-ацетилсепаконитин также содержатся в достаточно большом количестве, причём уровень содержания N-ацетилсепаконитина достигает 21,60 %. Изолапаконитин, 1-дезметиллапаконитин и 9-деоксилапаконитин присутствуют в изученных фармацевтических композициях на уровне менее 1,20 %. Кроме того, во всех исследованных образцах фармацевтических композиций дополнительно обнаружены микропримеси неидентифицированных алкалоидов, общее содержание которых не превышает 1,50 %.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Authors' participation. All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Финансирование. Результаты проведённых исследований были использованы при составлении

Таблица 5

Количественное определение содержания идентифицированных алкалоидов в различных образцах фармацевтических композиций, проведённое методом хромато-масс-спектрометрии

Table 5

Quantitative determination of the content of identified alkaloids in various samples of pharmaceutical compositions carried out by chromatography-mass spectrometry

№ п/п	Наименование вещества	Диапазон относительного времени удерживания	Диапазон относительного содержания, %	Масса молекулярного иона
1	Лапаконитина гидробромид	От 0,95 до 1,03	От 70,00 до 96,50	584,71
2	N-ацетилсепаконитин	От 1,220 до 1,350	От 0,41 до 21,60	600,71
3	1-дезметиллапаконитин	От 1,487 до 1,705	От 0,12 до 0,80	571,69
4	Ранаконитин	От 0,795 до 0,862	От 0,83 до 5,90	600,71
5	N-дезацетиллапаконитин	От 1,734 до 1,904	От 1,00 до 4,50	542,67
6	Изолапаконитин	От 1,430 до 1,550	От 0,25 до 1,20	585,72
7	9-деоксилапаконитин	От 2,000 до 2,200	От 0,15 до 0,42	568,71

заявки на получение патента РФ 2630967 «Средство, обладающее антиаритмическим действием» и патента РФ 2624240 «Способ получения средства, обладающего антиаритмическим действием».

Financing. The results of the conducted studies were used in the preparation of an application for the RF patent 2630967 "A remedy with antiarrhythmic effect" and RF patent 2624240 "A method for obtaining a remedy with antiarrhythmic effect".

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Рогов Антон Владимирович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8791-1971>

к. б. н., заместитель генерального директора АО «Фармцент ВИЛАР», Москва, Российская Федерация

Anton V. Rogov

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8791-1971>

PhD, Cand. Sci. (Biology), Deputy General Director, "Pharmcenter VILAR" JSC, Moscow, Russian Federation

Мокров Григорий Владимирович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>

SPIN-код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Grigory V. Mokrov

Corresponding author

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>

SPIN code: 8755-7666

PhD, Cand. Chemical Sci., Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI "Federal Research Center for Original and Prospective Biomedical and Pharmaceutical Technologies", Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. World Health Organization: Cardiovascular diseases (CVDs). Published 2021. Accessed October 12, 2021. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

2. Hendren NS, Drazner MH, Bozkurt B, Cooper LT Jr. Description and Proposed Management of the Acute COVID-19 Cardiovascular Syndrome. *Circulation*. 2020 Jun 9;141(23):1903–1914. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047349.

3. Zhan Y, Yue H, Liang W, Wu Z. Effects of COVID-19 on Arrhythmia. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2022 Sep 2;9(9):292. DOI: 10.3390/jcdd9090292.

4. Patel MH, Sampath S, Kapoor A, et al. Advances in Cardiac Pacing: Arrhythmia Prediction, Prevention and Control Strategies. *Front Physiol*. 2021 Dec 2;12:783241. DOI: 10.3389/fphys.2021.783241.

5. Соколов СФ, Беляева ММ, Бакалов СА, Голицын СП. Лаппаконитина гидробромид и его пролонгированная форма при желудочковой экстрасистолии у больных без органической патологии сердца: эффективность и безопасность. *Кардиология: Новости Мнения Обучение*. 2018;6(2):29–37. DOI:10.24411/2309-1908-2018-12004.

Sokolov SF, Belyaeva MM, Bakalov SA, Golitsyn SP. Lappaconitine hydrobromide and its sustained-release form in case of ventricular premature beats in patients without organic heart diseases: efficiency and safety. *Cardiology: News, Opinions, Training*. 2018;6(2):29–37. (In Russ.). DOI: 10.24411/2309-1908-2018-12004.

6. Соколов СФ. Аллапинин® и современные подходы к лечению нарушений ритма сердца. *РМЖ*. 2012;4:177–181.

Sokolov SF. Allapinin® and modern approaches to the treatment of cardiac arrhythmias. *RMJ*. 2012;4:177–181. (In Russ.).

7. Арчакова О.А., Комаров Т.Н., Рогов А.В., и др. Определение лаппаконитина, дитерпенового алкалоида, получаемого из растений *Aconitum leucostomum*, и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):105–113. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-105-113.

Archakova OA, Komarov TN, Rogov AV, et al. Determination of lappaconitin, diterpene alkaloids obtained from plants *Aconitum leucostomum*, and its active metabolite N-desacetylappaconitin in human plasma and blood. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(3):105–113. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-105-113.

8. Муталова ДК, Отаева ША, Ботиров РА, и др. Количественное содержание N-дезацетиллаппаконитина во вторичных продуктах производства Аллапинина. *Universum химия и биология*. 2022;7(97):35–39. DOI: 10.32743/UniChem.2022.97.7.13882.

Mutalova DK, Otayeva ShA, Botirov RA et al. Quantitative content N-deacetylappaconitine in secondary products of Allapinin production. *Universum Chemistry and Biology*. 2022;7(97):35–39. (In Russ.). DOI: 10.32743/UniChem.2022.97.7.13882.

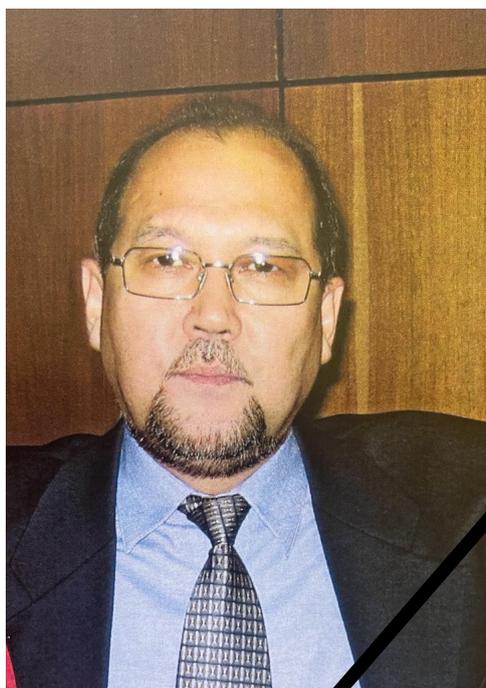
ПАМЯТИ

Абрека Куангалиевича Сариева

18 июля 1955 г. — 13 ноября 2023 г.

In Memory of Abrek K. Sariev

(18.07.1955 — 13.11.2023)



13 ноября 2023 г. ушёл из жизни профессор *Абрек Куангалиевич Сариев*, доктор медицинских наук, академик Академии профилактической медицины Казахстана, специалист в области экспериментальной и клинической фармакокинетики.

Абрек Куангалиевич Сариев родился 18 июля 1955 г. в селе Аккозинское Каратобинского района, Уральской области.

В 1972 году поступил на санитарно-гигиенический факультет Карагандинского государственного медицинского института. После окончания института в 1978 г. был направлен на работу в Каратобинскую районную санитарно-эпидемиологическую станцию санитарным врачом. С 1979 по 1980 гг. работал сначала начальником медицинской службы гражданской обороны, а затем заведующим кабинетом медицинской статистики городской больницы № 2 г. Караганды. С марта 1980 г. *А.К. Сариев* начал работать в Карагандинском государственном медицинском институте в должности старшего врача-лаборанта кафедры фармакологии. В декабре того года был избран по конкурсу ассистентом этой же кафедры

В 1984 году поступил в целевую аспирантуру НИИ фармакологии АМН СССР, в 1987 году защитил диссертацию на соискание учёной степени кандидата медицинских наук.

С октября 1987 г. по декабрь 1989 г. *Абрек Куангалиевич Сариев* работал ассистентом кафедры фармакологии Карагандинского государственного медицинского института. В этом же году зачислен в докторантуру при НИИ фармакологии АМН СССР. В 1993 г. защитил диссертацию на соискание доктора медицинских наук. С 1994 по 2009 гг. работал ведущим научным сотрудником лаборатория фармакокинетики ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН. В 2005 г. ему присвоено звание профессора. С октября 2009 г. по 2017 г. *Абрек Куангалиевич* работал сначала ведущим научным сотрудником, а затем заведующим лабораторией клинической фармакокинетики ФГБУ «Научного центра неврологии».

Последние годы трудовой деятельности *Абрека Куангалиевича* были неразрывно связаны с лабораторией фармакокинетики и метаболомного анализа Института фармации и трансляционной медицины

Федерального государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова МЗ РФ, где он работал внешним консультантом и экспертом по науке.

Будучи хорошим организатором и разносторонне эрудированным человеком, *Абрек Куангалиевич* умел стратегически мыслить и успешно решать поставленные задачи, опираясь на знание человеческой психологии, жизненный опыт и умение конструктивно вести беседу. Беспристрастность, открытость, проницательность, самоконтроль — именно за эти качества *Абрек Куангалиевич* пользовался уважением и авторитетом среди коллег.

Являясь примером высокого профессионализма и большого трудолюбия, с неутомимой энергией, преданный своему делу, *Абрек Куангалиевич* умел поддержать, ободрить коллег, поселить веру в успех и мотивировать сотрудников на движение вперёд.

Как учёный, профессор *А.К. Сариев* всегда стремился к разработке новых направлений научных исследований, необходимых для решения задач в клинической практике.

Основными научными интересами профессора *А.К. Сариева* в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова были фармакокинетическое обоснование применения лекарственных препаратов при беременности; изучение биотрансформации и биодоступности новых лекарственных препаратов и разработка оптимальных лекарственных форм; оценка взаимосвязей между фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками лекарственных средств с целью оптимизации их применения в медицинской практике; изучение процесса глюкуроноконъюгации с позиции генетического полиморфизма.

Работая в Научном центре неврологии профессор *А.К. Сариев* был ответственным исполнителем по научному направлению, связанному с фармакокинетической индивидуализацией лекарственной

терапии неврологических заболеваний. Основные его работы в этот период деятельности были посвящены терапевтическому лекарственному мониторингу противосудорожных, противопаркинсонических препаратов и препаратов из группы антиагрегантов. Также профессор *А.К. Сариев* принимал деятельное участие в работах по созданию нанофармакологических лекарственных форм противосудорожных препаратов, изучению фармакокинетики оригинальных лекарственных препаратов на различных фазах клинических исследований.

Профессор *А.К. Сариев* является автором более 180 научных публикаций, 8 патентов.

Под руководством профессора *А.К. Сариева* подготовлено и защищено 10 кандидатских диссертаций, его ученики успешно работают в России, странах СНГ.

Он являлся членом редколлегии журналов «Фармакокинетика и фармакодинамика» (Москва), «Нейрохирургия и неврология Казахстана» (Алма-Аты).

Профессор *А.К. Сариев* внёс вклад в развитие и укрепление связей фармакологов нашей страны с научным сообществом стран СНГ. Так, с сентября 2017 г. по февраль 2018 г. он работал директором Испытательного центра Республиканского государственного предприятия «Национальный Центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ Республики Казахстан.

Вклад профессора *А.К. Сариева* в науку отмечен золотой медалью имени Н.И. Пирогова.

Абрек Куангалиевич Сариев был большим учёным, яркой личностью. Высокий профессионализм и добросердечное отношение профессора *А.К. Сариева* к товарищам и коллегам, навсегда останутся в памяти научной общественности, в памяти всех его друзей и учеников, а также всех тех, кто его знал и работал вместе с *Абреком Куангалиевичем*.

Светлая память!



22

Года работы

230+

Исследований

220+

Публикаций

40

Партнёров

Комплексная оценка для включения в ограничительные перечни



Оценка эффективности и безопасности

- систематический обзор и метаанализ
- сетевой метаанализ



Фармакоэкономический анализ

- анализ "затраты-эффективность"
- анализ "затраты-полезность"
- анализ "минимизации затрат"
- анализ влияния на бюджет



Разработка моделей в MS Excel

- модель "дерево решений"
- модель Маркова
- гибридная модель
- калькулятор



Подготовка досье на включение в

- перечень ЖНВЛП
- перечень ВЗН
- минимальный ассортимент

Также Центр занимается:

- оценкой технологий здравоохранения
- фармакоэпидемиологическими исследованиями
- изучением качества жизни, связанного со здоровьем
- неинтервенционными исследованиями

По вопросам сотрудничества обращаться к:



Белоусов Дмитрий Юрьевич
Генеральный директор
+ 7 (926) 568-17-35
clinvest@mail.ru



Чеберда Алексей Евгеньевич
Исполнительный директор
+ 7 (963) 999-77-69
aecherberda@healthconomics.ru



Афанасьева Елена Владимировна
Финансовый директор
+ 7 (916) 986-04-65
eva88@list.ru

Подагрель

ФЕБУКСОСТАТ

РАСТВОРЯЯ
КРИСТАЛЛЫ,
ОБЛЕГЧАЕТ
ЖИЗНЬ

Первый и единственный препарат фебуксостата в форме капсул⁶, делающий современную терапию подагры доступной



Более благоприятный профиль эффективности в снижении уровня мочевой кислоты¹⁻³

по сравнению с аллопуринолом

Простой и удобный режим терапии – всего 1 капсула в сутки⁴

по сравнению с аллопуринолом

Самая доступная цена⁵

по сравнению с другими препаратами фебуксостата

Системная защита организма^{1-4,7,8}

от повреждающего действия мочевой кислоты

Подагрель, 80 мг и 120 мг, капсулы | Действующее вещество: фебуксостат

Показания к применению: у взрослых для

лечения хронической гиперурикемии при состояниях, сопровождающихся отложением кристаллов уратов (при наличии тофусов и/или подагрического артрита, в т. ч., в анамнезе); профилактики и лечения хронической гиперурикемии у взрослых пациентов при проведении цитостатической терапии гемобластозов с риском развития синдрома распада опухоли от умеренного до высокого (только для дозировки 120 мг).

Режим дозирования и способ применения: Рекомендованная начальная доза составляет 80 мг фебуксостата один раз в сутки независимо от приема пищи. В случае если концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови превышает 6 мг/дл (357 мкмоль/л) через 2-4 недели, доза препарата может быть увеличена до 120 мг/раз в сутки. Целью лечения является снижение и поддержание концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови менее 6 мг/дл (357 мкмоль/л). **Профилактика развития острых приступов подагры рекомендуется в течение не менее 6 месяцев.**

Противопоказания:

• гиперчувствительность к фебуксостату и/или любому из вспомогательных веществ, перечисленных в разделе 6.1;

• детский возраст до 18 лет (в связи с отсутствием данных об эффективности и безопасности применения у данной группы пациентов);

• беременность и период грудного вскармливания (см. раздел 4.6);

• наследственная непереносимость (ОХЛП ЛП-N=(000351)-(PG-RU) от 10.02.2023.) галактозы, дефицит лактазы и синдром мальабсорбции глюкозы и галактозы (см. раздел 4.4).

С осторожностью: почечная недостаточность тяжелой степени тяжести (клиренс креатинина <30 мл/мин) (эффективность и безопасность изучены недостаточно); печеночная недостаточность; серьезные аллергические реакции (реакции гиперчувствительности) в анамнезе; ишемическая болезнь сердца; застойная сердечная недостаточность; заболевания щитовидной железы; одновременное применение с меркаптопурином/азатиоприном (возможно повышение концентрации данных веществ в плазме крови и усиление их токсичности); состояния после трансплантации органов (опыт применения фебуксостата ограничен (ОХЛП ЛП-N=(000351)-(PG-RU) от 10.02.2023.)); синдром Леша-Нихана (опыт применения фебуксостата ограничен). Острый приступ подагры (обострение подагры): Применение препарата Подагрель следует начинать только после купирования острого приступа подагры. Начало применения препарата Подагрель может спровоцировать развитие острого приступа подагры за счет высвобождения уратов из тканевых депо и последующего повышения концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови. **Для профилактики приступов подагры (ОХЛП ЛП-N=(000351)-(PG-RU) от 10.02.2023.)** рекомендуется одновременное применение НПВП или колхицина в течение не менее 6 месяцев.

1. Becker M.A., Schumacher H.R., MacDonald P.A., et al. Clinical efficacy and safety of successful longterm urate lowering with febuxostat or allopurinol in subjects with gout. J Rheumatol. 2009;36(6):1273-1282.

2. Schumacher H.R., Becker M.A., Wortmann R.L., et al. Effects of febuxostat versus allopurinol and placebo in reducing serum urate in subjects with hyperuricemia and gout: a 28-week, phase III, randomized, double-blind, parallel-group trial. Arthritis Rheum. 2008;59(11):1540-1548.

3. Becker M.A., Schumacher H.R., Wortmann R.L., et al. Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout. N Engl J Med. 2005;353(23):2450-2461.

4. Общая характеристика лекарственного препарата ЛП-N=(000351)-(PG-RU) от 10.02.2023

5. Среднерозничные цены упаковок: Подагрель 80мг №30 – 813 руб., 120мг №30 – 1 107 руб.; Аденирикс 80мг №28 – 3 077 руб., 120мг №28 – 3 699 руб.; Азурикс 80мг №30 – 1 921 руб., 120мг №30 – 2 563 руб.; Фебуксостат Фармпротект 80мг №28 – 1 612 руб., 120мг №28 – 1 522 руб.; Фебуксостат СЗ 80мг №30 – 907 руб., Фебуфорт 80 мг №30 – 1 835 руб., Подагрум -80мг №28 – 826 руб., данные IGVIA за 05-2023

6. Государственный реестр лекарственных средств. Онлайн-ресурс <https://grls.rosminzdrav.ru>. Дата последнего доступа 29.06.2023

7. Zeng X.X., Tang Y., Hu K., et al. Efficacy of febuxostat in hyperuricemic patients with mild-to-moderate chronic kidney disease: a meta-analysis of randomized clinical trials. 2018 Mar;97(13): e0161. doi: 10.1097/MD.00000000000010161.

8. Juge P.A., Truchetet M.E., Pillebout E., et al. Efficacy and safety of febuxostat in 73 gouty patients with stage 4/5 chronic kidney disease: a retrospective study of 10 centers. Joint Bone Spine. 2017;84(5): 595-8.

Полная информация о лекарственном препарате «Подагрель» содержится в ОХЛП и ЛВ

Держатель регистрационного удостоверения:

Россия, Акционерное общество «Химико-фармацевтический комбинат «АКРИХИН» (АО «АКРИХИН») 142450, Московская обл., Богородский г.о., г. Старая Купавна, ул. Кирова, д. 29. Телефон/факс: +7 (495) 702-95-03. info@akrikhin.ru. РИМ-2023-0617

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ РАБОТНИКОВ