

2018 | Том / Volume VI

№6

Научно-практический журнал
Scientific and Practical Journal

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACY & PHARMACOLOGY



Обзоры, лекции
Reviews, Lectures

Фармакогнозия, ботаника
Pharmacognosy, Botany

**Фармацевтическая технология
и биотехнология**
Pharmaceutical Technology
and Biotechnology

**Фармацевтическая
и токсикологическая химия**
Pharmaceutical and Toxicological
Chemistry

**Фармакология и клиническая
фармакология**
Pharmacology and Clinical
Pharmacology

**Информационные технологии
в фармации**
Information Technologies in Pharmacy

**Организация и экономика
фармацевтического дела**
Organization and Economy
of Pharmacy

**Экономика и менеджмент
медицины**
Economy and Management
of Medicine

Фармацевтическое образование
Pharmaceutical Education

Краткие сообщения
Brief Reports

**Дискуссии, рецензии, юбилеи,
научные школы, история
фармации и фармакологии**
Discussions, Referee Reports,
Anniversaries, Schools
of Thought, History
of Pharmacy and
Pharmacology

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Научно-практический журнал
Периодичность 6 номеров в год
Том 6, Выпуск №6, 2018

Свидетельство регистрации СМИ: ПИ №ФС77–67428 от 13.10.2016 г.

Главный редактор

Петров Владимир Иванович академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Заместитель главного редактора

Озеров Александр Александрович доктор химических наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Редакционная коллегия

Фармакогнозия, ботаника

Куркин Владимир Александрович доктор фармацевтических наук, профессор, г. Самара, Россия.

Зилфикаров Ифрат Назимович профессор РАН, доктор фармацевтических наук, г. Москва, Россия

Фармацевтическая технология и биотехнология

Саканян Елена Ивановна доктор фармацевтических наук, профессор, г. Москва, Россия

Фармацевтическая и токсикологическая химия / Информационные технологии в фармации

Вавер Ивона PhD, профессор, г. Варшава, Польша

Фармакология и клиническая фармакология

Ханферьян Роман Авакович доктор медицинских наук, профессор, г. Москва, Россия.

Буске Паскаль MD, профессор, г. Страсбург, Франция

Кампизи Коррадино профессор, MD, PhD, г. Генуя, Италия

Организация и экономика фармацевтического дела / Экономика и менеджмент медицины

Наркевич Игорь Анатольевич доктор фармацевтических наук, профессор, г. Санкт-Петербург, Россия

Сомасундарам Субраманиан MD, Россия/Индия

Статьи, представленные в разделы **Обзоры, лекции / Фармацевтическое образование / Краткие сообщения / Дискуссии, рецензии, юбилеи, научные школы, история фармации и фармакологии** могут быть рассмотрены любыми членами редакционной коллегии.

Ответственный секретарь: Корянова Ксения Николаевна, кандидат фармацевтических наук, г. Пятигорск, Россия

Корректор: Нигарян Сируш Артуровна, г. Пятигорск, Россия

Переводчик: Давыденко Любовь Григорьевна, кандидат филологических наук, доцент, г. Пятигорск, Россия

Технический редактор: Доценко Марина Александровна, г. Пятигорск, Россия

Адрес редакции: 357532, г. Пятигорск, пр-т Калинина, 11.

*Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России*

Телефон: +7 (8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Объединенный каталог. Пресса России. Газеты и журналы. Индекс 94183

Формат А4, тираж 1000 экз.

Журнал «Фармация и фармакология» включен в перечень рецензируемых научных изданий, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (Перечень ВАК), РИНЦ, eLibrary, ВИНТИ, РГБ, Киберленинка, Соционет, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

*Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами в ООО «Амирит»,
410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 88.*

© ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный
медицинский университет» Минздрава России, 2018

© Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, 2018

© Авторы, 2018

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

PHARMACY & PHARMACOLOGY

Scientific and practical journal

Periodicity is 6 issues a year

Volume VI, Issue N 6, 2018

The mass media registration certificate: ПИ №ФС77–67428 от 13.10.2016

Editor-in-Chief

Vladimir I. Petrov Academician RAS, PhD (Medicine), Professor, Volgograd, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Aleksandr A. Ozerov PhD (Chemistry), Professor, Volgograd, Russia

Editorial Board

Pharmacognosy, Botany

Vladimir A. Kurkin PhD (Pharmacy), Professor, Samara, Russia

Ifrat N. Zilfikarov PhD (Pharmacy), Professor of the RAS, Moscow, Russia

Pharmaceutical Technology and Biotechnology

Elena I. Sakanyan PhD (Pharmacy), Professor, Moscow, Russia

Pharmaceutical and Toxicological Chemistry / Information Technologies in Pharmacy

Iwona Wawer PhD, Professor, Warsaw (Poland)

Pharmacology and Clinical Pharmacology

Roman A. Khanfer`yan PhD (Medicine), Professor, Moscow, Russia

Pascal Bousquet MD, PhD Professor, Strasbourg, France

Campisi Corradino Professor, MD, PhD, Genoa, Italy

Organization and Economy of Pharmacy / Economy and Management of Medicine

Igor A. Narkevich PhD (Pharmacy), Professor, Saint-Petersburg, Russia

Somasundaram Subramanian MD, Russia/India

Manuscripts presented in sections **Reviews, Lectures / Pharmaceutical Education / Brief Reports / Discussions, Referee Reports, Anniversaries, School of Thought, History of Pharmacy and Pharmacology** can be considered by any members of the editorial board.

Executive Editor: Koryanova Ksenia Nikolaevna, PhD (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia

Proofreader: Nigaryan Sirush Arturovna, Pyatigorsk, Russia

Translator: Davydenko Lubov Grigoryevna, PhD (Philology), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Technical editor: Dotsenko Marina Aleksandrovna, Pyatigorsk, Russia

Editors office address: 357532, Pyatigorsk, Kalinina, 11.

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University

Phone number: +7(8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Union catalogue. Russian Press/ Newspapers and journals. Code 94183

A4 size, 1000 issues circulation.

Journal "Pharmacy & Pharmacology" is recommended International Committee Of Medical Journal Editors and included in Higher Attestation Commission, Russian citation database, eLibrary, ARISTI (All-Russian Institute of Scientific and Technical Information), RSL (Russian State Library), CyberLeninka, Socionet, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Printed in the LLC "Amirit" in accord with provided materials, 410004, Saratov, 88, Chernishevsky Str.

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

© Volgograd State Medical University, 2018
© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2018
©Authors, 2018

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS

Фармакогнозия, ботаника / Pharmacognosy, Botany

Никитина А.С., Логвиненко Л.А.,
Никитина Н.В., Нигарян С.А.

Nikitina A.S., Logvinenko L.A.,
Nikitina N.V., Nigaryan S.A.

МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ МЕЛИССЫ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ
НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА504

MORPHOMETRIC AND HISTOCHEMICAL
RESEARCH OF MELISSA OFFICINALIS L.
HERB FROM THE COLLECTION
OF NIKITSKY BOTANIC GARDEN.....504

Фармацевтическая и токсикологическая химия / Pharmaceutical and Toxicological Chemistry

Алексеева К.А., Писарев Д.И.,
Малютин А.Ю., Бойко Н.Н.

Alexeeva K.A., Pisarev D.I.,
Malyutina A. Yu., Boyko N.N.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ
В СУБСТАНЦИИ ГЛУТАТИОНА
ВОССТАНОВЛЕННОГО535

DEVELOPMENT OF METHODS
FOR DETERMINATION OF SPECIFIC
IMPURITIES IN THE GLUTATIONION
RESTORED SUBSTANCE535

Фармакология и клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology

Воронков А.В., Шабанова Н.Б.,
Воронкова М.П., Лысенко Т.А.

Voronkov A.V., Shabanova N.B.,
Voronkova M.P., Lysenko T.

ИЗУЧЕНИЕ ДОЗОЗАВИСИМОГО
ЦЕРЕБРОТРОПНОГО ЭФФЕКТА
ПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИНА ПОД ШИФРОМ
PIR-9 НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС.....548

STUDY OF CEREBROTROPIC DOSE-
DEPENDENT EFFECT OF PYRIMIDINE
DERIVATIVE UNDER PIR-9 CODE AGAINST
THE BACKGROUND OF EXPERIMENTAL
CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS.....548

Матвеев А.В., Крашенинников А.Е.,
Егорова Е.А., Коняева Е.И.

Matveev A.V., Krashennnikov A.E.,
Egorova E.A., Konyaeva E.I.

АНАЛИЗ ИЗВЕЩЕНИЙ О НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ
РЕАКЦИЯХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ,
ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ,
ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ
КРЫМ ЗА ПЕРИОД 2011–2016 ГГ.....568

ANALYSIS OF ADVERSE DRUG REACTION
REPORT FORMS ON THE MEDICINES, USED
FOR AIDS TREATMENT (REGISTERED
IN THE REPUBLIC OF CRIMEA
IN THE PERIOD FROM 2011 TO 2016)568

История фармации и фармакологии / History of Pharmacy and Pharmacology

Крашенинников А.Е.

Krashennnikov A.E.

АГРЕГАТНЫЙ ПОДХОД К ПЕРИОДИЗАЦИИ
СТАНОВЛЕНИЯ СИСТЕМЫ
ФАРМАКОНАДЗОРА.....584

THE AGGREGATE APPROACH
TO THE PERIODIZATION OF THE FORMATION
OF THE PHARMACOVIGILANCE SYSTEM584

МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ МЕЛИССЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА

Никитина А.С.¹, Логвиненко Л.А.², Никитина Н.В.¹, Нигарян С.А.¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
357532, Россия, Пятигорск, пр. Калинина, 11

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»,
298648, Россия, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита
E-mail: lina_nikitina@mail.ru

В статье представлены результаты морфолого-анатомического, морфометрического и гистохимического исследования надземной части мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis* L.), селекционного сорта-образца из коллекции Никитского ботанического сада – Национального научного центра (НБС-ННЦ) РАН, Республика Крым. Получены данные по морфологии, гистохимии и морфометрии основных диагностических микроскопических признаков травы *Melissa officinalis* L., которые имеют определяющее значение для установления подлинности лекарственного растительного сырья, а также показывают локализацию секреции метаболитов и гетерогенную природу эфирного масла мелиссы. **Цель.** Определение микродиагностических признаков и их биометрических характеристик травы мелиссы лекарственной сорта-образца, интродуцированного в Никитском ботаническом саду, изучение возможности применения гистохимических реакций для анализа тканей и секреторных структур исследуемого вида. **Материалы и методы.** Растительный материал предоставлен лабораторией лекарственных растений НБС-ННЦ. Изучение микроскопических признаков, морфометрических характеристик, а также гистохимические тесты проводили согласно методикам Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания с помощью светового микроскопа Микромед-1, люминесцентного микроскопа Микромед 3 ЛЮМ и цифровой камеры Digital Eyepiece microscope camera MD 3.2. Фотографии редактировали в программе Paint.NET.3.5.11. **Результаты.** Основными диагностическими микроскопическими признаками травы сорта-образца *Melissa officinalis* L. можно назвать: эпидермальные конусовидные одноклеточные волоски, простые многоклеточные волоски, головчатые волоски с многоклеточной ножкой и воронковидной головкой и с одноклеточной ножкой и шаровидной головкой, эфиромасличные железки радиального типа с 6–8 выделительными клетками. Данные признаки диагностируются и в измельченном сырье. Проведена количественная оценка морфологических и анатомических признаков листа (толщина листовой пластинки, высота клеток верхнего и нижнего эпидермиса, плотность устьиц на 1 мм² эпидермы), стебля, чашечки и венчика, проанализированы размеры клеток, устьиц, трихом, а также частота расположения трихом. Гистохимическими методами с помощью световой и флуоресцентной микроскопии изучено присутствие и локализация в тканях и трихомах сырья липидов, полисахаридов, фенольных соединений, флавоноидов, эфирного масла, терпеноидов, алкалоидов. **Заключение.** В ходе морфолого-анатомического исследования травы сорта-образца мелиссы лекарственной из коллекции Никитского ботанического сада выявлены диагностически значимые микроскопические признаки сырья, установлены их биометрические характеристики. Впервые гистохимическими методами в тканях и секреторных структурах травы изучена локализация характерных секретируемых биологически активных веществ. Результаты экспериментальных исследований дополняют данные научной литературы и могут быть использованы для подтверждения подлинности, идентификации и стандартизации надземной части данного сорта-образца.

Ключевые слова: мелисса лекарственная, *Melissa officinalis* L., микродиагностика растений, интродукция, морфометрия, гистохимия

Для цитирования:

Никитина А.С., Логвиненко Л.А.,
Никитина Н.В., Нигарян С.А.
МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ МЕЛИССЫ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ
НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА
Фармация и фармакология. 2018;6(6): 504-534
DOI:10.19163/2307-9266-2018-6-6-504-534
© Никитина А.С., Логвиненко Л.А.,
Никитина Н.В., Нигарян С.А., 2018

For citation:

Nikitina A.S., Logvinenko L.A.,
Nikitina N.V., Nigaryan S.A.
MORPHOMETRIC AND HISTOCHEMICAL
RESEARCH OF MELISSA OFFICINALIS L. HERB
FROM THE COLLECTION OF NIKITSKY
BOTANIC GARDEN
Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(6): 504-534. Russian.
DOI:10.19163/2307-9266-2018-6-6-504-534

MORPHOMETRIC AND HISTOCHEMICAL RESEARCH OF MELISSA OFFICINALIS L. HERB FROM THE COLLECTION OF NIKITSKY BOTANIC GARDEN

Nikitina A.S.¹, Logvinenko L.A.², Nikitina N.V.¹, Nigaryan S.A.¹

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

²Nikitsky Botanic Garden, Nikita, Yalta, Republic of Crimea, 298648, Russia
E-mail: lina_nikitina@mail.ru

The article presents the results of morphological-anatomical, morphometric and histochemical studies of the aerial part of *Melissa officinalis* L., a selection variety sample from the collection of Nikitsky Botanical Garden – National Science Center (NBG-NSC) of the Russian Academy of Sciences, Republic of Crimea. The data on the morphology, histochemistry and morphometry of the main diagnostic microscopic signs of the *Melissa officinalis* L. herb, which are crucial for establishing the authenticity of medicinal plant materials, and also show the localization of secretion of metabolites and the heterogeneous nature of *Melissa* essential oil, have been obtained. **The aim.** Is to determine the microdiagnostic signs and biometric characteristics of the *Melissa officinalis* L. variety sample, introduced in Nikitsky Botanical Garden, to study the possibility of using histochemical reactions for the analysis of tissues and secretory structures of the studied species. **Materials and methods.** The plant material was provided by Nikitsky Botanical Garden. The study of microscopic signs, morphometric characteristics as well as histochemical tests, were performed according to the methods of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII edition, using a Micromed-1 light microscope, a Micromed Micrometer 3 LUM fluorescent microscope and a Digital Eyepiece microscope camera MD 3.2 digital camera. The photos were edited in the program Paint. NET.3.5.11. **Results.** The main diagnostic microscopic signs of the herb of the *Melissa officinalis* L. selection variety sample can be called as follows: simple unicellular conical, nonbranching hairs, simple multicellular conical hairs, capitate hairs with a multicellular leg and a funnel-shaped head and with a unicellular leg and a spherical head, essential oil glands of a radial-type with 6-8 excretory cells. These signs have been diagnosed in the crushed raw materials. A quantitative assessment of the morphological and anatomical signs of the leaf (leaf thickness, height of the cells of the upper and lower epidermis, stoma density per 1 mm² of the epidermis), stem, calyx and corolla was carried out. The size of cells, stoma, trichomes, as well as the frequency of the location of trichomes have been analyzed, too. The presence and localization of lipids, polysaccharides, phenolic compounds, flavonoids, essential oil, terpenoids, alkaloids in tissues and trichomes of the herb have been studied by histochemical methods using light and fluorescent microscopy. **Conclusion.** Morphological and anatomical study of the herb of the *Melissa officinalis* L. selection variety sample from the Nikitsky Botanical Garden collection has been carried out, diagnostically significant microscopic signs of raw materials have been revealed and their biometric characteristics have been established. For the first time the localization of characteristic secreted biologically active substances in the tissues and secretory structures of the herb has been studied by histochemical methods. The results of the experimental studies complement the scientific literature data and can be used to confirm the authenticity, identification and standardization of the aerial parts of this variety sample.

Keywords: *Melissa officinalis* L., microscopy, introduction, morphometry, histochemistry

ВВЕДЕНИЕ. Эколого-географические условия интродукции лекарственных растений оказывают определяющее влияние на химический состав биологически активных веществ растений, а также на биологические особенности развития. Методом микроскопического анализа изучается анатомическое строение растения, устанавливаются характерные анатомо-диагностические и морфометрические характеристики. Химические и физико-химические методы исследования позволяют идентифицировать действующие и сопутствующие вещества в растениях. К таким методам относится гистохимический анализ, позволяющий выявлять закономерности процесса секреции биологически активных веществ и устанавливать их присутствие и локализацию в тканях и органах растения. В свою очередь подобные

исследования иллюстрируют отличительные особенности метаболизма железистых трихом и тканей различных хемотипов одного вида растения. В Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре (НБС-ННЦ) РАН, Республика Крым, г. Ялта в лаборатории ароматических и лекарственных растений традиционно проводятся многолетние биологические и интродукционные исследования особенностей развития различных сортов лекарственных растений. Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.) является одним из видов семейства яснотковые, интродуцированных на опытном участке эфиромасличных растений ботанического сада [1, 2].

Мелисса лекарственная – *Melissa officinalis* L. (синонимы: *Faucibarba officinalis* (L.) Dulac., *Mutelia officinalis* (L.) Gren. ex Mutel, *Thymus melissa* E.H.L.

Krause, Citronell, Common balm) – один из 5 видов рода мелисса (*Melissa*) семейства яснотковых – *Lamiaceae*. Растение известно под другими названиями: мелисса лимонная, лимонная мята, лимонная трава, медовка, пчельник. Мелисса лекарственная распространена в странах Европы, Африки, Северной Америки, в Иране, на Украине, Кавказе и в Средней Азии. Трава мелиссы лекарственной культивируется как лекарственное и эфиромасличное растение в Великобритании, Сербии, Алжире, странах Средиземноморья, на Кавказе, в Краснодарском крае, Самарской области, в Крыму [3–5].

Трава мелиссы лекарственной характеризуется высоким содержанием фенилпропаноидов (розмариновая, кофейная, хлорогеновая, пара-кумаровая, феруловая и синаповая кислоты), флавоноидов (лютеолин, цинарозид, апигенин, космосиин), фенолкарбоновых кислот (сиреневая, гентизиновая, салициловая, ванилиновая, пара-гидроксibenзойная, протокатеховая), конденсированных дубильных веществ [6, 7]. По данным зарубежных исследователей в траве мелиссы лекарственной идентифицированы олеаноловая и урсоловая кислоты [8]. В эфирном масле преобладают монотерпены (цитраль) [9].

Надземную часть мелиссы лекарственной применяют в этномедицине стран Европы. Во Франции, Италии, Австрии, Германии и Болгарии мелиссу используют при трофических язвах в качестве ранозаживляющего средства, кожных сыпях, фурункулах кожи, для полоскания при воспалении десен; наружно для массажа и растираний, для припарок и компрессов, изготовления косметических средств [4, 10, 11]. Надземная часть и листья мелиссы являются официальным сырьем в странах Европы. Растение включено в Европейскую Фармакопею, Британскую Травяную Фармакопею, в Иранскую Травяную Фармакопею. В России данный вид сырья стал официальным с 1996 года, разработан проект ФС «Мелиссы лекарственной трава» (взамен ФС 42-3645-98) (материалы по проектам общих фармако-

пейных статей и фармакопейных статей <https://www.rosminzdrav.ru/61/11/materially-po-farmakopee>) [12]. Фармакологические исследования показывают, что препараты мелиссы проявляют легкое снотворное действие, оказывают успокоительное, спазмолитическое воздействие [13–16]. Характерно повышение аппетита и стимуляции секреции желудочного сока, усиление моторики желудка, проявление желчегонного и ветрогонного действия препаратов на основе травы мелиссы [4, 17]. Трава мелиссы обладает гипогликемическими, вяжущими свойствами, стимулирует менструации [18]. Альдегиды растения (цитраль, цитронелаль) оказывают противомикробную активность в отношении ряда патогенных грибов и микобактерий туберкулеза (К. Okazaki и S. Oshima, 1953 г.). Розмариновая кислота обуславливает противовирусную активность в отношении вирусов герпеса, гриппа, противоаллергическое и антиоксидантное действие, антикомплемментарные и антирадикальные свойства мелиссы [19].

ЦЕЛЬ – определить микродиагностические признаки и их биометрические характеристики для травы мелиссы лекарственной сортообразца из коллекции Никитского ботанического сада ННЦ РАН, изучить возможность применения гистохимических реакций для анализа тканей и секреторных структур исследуемого вида при установлении подлинности сырья и идентификации биологически активных веществ, ввиду отсутствия литературных данных общего гистохимического исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Сырье. Растительным объектом исследования явилась надземная часть мелиссы лекарственной, интродуцированной на опытном участке НБС-ННЦ. Исследования биологических особенностей вегетации данного сортообразца в эколого-географических условиях Южного берега Крыма на протяжении нескольких лет проводятся старшим научным сотрудником Никитского Ботанического сада Логвиненко Л.А. (рис. 1).



Рисунок 1 – Внешний вид *Melissa officinalis* L. сортообразец из коллекции НБС-ННЦ, Республика Крым, г. Ялта

Анализируемое сырье заготовлено в период цветения в июле 2016 г., представляет собой смесь стеблей (до 35 см), листьев и цветков. Сушку сырья проводили при 25–30°C, избегая воздействия прямых

солнечных лучей, в течение 7 дней. Влажность травы мелиссы лекарственной после высушивания составила 8,79±0,36%.

Микроскопические исследования. Анализ микро-

скопических признаков сырья, морфометрические и гистохимические исследования проводили согласно методикам Государственной фармакопеи РФ XIII издания (ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы» [20, 21]) с помощью микроскопа «Микромед-1» и люминесцентного микроскопа «Микромед 3 ЛЮМ» с окуляром 10×, объективами 4×, 10×, 40× и цифровой камеры Digital Eyepiece microscope camera MD 3.2 (3.2 megapixels). **Гистохимические исследования.** Гистохимические реакции на наличие и локализацию биологически активных компонентов в тканях, пельтатных и головчатых трихомах проводили с помощью растворов реактивов: судан III (жирные, эфирные масла, кутин, суберин); метиленовый синий (эфирное масло); 10% раствор тимола и к. H_2SO_4 (сахара, крахмал, инулин), концентрированная хлористоводородная или серная кислота (сесквитерпеновые лактоны); железа (III) хлорид и калия дихромат (фенольные соединения); магния ацетат и свинца ацетат основной (флавоноиды, флуоресценция в УФ-свете), алюминия хлорид (флавоноиды, голубая флуоресценция в УФ-свете); ванилин и концентрированная хлористоводородная кислота (флавоноиды), реактив Вагнера (алкалоиды), флороглюцин с концентрированной хлористоводородной кислотой (лигнин), 2,4-динитрофенилгидразин (терпеноиды) [22–31]. Фотографии редактировали в программе Paint.NET.3.5.11, совмещая фотографии объект-микрометра (цена деления микролинейки 0,01 мм или

10 мкм) и полученные фотографии объекта исследований при каждом рабочем увеличении объектива микроскопа и разрешении используемой цифровой фотокамеры. **Статистическая обработка.** Выборка составляла 10 измерений, статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft, США). Обнаруженные внешние и микроскопические признаки исследуемого сырья сопоставляли с литературными данными [11, 12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Исследование морфологических особенностей надземной части мелиссы лекарственной показало, что листья растения данного сортаобразца с верхней стороны зеленого цвета, с нижней стороны светло-зеленого цвета, короткочерешковые, яйцевидные, супротивные, с городчатым краем, перистым жилкованием, заостренной верхушкой. Листовая пластинка опушена с верхней стороны по жилкам, нижняя сторона опушена полностью; длиной до 3,2 см, шириной до 2,5 см. Стебли серо-зеленого цвета четырехгранные, с продольными желобками, в верхней и средней части опушение слабо выражено, в нижней части стебли голые. На изломе стебель бело-зеленого цвета, с полостью внутри в нижней части. Цветки мелкие (чашечка 5–7 мм, венчик 7–9 мм длиной), собраны в пазухах верхних листьев ложными мутовками и образуют в верхней части стебля соцветие типа тирс длиной 5–10 см. Венчик двугубый, опушенный, белого или бело-розового цвета. Чашечка воронковидная с пятью заостренными зубцами, опушенная (рис. 2). Сырье обладает лимонным запахом, усиливающимся при растирании. Вкус водного извлечения горьковатый.



Рисунок 2 – Внешний вид травы (стебли, листья, цветки) *Melissa officinalis* L. сортаобразец из коллекции НБС-ННЦ

1 – целое сырье; 2, 3, 4 – резаное сырье, 5 – порошок травы мелиссы лекарственной

Микроскопические исследования проводили на временных микропрепаратах, приготовленных из высушенного сырья по общепринятым методикам [20]. При микроскопировании временных микропрепаратов исследуемого объекта отмечали, что ткани растения, содержащие эфирное масло (железки и трихомы), пигментированы. Адаксиальная сторона листовой пластинки покрыта слоем кутикулы. Эпидермис адаксиальной и абаксиальной сторон листа

состоит из одного слоя клеток. При рассмотрении микропрепарата края листа мелиссы лекарственной с поверхности отмечено большое количество простых одноклеточных конусовидных неветвящихся волосков (II тип) длиной 20–50 мкм (рис. 3), при основании которых характерно формирование складок кутикулы. Такой тип простых кроющих трихом характерен как для адаксиальной, так и для абаксиальной сторон листа.

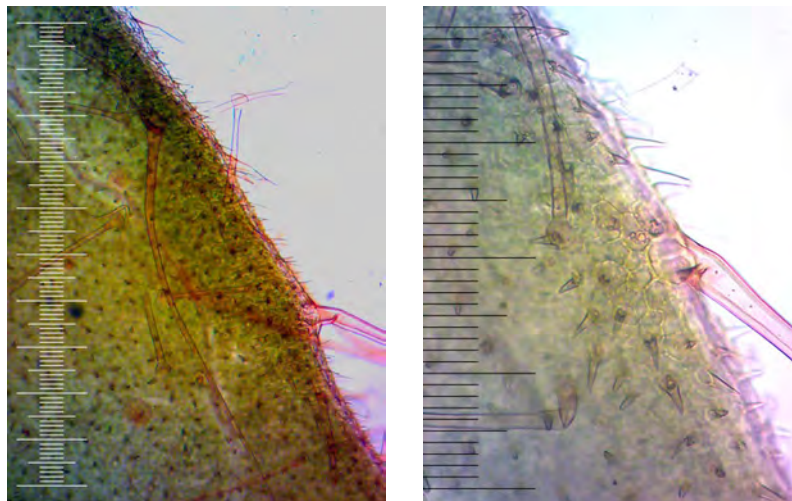


Рисунок 3 – Микропрепарат края листовой пластинки *Melissa officinalis* L. (ув. 4×, 10×)

Клетки верхнего эпидермиса листа различной формы с извилистыми стенками без утолщений, клетки нижнего эпидермиса имеют более извилистые стенки. На нижней стороне листа присутствуют устьица, устьичный аппарат диацитного типа. Для нижнего эпидермиса характерны многоклеточные конусовидные волоски, состоящих из 2–4 клеток с утолщенными стенками (I тип) и головчатые волоски двух типов: с одноклеточной удлиненной

ножкой и воронковидной головкой (тип I) и с короткой одноклеточной ножкой и шаровидной головкой (тип II). Эфиромасличные железы радиального типа не погружены в мезофилл, состоят из короткой одноклеточной ножки и шаровидной головки с восьмью выделительными клетками. В местах прикрепления эфиромасличных железок эпидермальные клетки образуют розетку, как правило, из 5–6 клеток эпидермиса (рис. 4, 5).

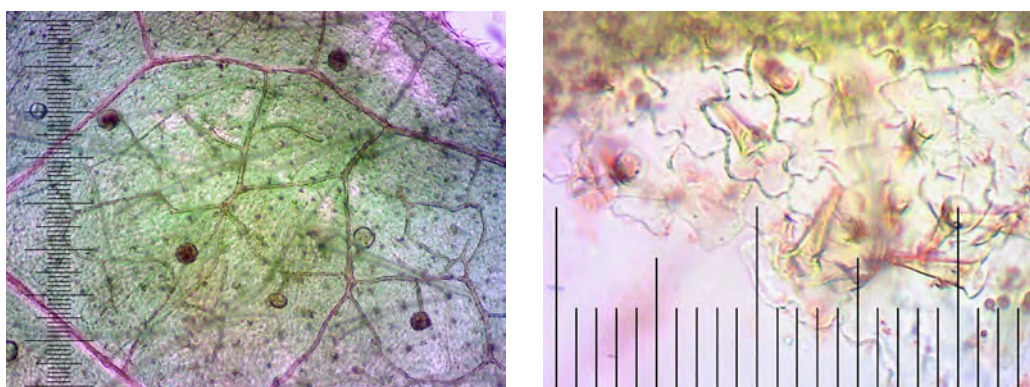


Рисунок 4 – Микропрепарат адаксиального эпидермиса листовой пластинки *Melissa officinalis* L. (ув. 4×, 10×)

Железистые трихомы имеют кутикулярное покрытие более утолщенное, чем эпидермис, расположены преимущественно на абаксиальной стороне листа и по главной жилке. Экспериментальные исследования показали, что на 1 мм² абаксиальной

стороны листовой пластинки располагаются 200–400 устьиц, до 80–100 простых одноклеточных конусовидных неветвящихся волосков, 10–12 эфиромасличных железок на расстоянии 100–150 мкм друг от друга.

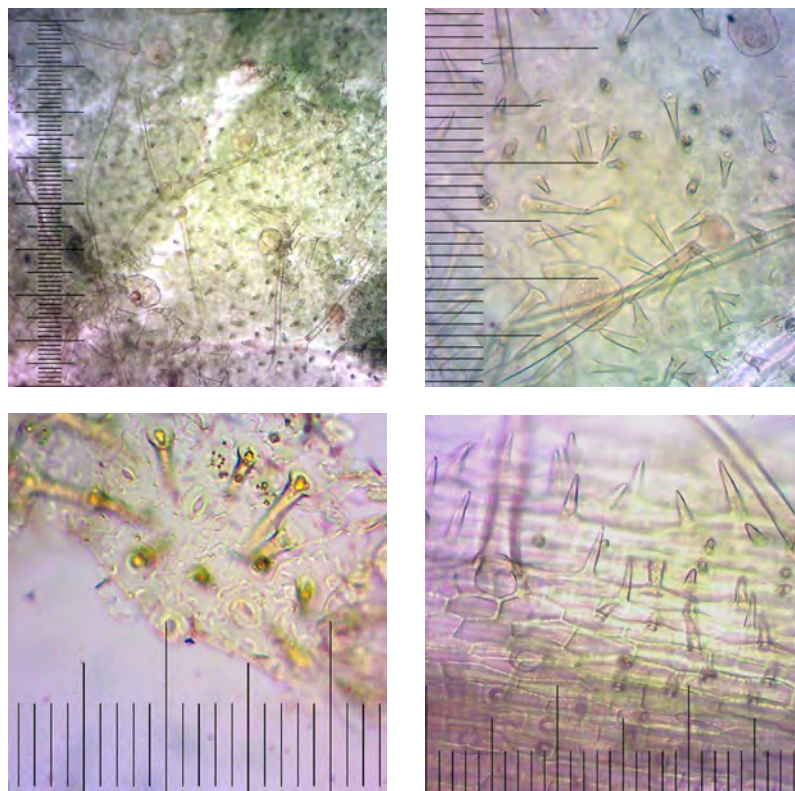


Рисунок 5 – Микропрепарат абаксиального эпидермиса листовой пластинки *Melissa officinalis* L. (ув. 4×, 10×)

Клетки эпидермиса чашечки различные по форме, характеризуются сильноизвилистыми стенками без утолщений, у основания чашечки и по краю присутствует складчатая кутикула, устьичный аппарат диацитного типа, устьица располагаются редко либо отсутствуют (рис. 6). На рисунке 6 показаны конусовидные одноклеточные волоски чашечки, мно-

гоклеточные конусовидные волоски, состоящие из 2–4 клеток с утолщенными стенками, эфиромасличные железы, головчатые волоски с одной базальной клеткой (тип II). В нижней части чашечки присутствуют сосудистые пучки, окруженные пористыми толстостенными одревесневшими склеренхимными волокнами.

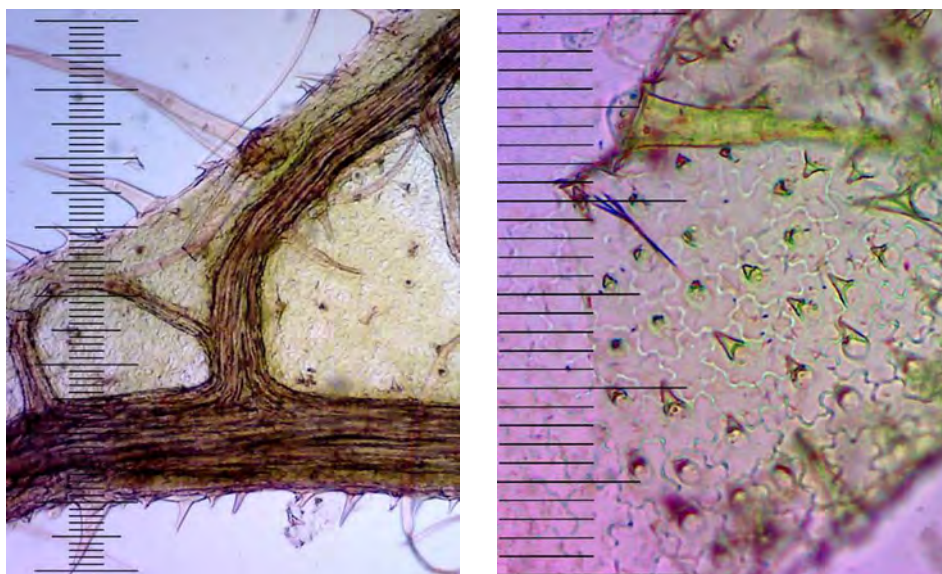


Рисунок 6 – Микропрепарат эпидермиса чашечки *Melissa officinalis* L. (ув. 4×, 10×)

Клетки наружного эпидермиса венчика прямоугольной формы, характеризуются извилистыми стенками с утолщениями, у основания и по краю со складчатой кутикулой, имеются немногочисленные

характерные устьица. Клетки внутреннего эпидермиса венчика многоугольные, извилисто-стенные. Клетки основания венчика прямоугольные, с извилистыми антиклинальными стенками (рис. 7).

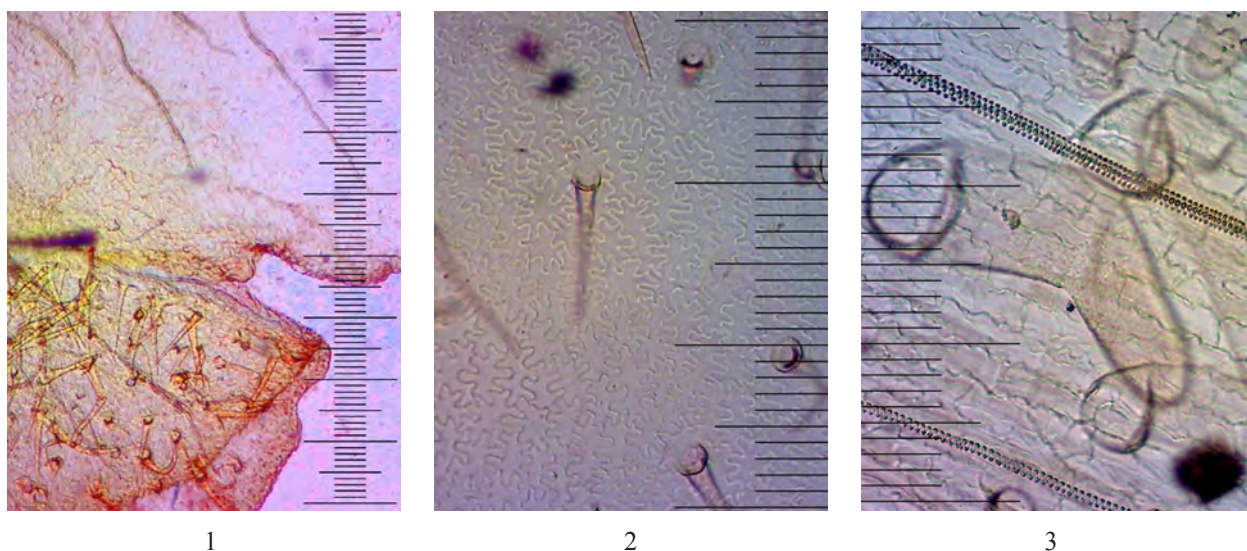


Рисунок 7 – Микропрепарат эпидермиса венчика *Melissa officinalis* L. (ув. 4×, 10×)

1 – препарат с поверхности лопасти венчика; 2 – клетки наружного эпидермиса венчика;
3 – клетки основания венчика с пальцевидными волосками

С обеих сторон эпидермис венчика покрыт большим количеством длинных простых многоклеточных волосков с мелкобородавчатой кутикулой и простых одноклеточных конусовидных волосков. На внутрен-

ней стороне венчика присутствуют эфиромасличные железы и головчатые волоски. Характерно наличие пальцевидных эпидермальных волосков с бородавчатой кутикулой (рис. 8).

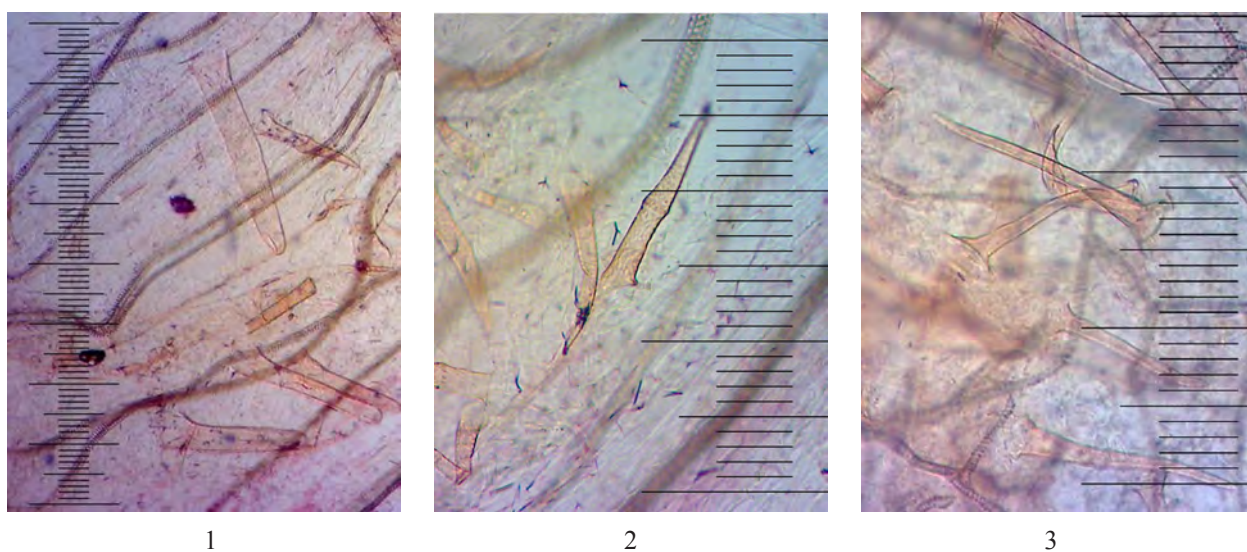


Рисунок 8 – Трихомы эпидермиса венчика *Melissa officinalis* L. (ув. 4×, 10×)

1 – пальцевидные волоски лопасти венчика; 2 – простые многоклеточные волоски с мелкобородавчатой кутикулой; 3 – простые одноклеточные конусовидные волоски

На лопастях венчика клетки эпидермиса многоугольные со слабо извилистыми стенками с утолщениями,

расположены черепитчато, присутствуют пальцевидные волоски с мелкобородавчатой кутикулой (рис. 9).

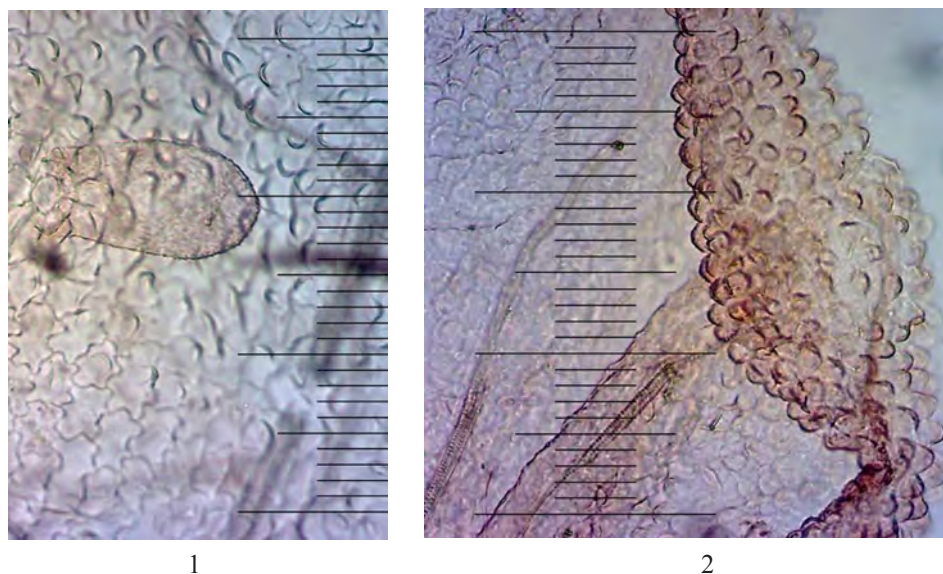


Рисунок 9 – Микропрепарат эпидермиса венчика *Melissa officinalis* L. (ув. 4×, 10×)
 1 – клетки верхней части эпидермиса венчика с пальцевидными волосками мелкобугорчатой кутикулой; 2 – клетки лопасти венчика

Эпидермис стебля представлен небольшими многоугольными вытянутыми клетками с прямыми стенками. Устьичный аппарат диацитного типа, устьичная щель ориентирована вдоль стебля. Диагностированы многочисленные простые и железистые выросты эпидермиса, расположенные в основном на

ребрах стебля. В большом количестве присутствуют простые, крупные многоклеточные волоски (I тип) с ровной кутикулой и одноклеточные конусовидные волоски (II тип). В верхней зоне стебля располагаются головчатые волоски типа II, редкие эфиромасличные железы (рис. 10).

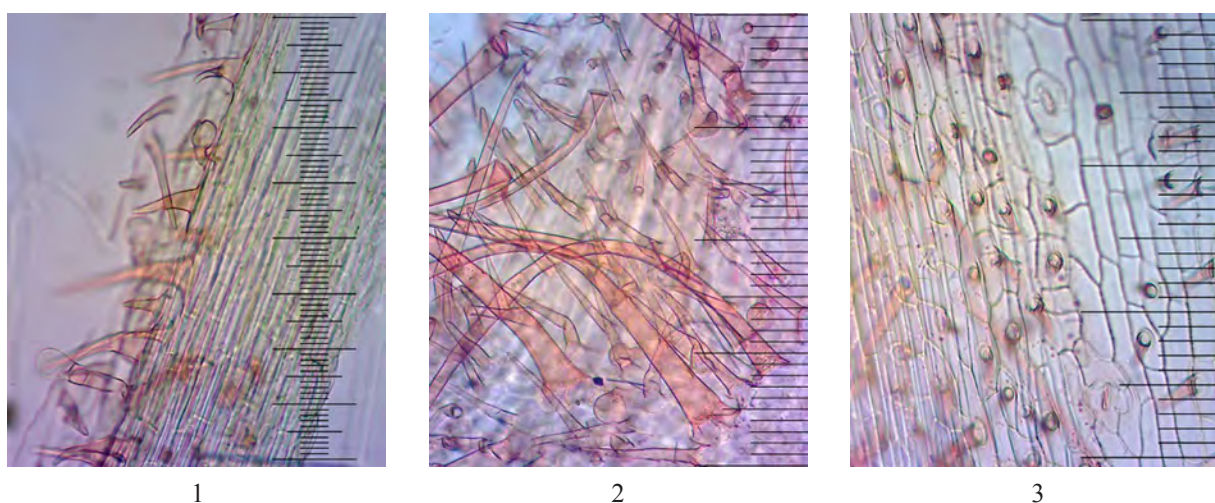


Рисунок 10 – Микропрепарат эпидермиса стебля *Melissa officinalis* L. (ув. 4×, 10×)
 1 – препарат с поверхности; 2 – трихомы эпидермиса стебля;
 3 – клетки и устьичный аппарат эпидермиса стебля

Стебель на поперечном сечении четырехгранный. Эпидермис покрыт тонкой кутикулой. Клетки эпидермиса овальной, квадратной или прямоугольной формы, расположены в один слой. Под эпидермисом в углах стебля размещаются 4–8 слоев клеток уголкового колленхимы, локально залегают по 2–3 слоя клеток хлоренхимы. Клетки эндодермы овальной формы, расположены в один слой, содержат крахмальные зерна. Кора состоит из 4–10 слоев паренхимных клеток неправильной овальной или прямоугольной формы с межклеточным пространством, частично представлены клетки периклической склеренхимы. Лубяные

волокна флоэмы, клетки камбия, сосуды и трахеиды ксилемы проводящие пучки не образуют. Камбий состоит из 1–2 слоев клеток, выражен нечетко. Клетки сердцевины стебля представлены выполняющей паренхимой, крупные многоугольные или округлые, центробежно уменьшающиеся в размере (рис. 11). На поперечном сечении листовой пластинки видно, что верхний и нижний эпидермис покрыты тонким слоем кутикулы. Толщина обеих кутикул эпидермиса почти одинакова. Большое количество простых конусовидных волосков расположено на эпидермисе с верхней и нижней стороны, железистых волосков больше на

абаксиальном эпидермисе, особенно по жилкам. Эпидермальные клетки расположены в один ряд, по форме овальные, округлые или прямоугольные. Клетки верхнего эпидермиса больше, чем на нижнем эпидермисе, или почти равны им. Мезофилл листа состоит из одного слоя удлинённых прямоугольных клеток палисадной паренхимы и 2–4 слоев изодиаметральных клеток губчатой паренхимы с крупными межклетниками. Результаты измерения клеток приведены в таблице 1 (рис. 11). На поперечном сечении черешка видно, что адаксиальная поверхность вогнутая и абаксиальная по-

верхность выпуклая. На обеих сторонах черешка присутствуют простые и железистые трихомы. Эпидермис состоит из 1–2 слоев клеток овальной, округлой или прямоугольной формы. Клетки паренхимы крупные шестиугольные или округлые, в диаметре достигают 30 мкм. В центре расположен крупный дуговидный коллатеральный проводящий пучок, присутствуют два небольших коллатеральных пучка в крыльях черешка. На адаксиальной поверхности в крыльях черешка расположена колленхима из 2–3 слоев клеток и локально 1–2 слоя клеток хлоренхимы (рис. 11).

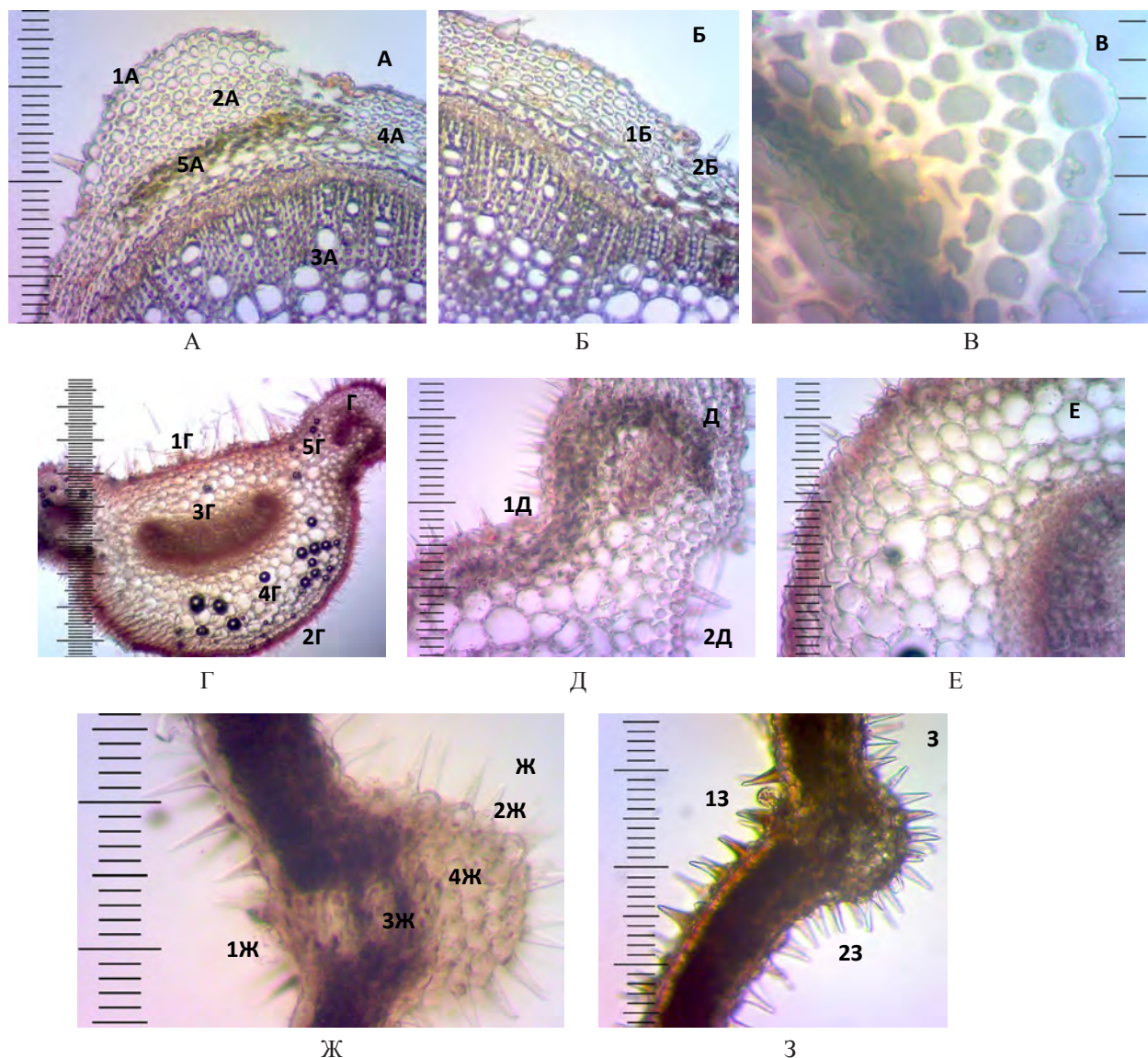


Рисунок 11 – Микропрепараты поперечных срезов стебля, черешка и листа *Melissa officinalis* L.
А, Б (ув. $\times 10$), В (ув. $\times 40$) – поперечный срез стебля: 1А – эпидермис; 2А – колленхима; 3А – сосуды; 4А – паренхима коры; 5А – хлоренхима. 1Б – устьичный аппарат; 2Б – простой волосок. Г (ув. $\times 4$), Д, Е (ув. $\times 10$) – поперечный срез черешка: 1Г – адаксиальный эпидермис, 2Г – абаксиальный эпидермис, 3Г – центральный проводящий пучок, 4Г – паренхима, 5Г – боковой дополнительный проводящий пучок, 1Д – простые конусовидные волоски, 2Д – головчатые волоски. Ж, З (ув. $\times 10$) – поперечный срез листа: 1Ж – адаксиальный эпидермис, 2Ж – абаксиальный эпидермис, 3Ж – проводящий пучок, 4Ж – паренхима; 13 – головчатый волосок, 23 – простые конусовидные волоски. Цена деления 10 мкм

При рассмотрении препаратов порошка травы мелиссы лекарственной наблюдали обрывки эпидермиса листа, стебля, венчика и чашечки с характерны-

ми трихомами, пыльцевые зерна. Пыльцевые зерна сферические, со слегка бородавчатой экзиной и порами (рис. 12).

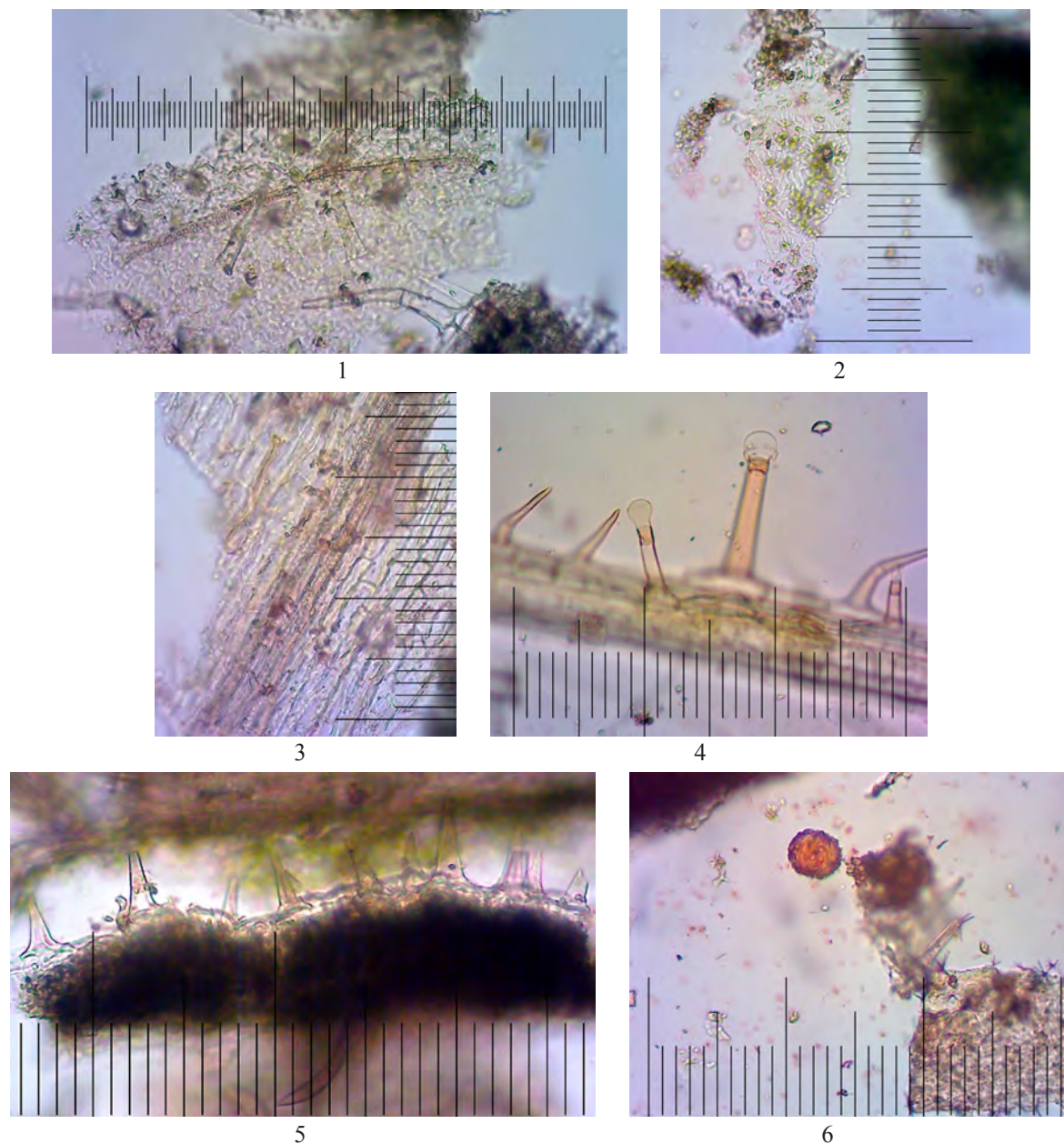


Рисунок 12 – Микропрепарат порошка травы *Melissa officinalis* L. (ув. 4×, 10×)
 1 – фрагмент эпидермиса листа; 2 – фрагмент эпидермиса чашечки; 3 – фрагмент эпидермиса стебля;
 4 – железистые волоски; 5 – простые конусовидные волоски; 6 – пыльцевые зерна. Цена деления 10 мкм

В таблицах 1 и 2 приведены результаты экспериментальных исследований биометрических характеристик основных микроскопических признаков тра-

вы *Melissa officinalis* L. сортообразца из коллекции НБС-ННЦ и характер расположения трихом по надземным органам растения.

Таблица 1 – Количественно-анатомические показатели травы *Melissa officinalis* L. сортообразца из коллекции НБС-ННЦ

Микроскопическая структура	Размеры, мкм	
	Длина, мкм	Ширина, мкм
Клетки верхнего эпидермиса листа	60–70	50–60
Клетки нижнего эпидермиса листа	40–50	30–40
Клетки эпидермиса чашечки	50–60	30–40
Клетки эпидермиса венчика	60–70	20–40
Клетки эпидермиса стебля	50–60	10–20
Длина простых многоклеточных волосков (I тип)	100–400	
Длина головчатых волосков		
1. I тип	1 – 30–50,	
2. II тип	2 – 60–300	

Микроскопическая структура	Размеры, мкм	
	Длина, мкм	Ширина, мкм
Длина простых конусовидных волосков (II тип)	20–50	
Длина пальцевидных волосков эпидермиса венчика (III тип)	100–250	
Число эфиромасличных железок в 1 мм ² , шт.	10–12	
Диаметр железок	40–80	
Устьичный аппарат диаметр, мкм	20	
Число устьичных аппаратов на 1 мм ² абаксиальной стороны листовой пластинки располагается устьица, шт.	200–400	
Толщина листа, мкм	50–70	
Толщина эпидермиса листа, мкм		
адаксиального	7–10	
абаксиального	10–15	

Таблица 2 – Распределение железистых волосков, железок и простых волосков и выростов эпидермы на надземных органах *Melissa officinalis* L. сортообразца из коллекции НБС-ННЦ

Часть растения	Железистые волоски, тип I/II	Железки	Простые волоски тип I/II
Стебель	+	+	++
Адаксиальная сторона листа	–	+	++
Абаксиальная сторона листа	+++	+++	+++
Черешок	+	–	+++
Чашечка	+	+	++
Венчик	+	–	++

Примечание: (–) отсутствие трихом, (+) немного трихом, (++, +++) большое количество трихом

Использование гистохимических тестов показало характерное окрашивание тканей и трихом, которое является результатом взаимодействия реактивов с детектируемыми компонентами и при-

водит к их специфическому связыванию [22–31]. Результаты обнаружения вторичных метаболитов в трихомах и тканях Melissa представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Гистохимия тканей и железистых трихом травы *Melissa officinalis* L.

Определяемый компонент	Реактив	Окрашивание	Тип трихом		
			простые	железистые	железка
Липиды, суберин, кутин	Судан III	Красный	+	+	+
Эфирное масло	Судан III	Оранжево-красный	–	+	+
Эфирное масло	Метиленовый синий	Синий	–	+	+
Терпеноиды	2,4-динитрофенилгидразин	Черно-синее	+	+	+
Сесквитерпеновые лактоны	к. H ₂ SO ₄	Желтый	–	–	–
Флавоноиды	Ванилин, к. HCl	Желтый, красный	+	–	+
Флавоноиды	Ацетат магния	Желтый	+	+	–
Фенольные соединения	10% спиртовой раствор калия бихромата	Желтый	+	+	+
Фенольные соединения	Железа (III) хлорид	Коричневый, зелено-черный	+	+	–
Алкалоиды	Реактив Вагнера	Черный	–	–	–
Лигнин	Флороглюцин, к. HCl	Красный, фиолетовый	–	–	–
Полисахариды (крахмал, инулин)	10% раствор тимола, к. H ₂ SO ₄	Оранжево-красный	+	–	–

Примечание: – отрицательная реакция; + положительная реакция

Для гистохимического анализа секретирующего материала использовали несколько методов окрашивания. Для подтверждения присутствия гидрофобных метаболитов липидов и эфирного масла препараты окрашивали раствором реактива судан III, наблюдали окрашивание кутикулы эпидермиса стебля, кутикулы ножки и внутриклеточного содержимого головки железистых волосков, кутикулы простых волосков, а также внутриклеточного содержимого эфиромаслич-

ных железок в оранжево-розовый цвет (рис. 13 А–Г). Для идентификации эфирных масел применялся раствор метиленового синего в этиловом спирте [22, 24]. После обработки поверхностных микропрепаратов листа раствором метиленового синего наблюдали, что содержимое эфирномасличных железок и железистых волосков окрашивалось в синий цвет (рис. 13 Д, Е, Ж). Полученный результат свидетельствует о наличии эфирного масла в этих структурах.

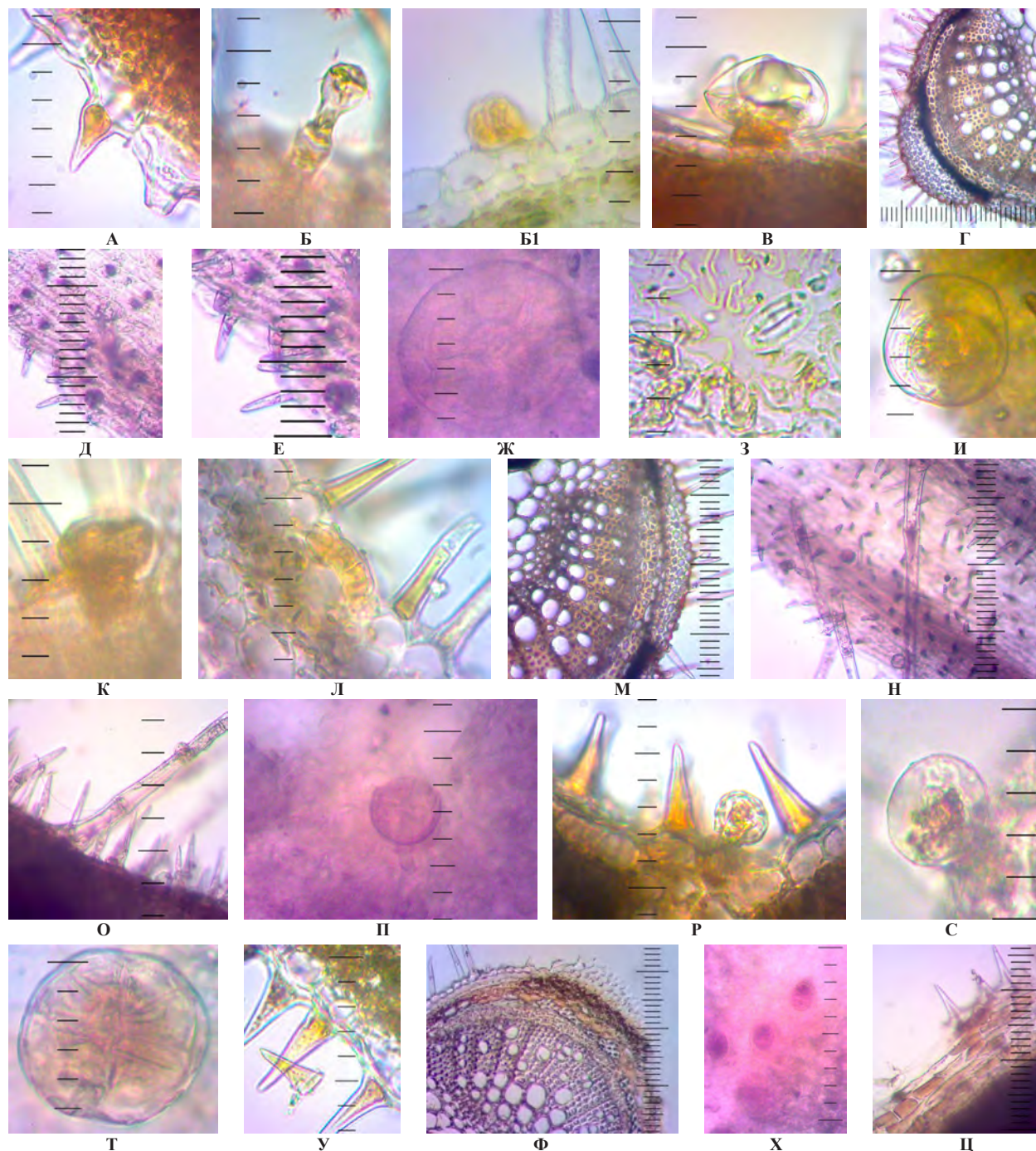


Рисунок 13 – Результат гистохимических реакций

с суданом III: А–В трихомы (ув. $\times 40$); Г – поперечный срез стебля (ув. $\times 10$); с метиленовым синим: Д, Е (ув. $\times 10$), Ж (ув. $\times 40$) – трихомы; с ванилином и к. HCl: З, И – эпидермис стебля, железка (ув. $\times 40$); с железа (III) хлоридом: К, Л – трихомы (ув. $\times 40$), М – поперечный срез стебля (ув. $\times 10$); с 2,4-динитрофенилгидразином: Н – трихомы (ув. $\times 10$), О, П (ув. $\times 40$); с магния ацетатом: Р – трихомы (ув. $\times 40$); с калия бихроматом: С, Т, У – трихомы (ув. $\times 40$); с флуороглюцином с к. HCl: Ф – поперечный срез стебля (ув. $\times 10$); с 10% раствор тимола и к. H_2SO_4 : Х – трихомы (ув. $\times 40$), Ц (ув. $\times 10$)

Обработка микропрепаратов листа кислотой серной концентрированной показала, что трихомы и ткани листа не окрашиваются в желто-оранжевый цвет, что предполагает отсутствие сесквитерпеновых и стероидных соединений в исследуемом сырье. Поперечные срезы стебля и листа в области главной жилки окрашивали 1% раствором железа (III) хлорида. При этом наблюдалось черно-зеленое окрашивание по всей поверхности препаратов, что также свидетельствует о наличии фенольных соединений (рис. 13 К, Л, М). При добавлении раствора ванилина и кислоты хлористоводородной концентрированной ткани, секретирующие флавоноиды, окрасились в желтый цвет (рис. 13 З, И). Окрашивание реактивом Вагнера на присутствие алкалоидов не сопровождалось аналитическим эффектом. Исследуемый растительный материал помещали в 10% спиртовой раствор калия бихромата на 7 суток, после чего проводили микроскопию сырья. Фенольные соединения обнаруживались в окрашенном содержимом клеток трихом (рис. 13 С, Т, У). Для установления присутствия терпеноидов проводили реакцию с 2,4-динитрофенилгидразином (рис. 13 Н, О, П), клеточные стенки простых трихом и содержимое железок окрасилось в черно-синий цвет. При обработке микропрепаратов раствором магния ацетата клеточное содержимое простых волосков и головчатых трихом окрасилось в желто-оранжевый цвет, что демонстрирует накопление флавоноидов (рис. 13 Р). Присутствие лигнина устанавливали реакцией с

флороглюцином и концентрированной кислоты хлористоводородной, на поперечном срезе стебля наблюдали окрашивание оранжево-розовым цветом клеток перидиклической склеренхимы (рис. 13 Ф); Результат гистохимической реакции с 10% раствором тимола и к. H_2SO_4 показал наличие углеводов в клетках эпидермиса стебля (рис. 13 Х, Ц) и в клеточном содержимом простых конусовидных волосков.

В таблице 4 приведены результаты микроскопирования тканей и трихом *M. officinalis* L. при различной УФ-идентификации. Ткани и кутикула трихом, излучающие ярко-зеленую автофлуоресценцию в УФ-свете демонстрируют присутствие гидрофобных веществ суберина и кутина (рис. 14 А–Е) [30, 31]. У железистых трихом наблюдали яркую желтую автофлуоресценцию липофильного и гидрофильного внутриклеточного содержимого, мезофилл листа светился желтовато-зеленым светом. Слабая желтая автофлуоресценция наблюдалась у внутриклеточного содержимого головки железки, железистых трихом обоих типов и кутикулы простых волосков (рис. 14 А, Б, Д), что указывало на присутствие фенольных соединений. В клетках мезофилла листа отмечена яркая красная автофлуоресценция в УФ-свете, что может быть следствием присутствия хлорофилла (рис. 14 Б, Е). На поперечном срезе стебля в УФ-свете (светофильтр Green (G-2A)) клетки эндодермы, флоэмы и паренхимы сердцевинки стебля приобретали красное свечение из-за присутствия веществ фенольной природы (рис. Ж, З).

Таблица 4 – Цветовые особенности флуоресценции неокрашенных и окрашенных тканей *Melissa officinalis* L. при различной УФ-идентификации

Красители	Источник света	Цвет флуоресценции	Биологически активные вещества	Результат
Неокрашенные ткани	УФ-свет (UV – 2A)	Ярко голубая-беловатая	Лигнин или фенолы	–
		От желтоватой до коричневатой	Конденсированные танины	+
		Ярко-зеленая	Липиды	+
	Green (G-2A)	Ярко-красный	Фенолы	+
Железа (III) хлорид	УФ-свет (UV – 2A)	Красный	Полифенольные соединения	+
$AlCl_3$	УФ-свет (UV – 2A)	Голубой, зеленый	Флавоноиды	+
Ацетат свинца	УФ-свет (UV – 2A)	Голубой	Флавоноиды	н.д.

Примечание: – отрицательная реакция; + положительная реакция; н.д. – не определялось

Окрашивание препарата поперечного среза стебля и поверхностного препарата листа раствором алюминия хлорида показало наличие зеленой флуоресценции в УФ-свете (UV – 2A) клеток колленхимы, эндодермы и ксилемы стебля и внутриклеточного содержимого простых конусовидных волосков II типа (рис. И1, И2), которая свидетельствует о присутствии веществ флавоноидной природы. Окраска поперечного среза стебля раствором железа (III) хлорида привела к появлению ярко-красной флуоресценции в УФ-свете (UV – 2A),

что говорит о локализации в клетках хлоренхимы, флоэмы и ксилемы полифенольных соединений (рис. 14К). Полученные результаты согласуются с литературными данными по вторичным метаболитам. Так, фенольные соединения (флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты) были обнаружены в надземной части *M. officinalis* [10, 12, 15]. Кроме того, М. Chwil et al. обнаружили терпеновые соединения и полифенолы в обоих типах железистых трихом у *M. officinalis* гистохимическими методами [30].

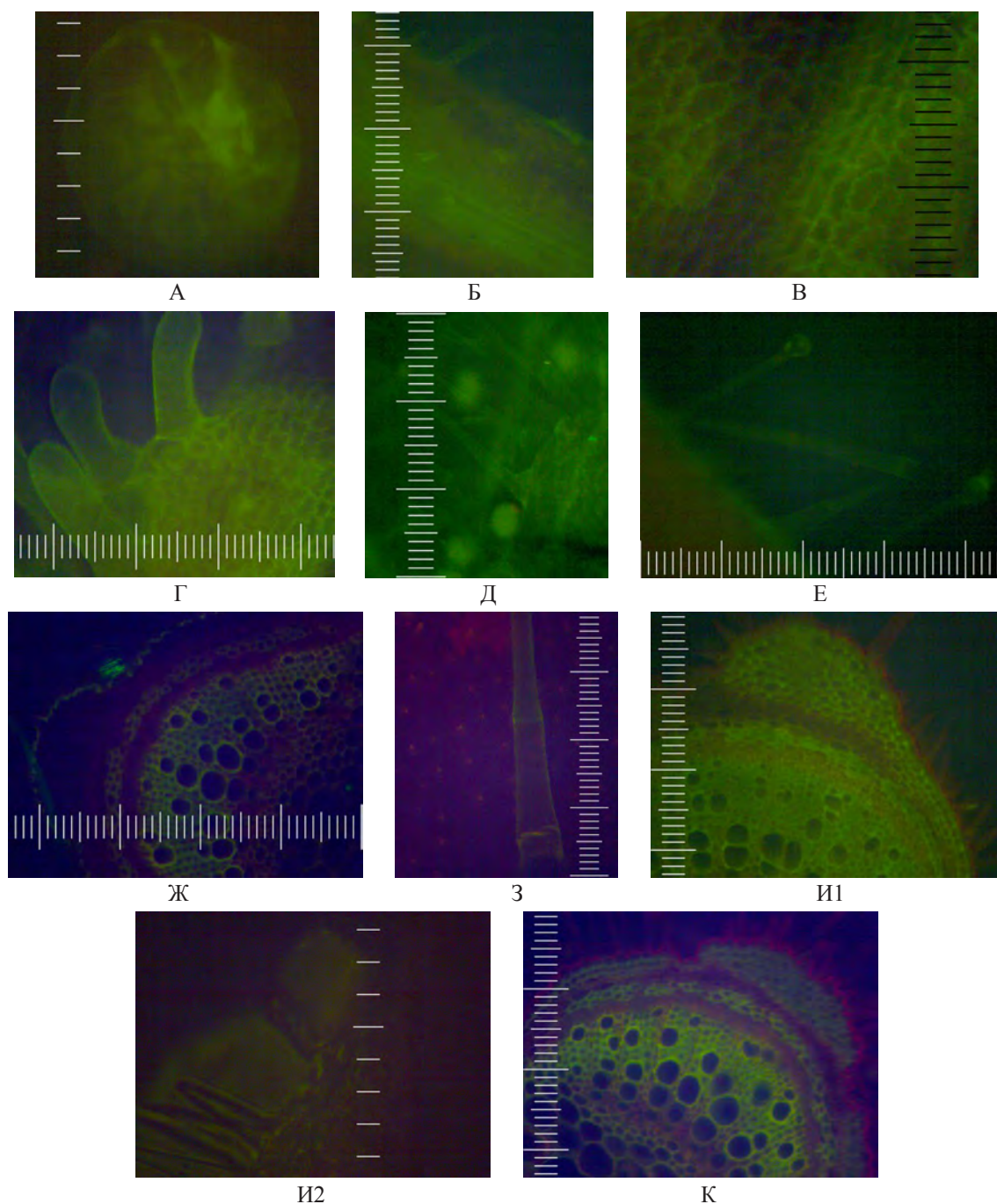


Рисунок 14 – Флуоресценция секреторных структур *Melissa officinalis* L.

А – эфиромасличная железа листа, (ув. $\times 40$), УФ-свет (UV – 2A); Б – эпидермис листа, простые конусовидные волоски, (ув. $\times 10$), УФ-свет (UV – 2A); В – клетки эпидермиса венчика, (ув. $\times 10$), УФ-свет (UV – 2A); Г – пальчатые простые волоски венчика, (ув. $\times 10$), УФ-свет (UV – 2A); Д – простые многоклеточные волоски, головчатые волоски тип I (ув. $\times 10$), УФ-свет (UV – 2A); Е – головчатые волоски с воронковидной головкой тип II (ув. $\times 10$), УФ-свет (UV – 2A); Ж – поперечный срез стебля (ув. $\times 10$), Green (G-2A); З – эпидермис листа (ув. $\times 10$) Green (G-2A) И1 – поперечный срез стебля, $AlCl_3$ (ув. $\times 10$), УФ И2 – простые волоски, $AlCl_3$ (ув. $\times 40$), УФ; К – поперечный срез стебля, $FeCl_3$ (ув. $\times 10$), УФ

Использование реактива судан III при гистохимическом исследовании показало, что клеточные оболочки эпидермы, эфиромасличные железы, кроющие и головчатые трихомы листьев, чашечки, венчика и стебля, ткани стебля окрашивались в оранжево-желтый цвет, что говорит о наличии в них гидрофобных метаболитов. Эфирное масло и липиды идентифицированы в эфирно-масличных железах

и железистых волосках. Фенольные соединения обнаружены в колленхиме вокруг проводящих пучков листа, в клетках флоэмы и ксилемы. Алкалоиды в тканях и трихомах надземной части Melissa гистохимически не обнаружены. Терпеновые соединения и полифенолы обнаружены в обоих типах железистых трихом и простых волосках *M. officinalis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В результате проведенного ис-

следования надземной части Melissa лекарственной сортаобразца из коллекции НБС-ННЦ подтверждено наличие диагностически важных для данного вида морфологических и микроскопических признаков, установлено соответствие имеющемуся в литературе описанию данного вида сырья. Впервые проведен морфометрический анализ сырья, определены форма и размеры клеток эпидермиса листа, стебля, чашечки и венчика, характер и частота расположения эпидермальных трихом анализируемого сортаобразца, что дополняет анатомическую характеристику надземной части *M. officinalis* L. Гистохимически впервые установлены присутствие и локализация в тканях и трихомах сырья липидов, полисахаридов, фенольных соединений, флавоноидов, компонентов эфирного масла, терпеноидов. Таким образом, содержащее железо и железистых волосков богато

гидрофильными и гидрофобными соединениями, в меньшей степени – простые нежелезистые кроющие трихомы. Все трихомы осуществляют секрецию компонентов эфирного масла, что подтверждено гистохимическими тестами. Впервые выявлены анатомические структуры, принимающие участие в секреции тех или иных типов биологически активных веществ. Методом флуоресцентной микроскопии впервые проанализировано присутствие в трихомах и тканях травы Melissa лекарственной липидов, хлорофилла, полисахаридов, флавоноидов и фенольных соединений. Важно отметить доступность, простоту и ёмкость гистохимического метода анализа сырья, перспективность его использования при идентификации лекарственного растительного сырья и определения характера и локализации секреции биологически активных веществ.

INTRODUCTION. Ecological and geographical conditions of introduction of medicinal plants have a decisive influence on the chemical composition of biologically active substances of plants, as well as on the biological features of their development. The method of microscopic analysis is used to study the anatomical structure of the plant, establish the characteristic anatomical-diagnostic and morphometric characteristics. Chemical and physical-chemical research methods allow the identification of active and related substances in plants. Such methods include a histochemical analysis, which makes it possible to identify patterns of secretion of biologically active substances and to establish their presence and localization in the tissues and organs of the plants. In turn, such studies illustrate distinctive features of the metabolism of glandular trichomes and tissues of different chemotypes of a single plant species. In the Nikitsky Botanical Garden – National Science Center (NBG-NSC) of the Russian Academy of Sciences, Republic of Crimea, Yalta, in the laboratory of aromatic and medicinal plants, long-term biological and introduction studies of the development of different varieties of medicinal plants are traditionally held. *Melissa officinalis* L. is one of the species of the Lamiaceae family, introduced on the experimental plot of essential oil plants of the botanical garden [1, 2].

Melissa officinalis L. (the synonyms: *Faucibarba officinalis* (L.) Dulac., *Mutelia officinalis* (L.) Gren. ex Mutel, *Thymus melissa* E.H.L. Krause, Citronell, Common balm) is one of the 5 species of the *Melissa* genus, the Lamiaceae family. The plant is known by other names: lemon balm, bergamot mint, bee balm, beehouse. *M. officinalis* L. is widespread in Europe, Africa, North America, Iran, Ukraine, the Caucasus and Central Asia. This plant is cultivated as a medicinal and essential oil plant in the UK, Serbia, Algeria, Mediterranean countries, the Caucasus, Krasnodar region, Samara region, Crimea [3–5].

The herb of *Melissa officinalis* L. is characterized by a high content of phenylpropanoids (rosmarinic, caffeic, chlorogenic acid, p-coumaric, ferulic and sinapic acids), flavonoids (luteolin, tsinarozid, apigenin, kosmosiin),

phenol carbonic acids (syringic, gentisic, salicylic, vanillic, p-hydroxybenzoic, protocatech), condensed tannins [6, 7]. According to foreign researchers, oleanolic and ursolic acids are identified in the herb of melissa. [8]. Monoterpenes (cital) prevail in the essential oil [9].

The aerial part of *Melissa officinalis* L. is used in ethnomedicine of European countries. In France, Italy, Austria, Germany and Bulgaria, lemon balm is used for trophic ulcers as a wound-healing agent, for skin rashes, furuncles on the skin, for rinsing in inflammation of the gum tissue; externally for massage and rubbing, for poultices and compresses; in manufacturing of cosmetics [4, 10, 11]. The official raw material is the aerial part and leaves of melissa in Europe, and the plant is included in the European Pharmacopoeia, the British Herbal Pharmacopoeia, in the Iranian Herbal Pharmacopoeia. In Russia, this type of raw materials has become official since 1996, now the project of the pharmacopoeial item “Melissy lekarstvennoy trava” (Eng.: “The herb of *Melissa officinalis* L.”) has been worked out (instead of FA 42-3645-98) (Project materials on General monographs and pharmacopoeial items <https://www.rosminzdrav.ru/61/11/materially-po-farmakopee>) [12]. Pharmacological studies show that medicines based on the melissa herb exhibit mild hypnotic effects, have a sedative, antispasmodic effect on the central nervous system [13–16]. Increased appetite and stimulation of gastric juice secretion, increased gastric motor activity, the manifestation of choleretic and carminative action of medicines based on melissa herb are the factors characteristic for the medicines based on the melissa herb [4, 17]. Besides, it has hypoglycemic, astringent properties and stimulates menstruation [18]. The plant aldehydes (cital, citronelal) have antimicrobial activity against a number of pathogenic fungi and tuberculosis Mycobacteria (K. Okazaki and S. Oshima, 1953). Rosmarinic acid causes antiviral activity against herpes viruses, influenza; it has antiallergic and antioxidant effects based on anti-complementary and anti-radical properties of melissa [19].

THE AIM. Is to determine microdiagnostic signs and biometric characteristics of the *Melissa officinalis*

L. variety sample from the collection of the Nikitsky Botanical Garden, to study the possibility of using histochemical reactions for the analysis of tissues and secretory structures of the studied species in determining the authenticity of raw materials and the identification of biologically active substances due to the lack of literature data of general histochemical research.

MATERIALS AND METHODS. The plant object

of the study was the aerial part of *Melissa officinalis* L., introduced on the experimental plot of NBG-NSC. For several years, the researches of a biological specific character of vegetation of this selection variety sample have been carried out by Logvinenko Lidiya Alekseevna, a senior researcher of the Nikitsky Botanical Garden, in ecological and geographical conditions of the southern coast of Crimea (Fig. 1).



Figure 1 – External appearance of *Melissa officinalis* L. variety sample from the collection of NBG-NSC, Republic of Crimea, Yalta

The analyzed raw materials harvested during the flowering period in July 2016 is a mixture of stems (up to 35 cm), leaves and flowers. Drying of raw materials was carried out at 25–30°C, avoiding exposure to direct sunlight, for 7 days. The humidity of the melissa dry raw materials after drying was $8.79 \pm 0.36\%$. The analysis of microscopic signs of raw materials, morphometric and histochemical studies were carried out according to the methods of State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII (General pharmacopoeia article.1.5.3.0003.15 «Tekhnika mikroskopicheskogo i mikrohimicheskogo issledovaniya lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya i lekarstvennyh rastitel'nyh preparatov», General pharmacopoeia article.1.5.1.0002.15 «Travy» [20, 21]) using a microscope «Mikromed-1» and a fluorescent microscope «Mikromed 3 LUM» with eyepiece 10×, lens 4×, 10×, 40× and Digital Eyepiece microscope camera MD 3.2 (3.2 megapixels). Histochemical reactions to the presence and localization of biologically active components in tissues, simple and capitate trichomes were carried out using the following reagent solutions: sudan III (lipids, essential oils, cutin, suberin); methylene blue (essential oils); 10% thymol solution and H₂SO₄ (polysaccharide, amyllum, inulin), concentrated hydrochloric or sulfuric acid (sesquiterpene lactone); ferric chloride (III) и potassium dichromat (phenolic compounds); magnesium acetate and lead neutral acetate (flavonoids, fluorescence under UV light), aluminium trichloride (flavonoids, blue fluorescence under UV light); vanillin-HCl (flavonoids), Wagner's reagent (alkaloids), phloroglucinol with concentrated hydrochloric acid (lignin), 2,4-dinitrophenylhydrazine (terpenoids) [22–31]. The photos were edited

in the program Paint.NET.3.5.11, combining the photos of the object-micrometer (microlinear scale division value of 0.01 mm or 10 mcm) and the photos of the object of research with each working magnification of the microscope lens and the resolution of the digital camera used. The sample consisted of 10 measurements, the statistical processing was carried out in the program Microsoft Excel (Microfoft, USA). The detected external and microscopic signs of the studied raw materials were compared with the literature data [11, 12].

RESULTS AND DISCUSSION. The study of morphological features of the aerial part of *M. officinalis* showed that the leaves of this variety sample from the top side are green, from the bottom side they are light green, short-petiolate, ovoid, opposite with a crenellated edge, pinnate venation and an acuminate tip. The leaf blade is pubescent on the upper side of the veins, the underside is fully pubescent; its length is up to 3.2 cm, the width is up to 2.5 cm. The stems are tetrahedral gray-green, with longitudinal grooves, the pubescence is weakly pronounced in upper and middle parts; at the bottom the stems are bare.

At the fracture, the stem is white and green, with a cavity inside at the bottom. The flowers are small (calyx 5–7 mm, corolla 7–9 mm long), collected in the axils of the upper leaves in false whorls, and form an inflorescence of the thirs type 5–10 cm long in the upper part of the stem. The corolla is bilabiate, pubescent, white or white-pink.

The calyx is pubescent, funnel-shaped with five pointed teeth (Fig. 2). The raw material has a lemon smell, increasing with rubbing. The taste of the water extract is bitterish.



Figure 2 – External appearance of *Melissa officinalis* L. variety sample (stems, leaves, flowers) from the collection of NBG-NSC, Republic of Crimea, Yalta

1 – whole raw materials; 2, 3, 4 – raw materials cut, 5 – herb powder

Microscopic studies were carried out on temporary microscopic preparations made from dried raw materials according to the generally accepted methods [20]. Microscopy of the temporary microscopic preparations showed, that the plant tissues, containing essential oil (glands and trichomes), are pigmented. The adaxial side of the leaf blade is covered with a cuticle layer. The epi-

dermis of the adaxial and abaxial sides of the leaf consists of a single layer of cells. When examining the microscopic preparations of the leaf edge, a large number of simple unicellular conical, nonbranching hairs (II type), 20–50 μm long (Fig. 3) were noted, their base is characterized by the formation of cuticle folds. This type of simple trichomes covers both the adaxial and abaxial sides of the leaf.

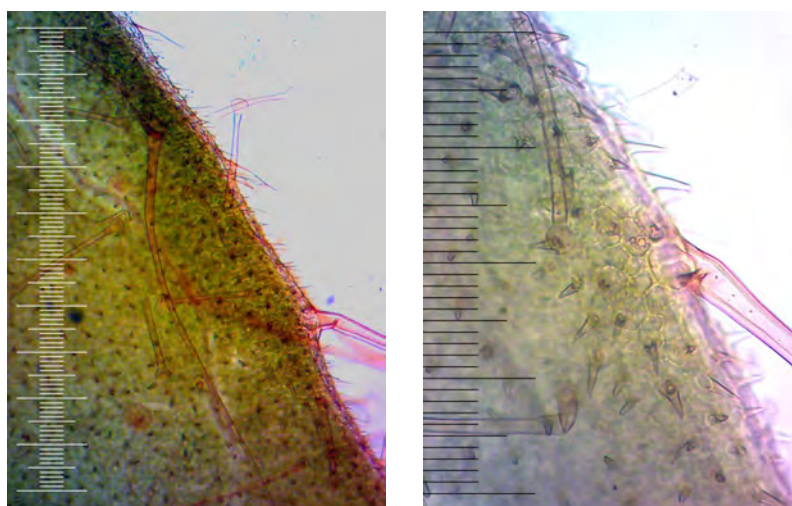


Figure 3 – Microscopic preparation of the leaf edge of *Melissa officinalis* L. (mag. 4 $\times$, 10 $\times$)

The upper epidermis cells of the leaf of various forms with winding walls are without thickening, the lower epidermis cells have more sinuous walls.

On the underside of the leaf there are stomata, a stomatic apparatus of a diacytic type. Multicellular

conical hairs are characteristic for the lower epidermis, consisting of 2–4 cells with thickened walls (Type I) and capitate hairs of two types: with a multicellular leg and a funnel-shaped head (Type I) and with a short single-celled leg and a spherical head (Type II). The

essential oil glands of radial type are not immersed in mesophyll, they consist of a short single-celled leg and a spherical head with eight excretory cells. At the sites

of the attachment of essential oil glands, the epidermal cells form a rosette from 5–6 cells of the epidermis (Fig. 4, 5).

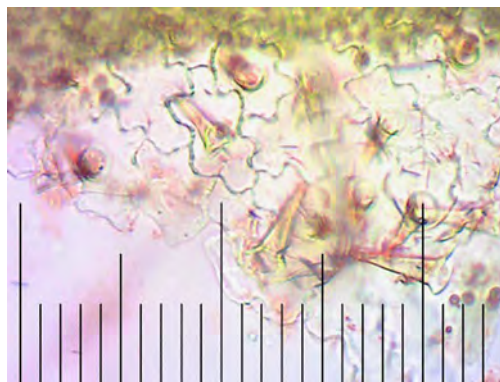
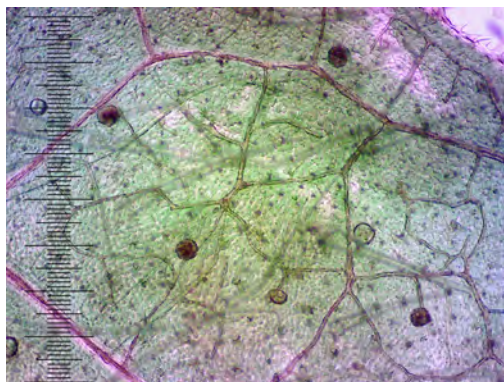


Figure 4 – Microscopic preparation of adaxial epidermis of *Melissa officinalis* L. leaf blade (mag. 4×, 10×)

Secretory trichomes have a more thickened cuticular covering, than the epidermis, and are located predominantly on the abaxial side of the leaf and along the main vein. Experimental studies have shown, that on 1 mm²

of the abaxial side of the leaf blade there are 200–400 stomata, up to 80–100 simple unicellular conical, non-branching hairs, 10–12 essential oil glands at the distance of 100–150 mcm from each other.

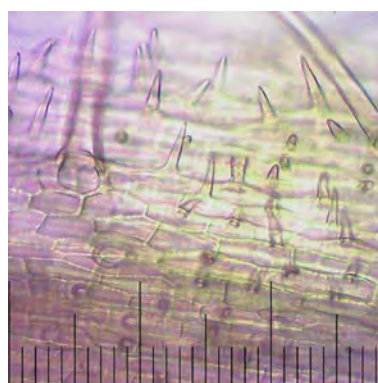
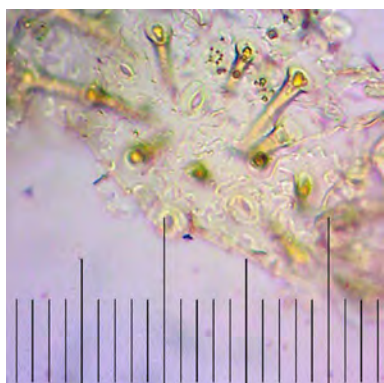
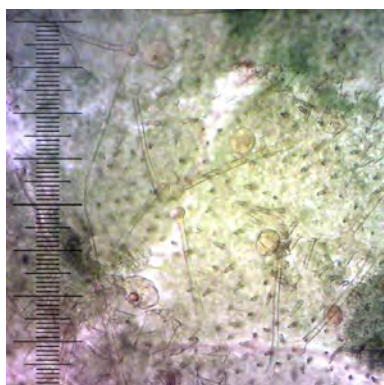


Figure 5 – Microscopic preparation of the abaxial epidermis of the *Melissa officinalis* L. leaf blade (mag. 4×, 10×)

Calyx epidermal cells are different in shape, characterized by winding walls without thickening, at the base of the calyx and along the edge there is a folded cuticle, a stomatic apparatus is of diacytic type, the stomata are rare or absent (Fig. 6). Fig. 6 shows the conical unicellu-

lar hairs of the calyx, multicellular conical hairs, consisting of 2–4 cells with thickened walls, essential oil glands radial, capitate hairs with one basal cell (Type II). At the bottom of the calyx there are vascular bundles, surrounded by porous thick-walled lignified sclerenchymal fibers.

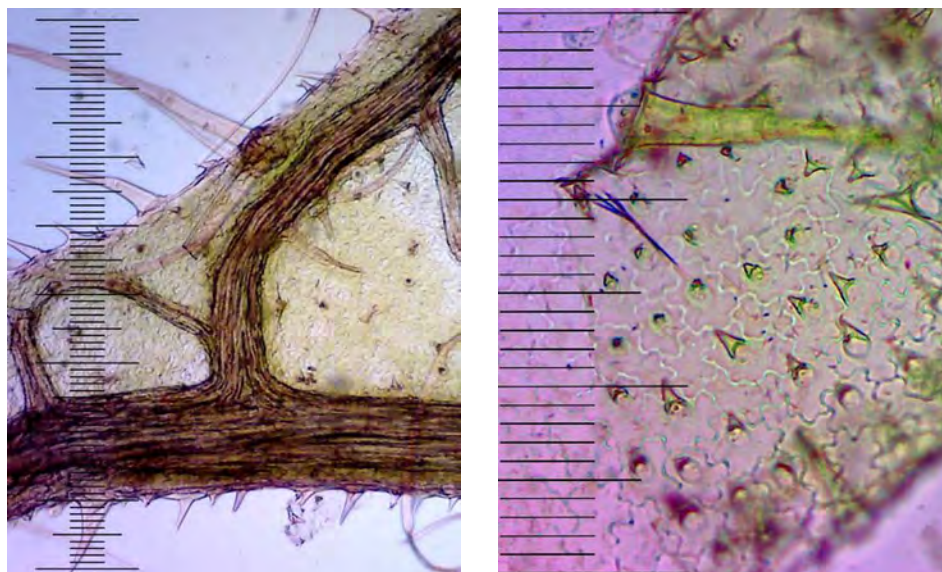


Figure 6 – Microscopic preparation of epidermis of the *Melissa officinalis* L. calyx (mag. 4×, 10×)

The cells of the outer corolla epidermis are of a rectangular shape, are characterized by winding walls with thickening, at the base and on the edge there is a folded cuticle, the char-

acteristic stomata are few. The cells of the inner corolla epidermis are polygonal, sinuous-walled. The corolla base cells are rectangular, with sinuous anticlinal walls (Fig. 7).

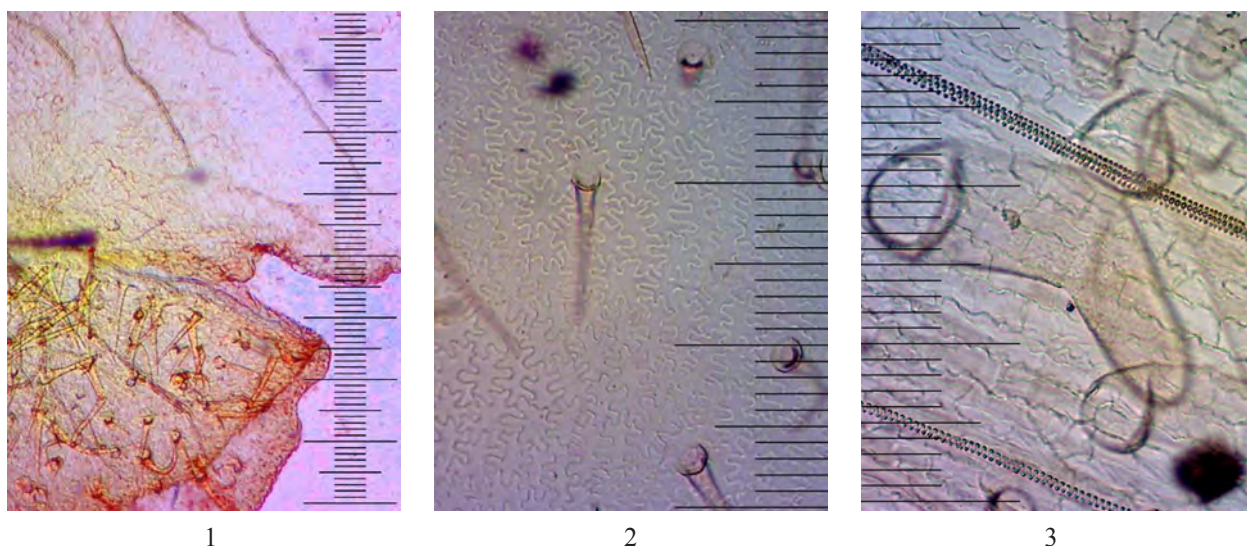


Figure 7 – Microscopic preparation epidermis of the *Melissa officinalis* L. corolla (mag. 4×, 10×)
1 – preparation from the surface of the corolla edge; 2 – cells of the outer corolla epidermis;
3 – cells of the base of the corolla with fingerlike hairs

On the both sides, the corolla epidermis is covered with a large number of long, simple, multicellular hairs with a pimpled cuticle and simple unicellular conical

hairs. Essential oil glands and capitate hairs are present on the inner side of the corolla. Fingerlike hairs with a pimpled cuticle are characteristic for the corolla (Fig. 8).

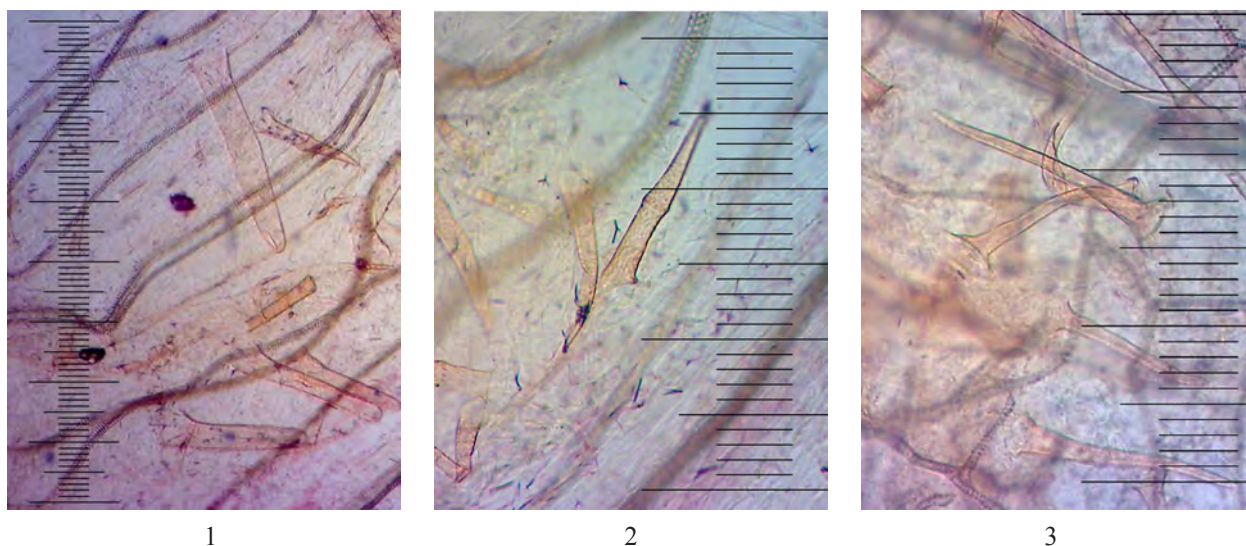


Figure 8 – Trichomes of the epidermis of the *Melissa officinalis* L. corolla (mag. 4× 10)
 1 – fingerlike hairs of the corolla edge; 2 – simple multicellular hairs with a pimpled cuticle;
 3 – simple unicellular conical, nonbranching hairs

Corolla edge epidermis cells are polygonal with weakly sinuous walls with thickenings, tiled,

there are fingerlike hairs with a pimpled cuticle (Fig. 9).

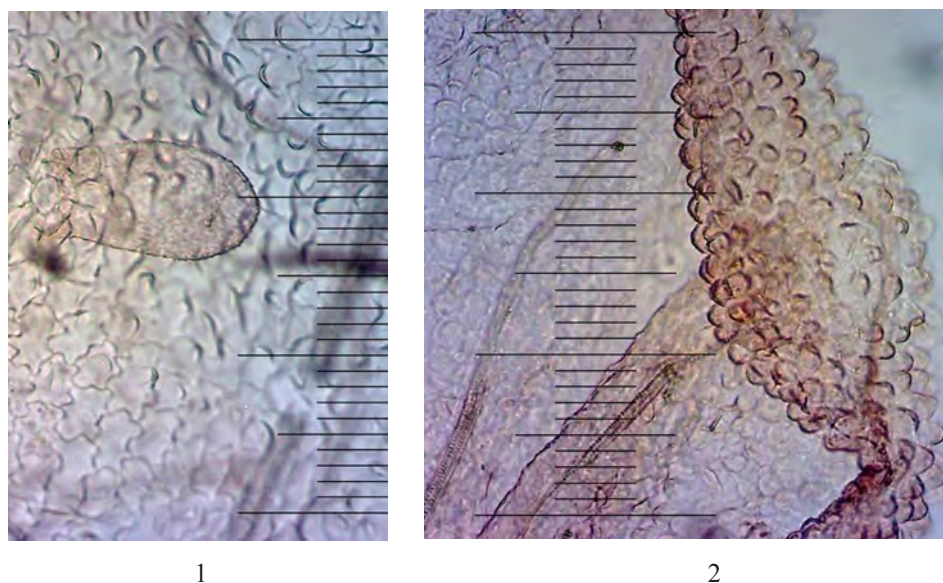


Figure 9 – Microscopic preparation of the *Melissa officinalis* L. corolla (mag. 4×, 10×)
 1 – cells of the upper part of the corolla epidermis and fingerlike hairs with a pimpled cuticle;
 2 – corolla edge epidermis cells

The stem epidermis is represented by small polygonal elongated cells with straight walls. The stomatic apparatus is diacytic, the stomatic cleft is oriented along the stem. Numerous simple and glandular trichomes, located mainly on the ribs of the stem have been diag-

nosed. A lot of simple, large multicellular hairs (Type I) with a smooth cuticle and unicellular conical hairs (Type II) are present. In the upper part of the stem there are capitate hairs of Type II and rare essential oil glands (Fig. 10).

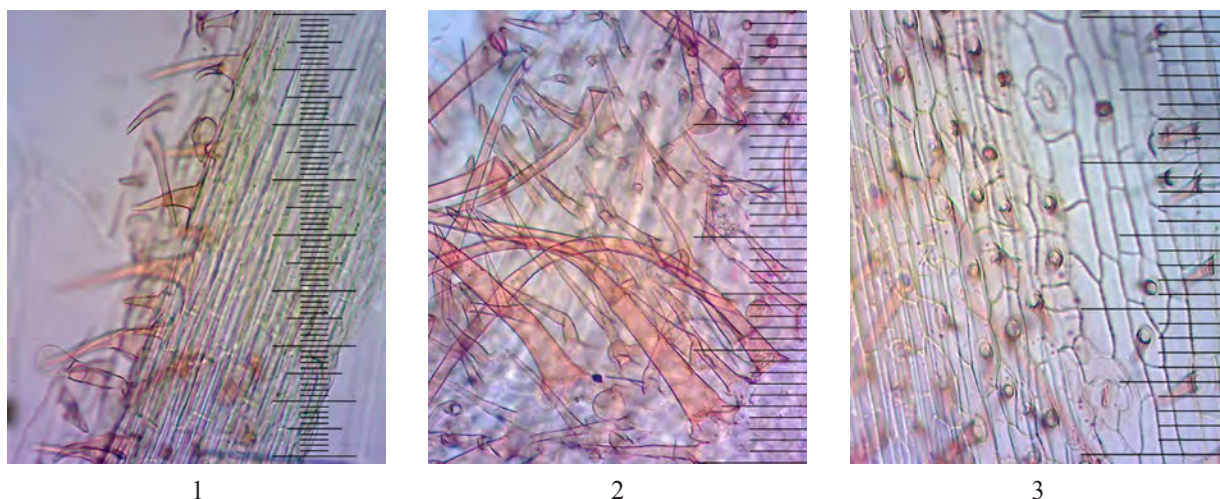


Figure 10 – Microscopic preparation of the *Melissa officinalis* L. stem (mag. 4×, 10×)

1 – preparation from the surface; 2 – trichomes of the stem epidermis;

3 – cells and stomatic apparatus of the stem epidermis

The stem cross section is quadrangular. The epidermis is covered with a thin cuticle. The epidermis cells are oval, square or rectangular arranged in a single layer. Under the epidermis in the ribs of the stem there are 4–8 layers of cells of the angular collenchyma, locally there are 2–3 layers of chlorenchyma cells. Endoderm cells are oval, arranged in a single layer, containing starch grains. The cortex consists of 4–10 layers of parenchymal cells shaped irregularly oval or rectangular, with an intercellular space; the cells of the pericyclic sclerenchyma are partially represented. Bast fibers of phloem, cambium cells, vessels and xylem tracheids do not form conductive bundles. Cambium consists of 1–2 layers of cells, not clearly expressed. The stem cells are represented by a functioning parenchyma; they are large polygonal or round, centrifugally decreasing in size (Fig. 11). The cross section of the leaf blade shows that the upper and lower epidermis is covered with a thin layer of a cuticle. The thickness of both epidermis cuticles is almost equal. A large number of simple conical hairs are located on the upper and lower sides

of the epidermis, there are more glandular hairs on the abaxial epidermis, especially along the veins. The epidermis cells are arranged in a single layer, shaped oval, round or rectangular. The cells of the upper epidermis are larger than those of the lower epidermis or almost equal to them. The leaf mesophyll consists of one layer of elongated rectangular cells of the palisade parenchyma and 2–4 layers of isodiametric spongy parenchyma cells with large intercellular spaces. The results of cell measurements are shown in Table 1 (Fig. 11). The cross section of the petiole shows that the adaxial surface is concave and the abaxial surface is convex. On both sides there are simple and glandular trichomes. The epidermis consists of 1–2 layers of oval, round or rectangular cells. The parenchyma cells are large hexagonal or round, reaching 30 mcm in diameter. In the center there is a large arcuate collateral conducting bundle, there are two small collateral bundles in the wings of the stem. On the adaxial surface in the wings of the petiole there is a collenchyme of 2–3 layers of cells and 1–2 layers of chlorenchyma cells locally (Fig. 11).

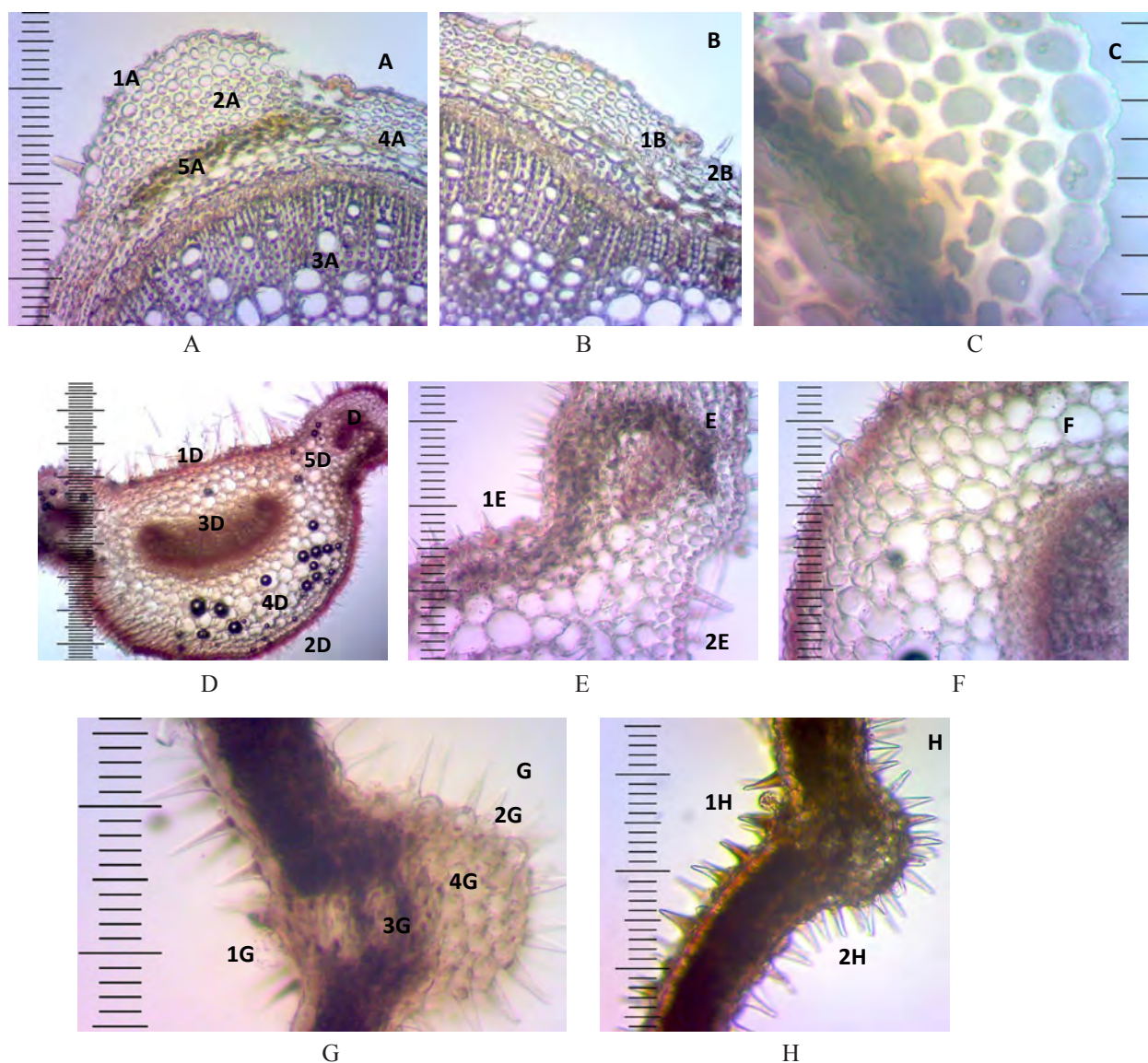


Figure 11 – Microscopic preparations of the *Melissa officinalis* L. cross sections of the stem, petiole and leaf
 A, B (mag. $\times 10$), C (mag. $\times 40$) – stem cross section: 1A – epidermis; 2A – collenchyma; 3A – conductive vessel; 4A – the parenchyma of the cortex; 5A – chlorenchyma. 1B – stomatic apparatus; 2B – simple hair. D (mag. $\times 4$), E, F (mag. $\times 10$) – cross section of the stem: 1D – adaxial epidermis, 2D – abaxial epidermis, 3D – central conducting bundle, 4D – parenchyma, 5D – lateral additional conductive vessel, 1E – simple unicellular conical, nonbranching hairs, 2E – capitate hairs. G, H (mag. $\times 10$) – leaf cross section: 1G – adaxial epidermis, 2G – abaxial epidermis, 3G – conductive vessel, 4G – parenchyma; 1H – capitate hairs, 2H – simple hairs
 Scale division = 10 mcm

In the preparations of the melissa herb powder, the scraps of leaf, stem, corolla and calyx epidermis with characteristic trichomes, pollen grains have been identi-

fied. The pollen grains are spherical with slightly warty exine and pores (Fig. 12).

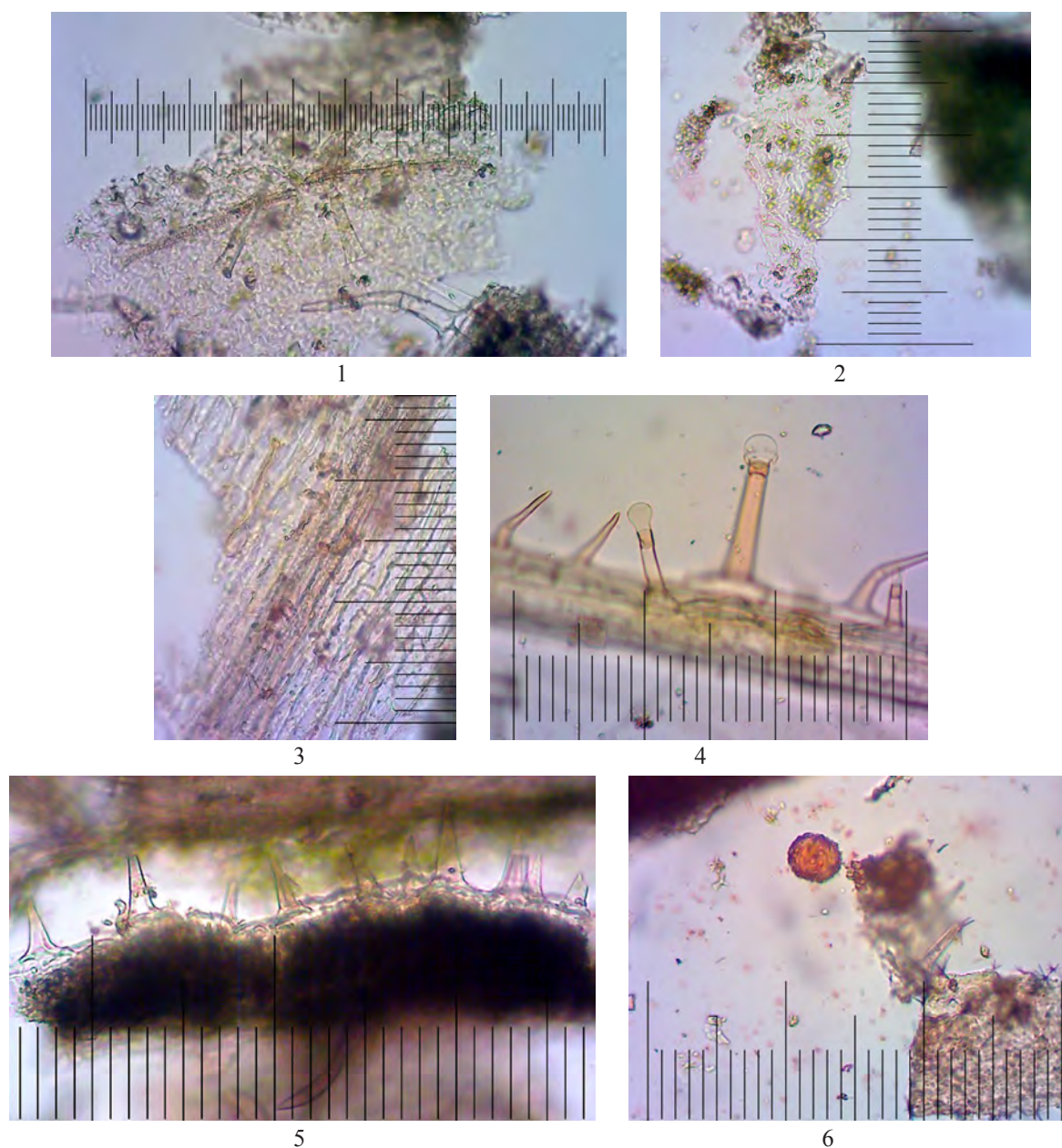


Figure 12 – Microscopic preparation of the *Melissa officinalis* L. herb powder (mag. 4×, 10×)
1 – fragment of leaf epidermis; 2 – fragment of calyx epidermis; 3 – fragment of stem epidermis; 4 – secretory trichomes; 5 – simple unicellular conical hairs; 6 – pollen grains. Scale division = 10 mcm

Tables 1 and 2 show the results of the experimental studies of the biometric characteristics of the main microscopic signs of the aerial part of *M. officinalis* L. se-

lection variety sample in NBG-NSC and the location of trichomes on the aerial organs of the plant.

Table 1 – Quantitative and anatomical parameters of the herb of *Melissa officinalis* L. selection variety sample in NBG-NSC

Microscopic structure	Dimension, mcm	
	Length, mcm	Width, mcm
<i>Cells of the upper leaf epidermis</i>	60–70	50–60
<i>Cells of the lower leaf epidermis</i>	40–50	30–40
<i>Calyx epidermis cells</i>	50–60	30–40
<i>Corolla epidermis cells</i>	60–70	20–40
<i>Stem epidermis cells</i>	50–60	10–20
<i>Length of simple multicellular hairs (Type I)</i>	100–400	
<i>Length of capitate hairs</i>		
1. Type I	1 – 30–50,	
2. Type II	2 – 60–300	

Microscopic structure	Dimension, mcm	
	Length, mcm	Width, mcm
Length of simple unicellular conical hairs (Type II)	20–50	
Length of fingerlike hairs of corolla epidermis (Type III)	100–250	
The number of essential oil glands per 1 mm ² , pcs.	10–12	
Diameter of the glands	40–80	
Diameter of the stomatic apparatus, mcm	20	
The number of stomatic apparatus per 1 mm ² of the lower epidermis, pcs.	200–400	
Leaf blade thickness, mcm	50–70	
Adaxial epidermis thickness, mcm	7–10	
Abaxial epidermis thickness, mcm	10–15	

Table 2 – Distribution of glandular hairs, glands, simple hairs and epidermis outgrowth on the aerial part of the *Melissa officinalis* L. selection variety sample in NBG-NSC

Part of the plant	Glandular hairs, Type I/II	Glands	Simple hairs, Type I/II
Stem	+	+	++
Adaxial leaf blade	–	+	++
Abaxial leaf blade	+++	+++	+++
Petiole	+	–	+++
Calyx	+	+	++
Corolla	+	–	++

Notation: (–) trichomes are absent, (+); not many trichomes, (++, +++) a lot of trichomes

The use of histochemical tests showed a characteristic staining of tissues and trichomes, which is the result of the interaction of the reagents with the detected components and

leads to their specific binding [22–31]. The results of the detection of secondary metabolites in trichomes and tissues of the *Melissa officinalis* L. aerial part are presented in Table 3.

Table 3 – Histochemistry of tissues and glandular trichomes of the *Melissa officinalis* L. aerial part

Defined component	Reagent	Coloring	Trichome type		
			simple	glandular	gland
Lipids, suberin, cutin	Sudan III	Red	+ (Fig. 13A)	+ (Fig. 13B, B1)	+ (Fig. 13C)
Essential oil	Sudan III	Orange red	–	+ (Fig. 13B, B1)	+ (Fig. 13C)
Essential oil	Methylene blue	Blue	–	+ (Fig. 13EF)	+ (Fig. 13G)
Terpenoids	2,4-Dinitrophenylhydrazine	Black and blue	+ (Fig. 13M)	+ (Fig. 13N)	+ (Fig. 13O)
Sesquiterpenes	c. H ₂ SO ₄	Yellow	–	–	–
Flavonoids	Vanillin, HCl c.	Yellow Red	+ (Fig. 13H)	–	+ (Fig. 13I)
Flavonoids	Magnesium acetate	Yellow	+ (Fig. 13P)	+ (Fig. 13P)	–
Phenolic compounds	10% Potassium dichromat	Yellow	+ (Fig. 13S)	+ (Fig. 13Q)	+ (Fig. 13R)
Phenolic compounds	Ferric chloride (III)	Brown, green and black	+ (Fig. 13K)	+ (Fig. 13J)	–
Alkaloids	Wagner's reagent	Black	–	–	–
Lignin	Phloroglucinol, HCl c.	Red purple	–	–	–
Polysaccharide (inulin)	10% thymol H ₂ SO ₄ c.	Orange red	+ (Fig. 13UV)	–	–

Notation: – negative reaction; + positive reaction

Several methods of staining were used for histochemical analysis of the secreting material. To confirm the presence of hydrophobic metabolites of lipids and essential oil, the preparations were stained with Sudan III. The cuticle of the stem epidermis, the cuticle of the pedicle and the intracellular contents of the head of the

glandular hairs, the cuticle of simple hairs, as well as the intracellular contents of the essential oil glands were detected as painted orange-pink (Fig. 13A–D).

A solution of methylene blue in ethanol was used to identify essential oils [22, 24]. The micropreparation of the leaf was stained with a solution of methylene blue

and observed: the contents of the essential oil glands and glandular hairs were getting blue (Fig. 13 E, F, G). The

obtained result indicates the presence of essential oil in these structures.

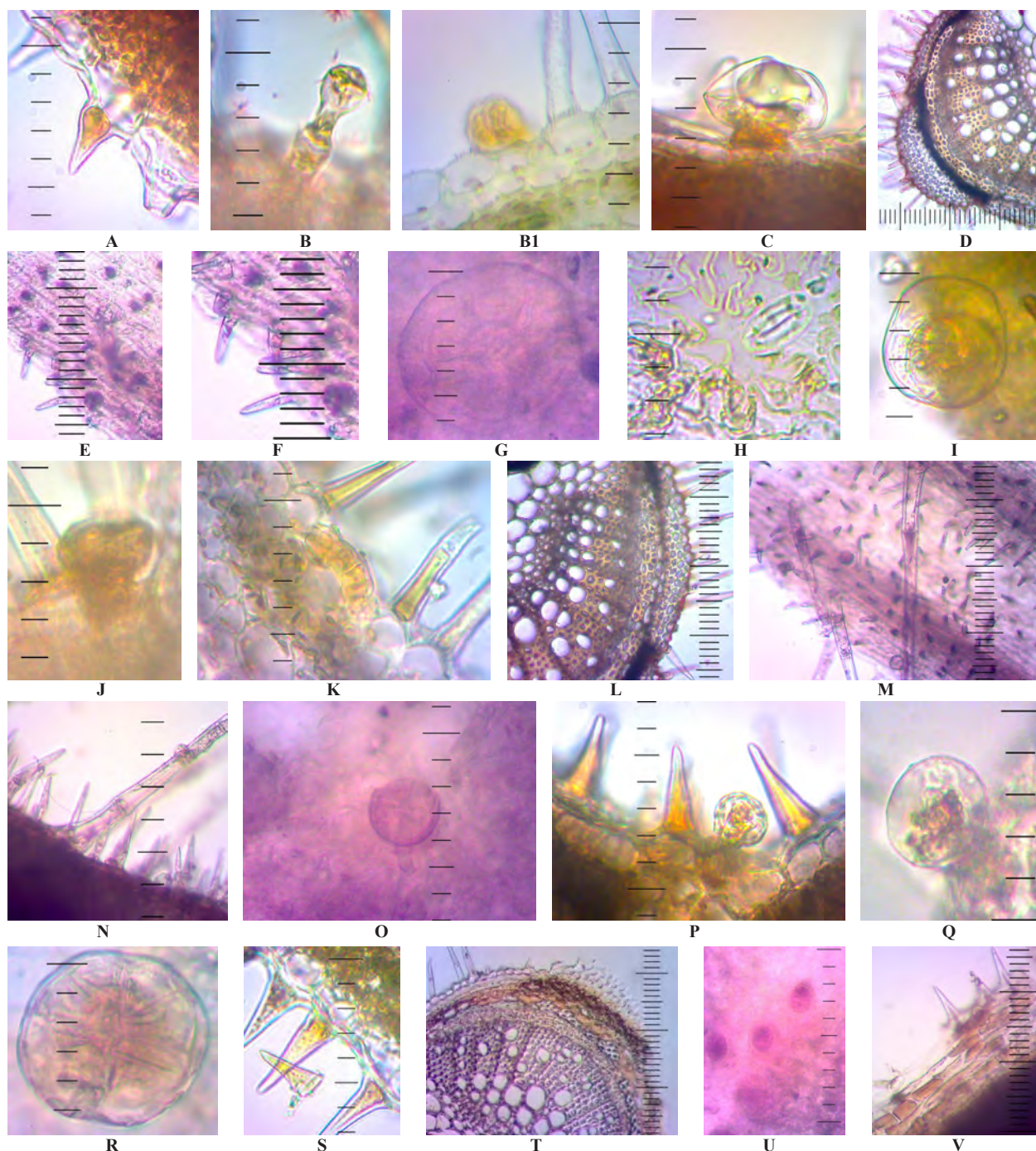


Figure 13 – The results of histochemical reaction

with Sudan III: A–C trichomes (mag. $\times 40$); D – cross section of the stem (mag. $\times 10$); with methylene blue: E, F (mag. $\times 10$), G (mag. $\times 40$) – trichomes; with vanillin and HCl c.: H, I – epidermis of the stem, essential oil glands (mag. $\times 40$); with ferric chloride (III): J, K – trichomes (mag. $\times 40$), L – cross section of the stem (mag. $\times 10$); with 2,4-dinitrophenylhydrazine: M – trichomes (mag. $\times 10$), N, O (mag. $\times 40$); with magnesium acetate: P – trichomes (mag. $\times 40$); with potassium dichromat: Q, R, S – trichomes (mag. $\times 40$); with phloroglucinol with HCl c.: T – cross section of the stem (mag. $\times 10$); with 10% thymol and H_2SO_4 c.: U – trichomes (mag. $\times 40$), V (mag. $\times 10$)

Processing of the leaf microscopic preparations with concentrated sulfuric acid showed that the trichomes and leaf tissues do not get stained yellow-orange, which implies the absence of sesquiterpenes, triterpenes and steroid compounds in the raw material under study. Cross sections of the stem and leaf were stained with a 1% solution of ferric chloride (III). Black and green staining was observed

over the entire surface of the preparations, which also indicates the presence of phenolic compounds (Fig. 13 J, K, L). When adding a solution of vanillin and HCl c., flavonoid secreting tissues turn yellow (Fig. 13 H, I). Wagner's reagent for the detection of alkaloids did not give an analytical effect. The plant material was placed in a 10% alcohol solution of potassium dichromat for 7 days, after that it

was microscoped. Phenolic compounds were detected by trichome cell staining (Fig. 13 Q, R, S). To establish the presence of terpenoids, reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine was carried out (Fig. 13 M, N, O); hereby, the cell walls of simple trichomes and the contents of the glands turned black and blue. When treated with a magnesium acetate solution, the cell contents, of the simple and capitate trichomes turned yellow-orange which demonstrates the accumulation of flavonoids (Fig. 13 P).

The presence of lignin was determined by the reaction with phloroglucinol and concentrated hydrochloric acid, and the pink-orange color of the pericyclic sclerenchyma cells was observed on the stem cross section (Fig. 13 T). The result of the histochemical reaction with a 10% solution of thymol and H_2SO_4 c. showed the presence of polysaccharide in the stem epidermis cells (Fig. 13 U,V) and in the cellular contents of simple conical hairs.

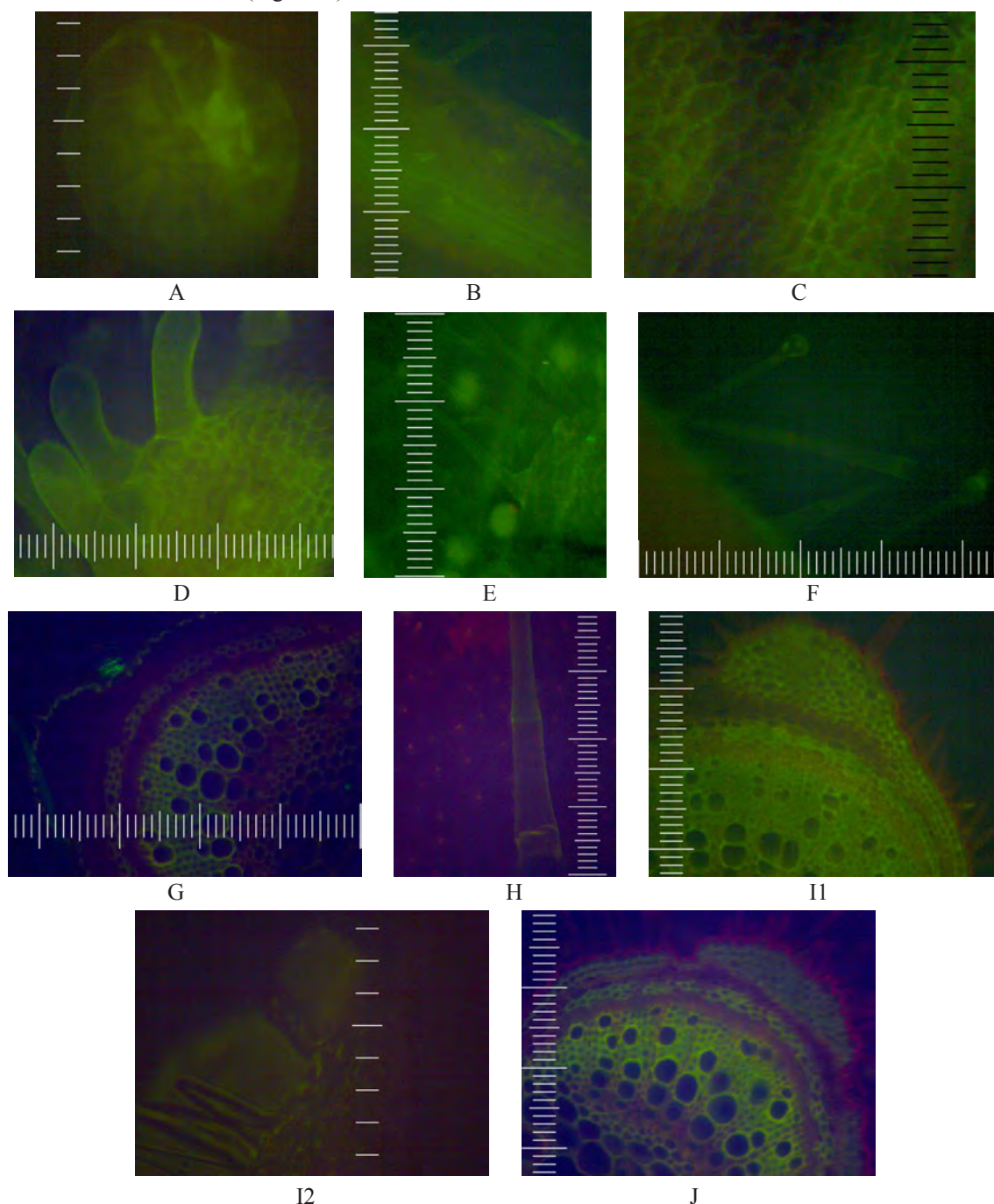


Figure 14 – Fluorescence of *Melissa officinalis* L. secretory structures

A – essential oil glands of the leaf (mag. $\times 40$), UV light (UV – 2A); B – epidermis of the leaf, simple unicellular conical hairs (mag. $\times 10$), UV light (UV – 2A); C – corolla epidermis cells (mag. $\times 10$), UV light (UV – 2A); D – fingerlike hairs of the corolla (mag. $\times 10$), UV light (UV – 2A); E – simple multicellular hairs, capitate hairs type I (mag. $\times 10$), UV light (UV – 2A); F – capitate hairs with a multicellular leg and a funnel-shaped head type II (mag. $\times 10$), UV light (UV – 2A); G – cross section of the stem (mag. $\times 10$), Green (G-2A); H – leaf epidermis (mag. $\times 10$) Green (G-2A) I – stem cross section, AlCl_3 , (mag. $\times 10$), UV I2 – simple conical hairs, AlCl_3 , (mag. $\times 40$), UV; J – stem cross section, FeCl_3 , (mag. $\times 10$), UV

Table 4 shows the results of microscopic examination of the tissues and trichomes of *Melissa officinalis* L. with different UV identification. Trichomes and cuticle, emitting bright green autofluorescence in UV light, demonstrate the presence of hydrophobic substances of suberin and cutin (Fig. 14 A–F) [30, 31]. In glandular trichomes, bright yellow autofluorescence of lipophilic and hydrophilic intracellular contents was observed, the leaf mesophyll glowed with yellowish-green light. Weak yellow autofluorescence was observed in the intracellu-

lar contents of the glandular head, glandular trichomes of both types and the cuticle of simple hairs (Fig. 14 A, B, E), which indicated the presence of phenolic compounds.

Bright red autofluorescence in UV light is observed in leaf mesophyll cells, which may be due to the presence of chlorophyll (Fig. 14 B, F). On the stem cross-section in UV light (light filter Green (G-2A)) endoderm cells, phloem and stem parenchyma were getting a red glow due to the presence of phenolic substances (Fig. G, H).

Table 4 – Fluorescence color features of unpainted and painted plant tissue of *Melissa officinalis* L. with different UV-identification

Reagent	Light source	Fluorescence color	Biologically active substances	Result
Unpainted tissues	UV light (UV-2A)	Bright blue-whitish	Lignin or phenols	–
		Yellowish to brownish	Condensed tannins	+
		Bright green	Lipids	+
	Green (G-2A)	Bright red	Phenols	+
Ferric chloride (III)	UV light (UV-2A)	Red	Polyphenolic compounds	+
AlCl ₃	UV light (UV-2A)	Blue, green	Flavonoids	+
Lead acetate	UV light (UV-2A)	Blue	Flavonoids	N.d.

Notation: – negative reaction; + positive reaction; n.d. – not detected

Staining the preparation of the stem cross-section and the surface preparation of the leaf with AlCl₃ showed the presence of green fluorescence in the cells of collenchyma, endoderm and xylem of the stem and intracellular contents of simple conical hairs of Type II in UV light (UV-2A) (Fig. 11, 12), which indicated the presence of flavonoid substances. Coloring the stem cross section with ferric chloride (III) showed bright red fluorescence in UV light (UV-2A), which indicated the localization of polyphenolic compounds in the cells of chlorenchyma, phloem and xylem (Fig. 14J). The results obtained are consistent with the literature data on secondary metabolites. Thus, phenolic compounds (flavonoids and phenol carboxylic acids) were found in the aerial part of *M. officinalis* L. [10, 12, 15]. In addition, M. Chwil et al. discovered terpene compounds and polyphenols in both types of trichomes in *M. officinalis* L. by histochemical methods [30].

Histochemical reagent Sudan III showed that the cell walls of the epidermis, the essential oil glands, covering and capitate trichomes of the leaves, calyx, corolla and stem, stem tissue turned orange-yellow, which indicates the presence of hydrophobic metabolites in them, the essential oil and lipids are identified in the essential oil glands and glandular hairs. Phenolic compounds are found in the collenchyma around the conductive leaf bundles, in the cells of the phloem and xylem. Alkaloids in the tissues and trichomes of the aerial part of melissa have not been detected histochemically. Terpene compounds and polyphenols are found in both types of glandular trichomes and simple hairs of *M. officinalis*.

CONCLUSION. As a result of the study conducted, the aerial part of the *M. officinalis* selection variety sam-

ple from the NBG-NSC collection confirmed the presence of morphological and microscopic signs that are diagnostically important for this type, and have been found to be consistent with the literature description of this type of raw materials. For the first time, a morphometric analysis of the raw materials has been carried out, the shape and size of epidermal cells of the leaf, stem, calyx and corolla, the nature and frequency of the location of the epidermal trichomes of the analyzed specimen have been determined, which complements the anatomical characteristic the aerial part of *M. officinalis* L. For the first time the presence and localization of lipids, polysaccharides, phenolic compounds, flavonoids, essential oil components and terpenoids in the tissues and trichomes of raw materials have been established histochemically. Thus, the contents of the glands and glandular hairs are rich in hydrophilic and hydrophobic compounds, to a lesser extent in simple non-glandic covering trichomes. All trichomes carry out the secretion of essential oil components, which has been confirmed by histochemical tests.

For the first time, anatomical structures have been identified being the sites of localization and involved in the secretion of certain types of biologically active substances. For the first time fluorescence microscopy has been used to analyze the presence of lipids, chlorophyll, polysaccharides, flavonoids, and phenolic compounds in trichomes and melissa tissues. It is important to note the availability, simplicity and capacity of the histochemical method of the raw materials analysis, the prospects of its use in identifying medicinal plant materials and determining the nature and localization of the secretion of biologically active substances.

Библиографический список

1. Марко Н.В., Хлыпенко Л.А., Логвиненко Л.А., Работягов В.Д. Генофондовая коллекция ароматических и лекарственных растений Никитского ботанического сада / Роль ботанических садов в сохранении и мониторинге биоразнообразия: сб. науч. тр. – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 226–229.
2. Исигов В.П., Работягов В.Д., Хлыпенко Л.А., Логвиненко И.Е., Логвиненко Л.А., Кутько С.П., Бакова Н.Н., Марко Н.В. Интродукция и селекция ароматических и лекарственных культур. Методологические и методические аспекты. – Ялта: НБС–ННЦ, 2009. – 110 с.
3. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Т. 6. Семейства Hippuridaceae – Lobelaceae. – Наука, 1991. – 200 с.
4. Shakeri A., Sahebkar A., Javadi B. *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology // J Ethnopharmacol. – 2016. – Т. 184. – С. 204–228. DOI:10.1016/j.jep.2016.05.010.
5. Moradkhani H., Sargsyan E., Bibak H., Naseri B., Sadat-Hosseini M., Fayazi-Barjin A., Meftahizade H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: a review // Journal of Medicinal Plants Research. – 2010. Т. 4, №25. – С. 2753–2759.
6. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е. В., Болтабекова З.В. Качественный и количественный анализ сырья и настойки Melissa // Растительные ресурсы. – 1999. – Т. 35, №3. – С. 116–120.
7. Heitz A., Carnat A., Fraisse D., Carnat A.P., Lamaison J.L. Luteolin 3'-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* // Fitoterapia. – 2000. – Т. 71, №2. – С. 201–202. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00118-5).
8. Mencherini T., Picerno P., Scesa C., Aquino R. Triterpene, antioxidant and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis* // J Nat Prod. – 2007. – Т. 70, №12. – С. 1889–1894. DOI: 10.1021/np070351s.
9. Abdellatif F., Boudjella H., Zitouni A., Hassani A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. // EXCLI J. – 2014, №13. – С. 772–781.
10. Кулагин О.Л., Куркин В.А., Додонов Н.С., Царёва А.А., Авдеева Е.В., Куркина А.В., Дремова Е.А., Сатдарова Ф.Ш. Антиоксидантная активность некоторых фитопрепаратов, содержащих флавоноиды и фенилпропаноиды // Фармация. – 2007, № 2. – С. 30–32.
11. Зузук Б.М., Куцик Р.В. Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.). Аналитический обзор // Провизор. – 2002, №1. – Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2002/N1/art_36.php.
12. Проект ФС «Мелиссы лекарственной трава» (взамен ФС 42-3645-98): мат. по проектам общ. фармакоп. статей и фармакоп. статей. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/61/11/materially-po-farmakopee>.
13. Taiwo A.E., Leite F.B., Lucena G.M., Barros M., Silveira D., Silva M., Ferreira V. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender // Indian J Pharmacol. – 2012. – Т. 44, №2. – С.189–192. DOI: 10.4103/0253-7613.93846.
14. Feliu-Hemmelmann K., Monsalve F., Rivera C. *Melissa officinalis* and *Passiflora caerulea* infusion as physiological stress decreaser // Int J Clin Exp Med. – 2013. – Т. 6, №6. – С. 444–451.
15. Куркин В.А., Мазур Л.И. Алексеева А.В., Авдеева Е.В. Мелисса лекарственная: перспективы использования в педиатрии: монография. – Самара: Офорт, 2010. – 164 с.
16. Морохина С.Л., Бобкова Н.В., Сорокина А.А. Морфолого-анатомическое изучение нового успокоительного сбора // Фармация. – 2012, №3. – С. 21–24.
17. Luno V., Gil L., Olaciregui M., Jerez R.A., de Blas I., Hozbor F. Antioxidant effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) and mate tea (*Ilex paraguensis*) on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa // Andrologia. – 2014. – Т. 47, №9. – Р. 1004–1011. DOI: 10.1111/and.12370.
18. Логвиненко Л.А., Хлыпенко Л.А., Марко Н.В. Ароматические растения семейства Lamiaceae для фитотерапии // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4, №4. – С. 34–47. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-4-34-47.
19. Weidner C., Rousseau M., Plauth A., Wowro S.J., Fischer C., Abdel-Aziz H., Sauer S. *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species // Phytomedicine. – 2015. – Т. 22, №2. – С. 262–270. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.12.008.
20. ОФС 1.5.3.0003.15. Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. Государственная фармакопея РФ. 13-е издание, т. 2, Москва, 2015. – Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#379/z (дата обращения 01.03.2016).
21. ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы» Государственная фармакопея РФ. 13-е издание, т. 2, Москва, 2015. – Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#272 (дата обращения 01.03.2016).
22. Федосеева Л.М., Кнауф Н.Н., Селигеева Т.Г. Гистохимический анализ листьев и корней лопуха большого (*Arctium lappa* L.), произрастающего на территории Алтайского края // Химия растительного сырья. – 2004, №1. – С. 61–64.
23. Разаренова К.Н., Бабушкина Е.В., Смирнов П.Д., Костина О.В., Муравник Л.Е. Гистохимия трихом официнальных представителей семейства Lamiaceae // Медицинский альманах. – 2017, № 3. – С. 193–198. DOI: <http://dx.doi.org/10.21145/2499-9954-2017-3-193-198>.
24. Селиванов Е.В. Красители в биологии и медицине. Справочник. – Барнаул: Азбука, 2003. – 40 с.
25. Chwil M., Nurzynska-Wierdak R., Chwil S., Matraszek R., Neugebauerova J. Histochemistry and micromorphological diversity of glandular trichomes in *Melissa officinalis* L. leaf epidermis // Acta Sci Pol Hortorum Cultus. – 2016. – Т. 15, №3. – С. 153–172.

26. Hassan E.A., El-Awadi M.E.. Brief review on the application of histochemical methods in different aspects of plant research // Nat Sci. – 2013. – Т. 11, №12. – С. 54–67.
27. Liu M.Q., Liu J.F. Structure and histochemistry of the glandular trichomes on the leaves of *Isodon rubescens* (Lamiaceae) // African Journal of Biotechnology. – 2012. – Т. 11, №17. – С. 4069–4078. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.4024>.
28. Самылина И.А., Аносова О.Г. Ермакова В.А., Бобкова Н.В., Фармакогнозия. Атлас. Учебное пособие: в 3-х т. – Т. 3. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 488 с.
29. Jia P., Gao T, Xin X. Changes in structure and histochemistry of glandular trichomes of *Thymus quinquecostatus* Celak // The Scientific World Journal – 2012. – Т. 2012. – С. 1–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1100/2012/187261>.
30. Chwil M.; Nurzyńska-Wierdak R.; Chwil S.; Matraszek R.; Neugebauerová J. Histochemistry and micromorphological diversity of glandular trichomes in *Melissa officinalis* L. leaf epidermis // Acta Sci Pol Hortorum Cultus. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 153–172.
31. Marin M, Budimir S, Janošević D, Marin PD, Duletić-Laušević S, Ljaljević-Grbić M. Morphology, distribution, and histochemistry of trichomes of *Thymus lycae* Degen & Jav. (Lamiaceae) // Arch Biol Sci, Belgrade. – 2008. – Т. 60, №4. – С. 667–672. DOI: <http://dx.doi.org/10.2298/ABS0804667M>.

References

1. Marko NV, Khlypenko LA, Logvinenko LA, Rabotyagov VD. Genofondovaya kolleksiya aromaticeskikh i lekarstvennykh rasteniy Nikitskogo botanicheskogo sada. [Gene stock collection of aromatic and medicinal plants of the Nikitsky Botanical Garden]. Rol botanicheskikh sadov v sokhranении i monitoringe bioraznoobraziya: sb. nauch. tr. Rostov-na-Donu. 2015:226–9. Russian.
2. Isikov VP, Rabotyagov VD, Khlypenko LA, Logvinenko IE, Logvinenko LA, Kutko SP, Bakova NN, Marko NV. Introduktsiya i selektsiya aromaticeskikh i lekarstvennykh kultur. Metodologicheskiye i metodicheskiye aspekty. [Introduction and selection of aromatic and medicinal cultures. Methodological and methodological aspects]. Russia: NBS–NSC. 2009:110. Russian.
3. Rastitelnyye resursy SSSR. Tsvetkovyye rasteniya. ikh khimicheskiy sostav. ispolzovaniye. Semeystva Hippuridaceae – Lobelaceae. [Plant resources of the USSR. Flowering plants, their chemical composition, use. V. 2. Hippuridaceae families – Lobelaceae]. Russia: Science. 1991:200. Russian.
4. Shakeri A, Amirhossein Sahebkar, Behjat Javadi. *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J Ethnopharmacol. 2016;188:204–28. DOI:10.1016/j.jep.2016.05.010.
5. Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A, Meftahizade H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: a review. Journal of Medicinal Plants Research. 2010;4(25): 2753–59.
6. Kurkin VA, Zapesochaynaya GG, Avdeyeva EV, Boltabekova ZV. Kachestvennyy i kolichestvennyy analiz syria i nastoyki melissy [Qualitative and quantitative analysis of raw materials and tinctures of lemon balm]. Rastitelnye resursy. 1999; 35(3):116–120. Russian.
7. Heitz A, Carnat A, Fraisse D, Carnat AP, Lamaison JL. Luteolin 3'-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. Fitoterapia. 2000; 71(2):201–2. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00118-5).
8. Mencherini T, Picerno P, Scesa C, Aquino R. Triterpene, antioxidant and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. J Nat Prod. 2007;70(12):1889–94. DOI: 10.1021/np070351s.
9. Abdellatif F, Boudjella H, Zitouni A, Hassani A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. EXCLI J. 2014;13:772–81.
10. Kulagin OL, Kurkin VA, Dodonov NS, Tsareva AA, Avdeyeva YeV, Kurkina AV, Dremova YeA, Satdarova FSh. Antioksidantnaya aktivnost nekotorykh fitopreparatov. soderzhashchikh flavonoidy i fenilpropanoidy [Antioxidative activity of some phytopreparations containing flavonoids and phenylpropanoids]. Pharmacy. 2007;2:30–32. Russian.
11. Zuzuk BM, Kutsik RV. *Melissa* lekarstvennaya [*Melissa officinalis* (*Melissa officinalis* L.). Analytical review]. Pharmacist. 2002;1. – Available at: http://www.provisor.com.ua/archive/2002/N1/art_36.php. (accessed 01.03.2016). Russian.
12. Projekt FS “Melissy lekarstvennoy trava” (vzamen FS 42-3645-98). Materialy po proyektam obshchikh farmakopeynykh statey i farmakopeynykh statey [Project pharmacopoeial monograph “*Melissa* medicinal herb” (instead of PhM 42-3645-98). Materials on projects of general pharmacopoeial articles and pharmacopoeial articles]. Available at: <https://www.rosminzdrav.ru/61/11/materialy-po-farmakopee>. Russian.
13. Taiwo AE, Leite FB, Lucena GM, Barros M, Silveira D, Silva M, Ferreira V. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender. Indian J Pharmacol. 2012;44(2):189–92. DOI: 10.4103/0253-7613.93846.
14. Feliu-Hemmelmann K, Monsalve F, Rivera C. *Melissa officinalis* and *Passiflora caerulea* infusion as physiological stress decreaser. Int J Clin Exp Med. 2013;6(6):444–51.

15. Kurkin VA, Mazur LI, Alekseyeva AV, Avdeyeva EV. Melissa lekarstvennaya: perspektivy ispolzovaniya v pediatrii [Melissa officinalis: prospects for use in pediatrics: monograph]. Russia, Samara. 2010:164.
16. Morokhina SL, Bobkova NV, Sorokina AA. Morfologo-anatomicheskoye izucheniye novogo uspokoitelnogo sboro [Novel nervine tea: morphological and anatomic investigations]. Pharmacy. 2012;3:21–4.
17. Luno V, Gil L, Olaciregui M, Jerez RA., de Blas I, Hozbor F. Antioxidant effect of lemon balm (Melissa officinalis) and mate tea (Ilex paraguensis) on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa. Andrologia. 2014;47(9):1004–11. DOI: 10.1111/and.12370.
18. Logvinenko LA, Khlypenko LA, Marko NV. Aromatic plant of Lamiaceae family for use in phytotherapy. Pharmacy & Pharmacology. 2016;4(4):34–47. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2016-4-4-34-47/>.
19. Weidner C, Rousseau M, Plauth A, Wowro SJ, Fischer C, Abdel-Aziz H, Sauer S. Melissa officinalis extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. Phytomedicine. 2015;22(2):262–70. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.12.008.
20. OFS 1.5.3.0003.15. Tekhnika mikroskopicheskogo i mikrokhimicheskogo issledovaniya lekarstvennogo rastitelnogo syria i lekarstvennykh rastitelnykh preparatov. Gosudarstvennaya farmakopeya RF [OFS 1.5.3.0003.15. The technique of microscopic and microchemical studies of medicinal plants and medicinal plants. State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. 13th edition, V. 2, Moscow, 2015. – Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#379/z (accessed 01.03.2016).
21. OFS 1.5.1.0002.15 «Travy» Gosudarstvennaya farmakopeya RF [OFS 1.5.1.0002.15 “Herbs” State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. 13th edition, V. 2, Moscow, 2015. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#272 (accessed 01.03.2016).
22. Fedoseyeva LM, Knaub N, Seligeyeva TG. Gistokhimicheskii analiz listyev i korney lopukha bolshogo (Arctium lappa L.). proizrastayushchego na territorii altayskogo kraya [Histochemical analysis of leaves and roots of burdock (Arctium lappa L.) growing on the territory of the Altai Territory]. Chemistry of plant raw materials. 2004;1:61–4.
23. Razarenova KN, Babushkina EV, Smirnov PD, Kostina OV, Muravnik LE. Gistokhimiya trikhom ofitsinalnykh predstaviteley semeystva Lamiaceae [Histochemistry of officinal trichomes representing Lamiaceae family]. Medicinskij al'manah. 2017;3:193–198. DOI: <http://dx.doi.org/10.21145/2499-9954-2017-3-193-198>.
24. Selivanov EV. Krasiteli v biologii i meditsine [Dyes in biology and medicine: Handbook]. Barnaul. 2003. 40 p.
25. Chwil M, Nurzynska-Wierdak R, Chwil S, Matraszek R, Neugebauerova J. Histochemistry and micromorphological diversity of glandular trichomes in Melissa officinalis L. leaf epidermis. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus. 2016;15(3):153–72.
26. Hassan AE, El-Awadi ME. Brief review on the application of histochemical methods in different aspects of plant research. Nat Sci. 2013;11(12):54–67.
27. Liu MQ, Liu JF. Structure and histochemistry of the glandular trichomes on the leaves of Isodon rubescens (Lamiaceae). African Journal of Biotechnology. 2012;11(17):4069–78. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.4024>.
28. Samylin IA, Ermakova VA, Bobkova NV, Anosova OG. Farmakognosiya. Atlas: uchebnoye posobiye: v 3-kh t. [Pharmacognosy. Atlas. Study guide: in 3 vol.]. Moscow: GEOTAR-Media. 2009; V. 3. 488 p.
29. Jia P, Gao T, Xin X. Changes in Structure and Histochemistry of Glandular Trichomes of Thymus quinquecostatus Celak. The Scientific World Journal. 2012;2012:1–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1100/2012/187261>.
30. Chwil M, Nurzyńska-Wierdak R, Chwil S, Matraszek R, Neugebauerová J. Histochemistry and micromorphological diversity of glandular trichomes in Melissa officinalis L. leaf epidermis. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus. 2016;15(3):153–72.
31. Marin M, Budimir S, Janošević D, Marin PD, Duletić-Laušević S, Ljaljević-Grbić M. Morphology, distribution, and histochemistry of trichomes of Thymus lycae Degen & Jav. (Lamiaceae). Arch Biol Sci, Belgrade. 2008;60(4):667–72. DOI: <http://dx.doi.org/10.2298/ABS0804667M>.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Благодарности

Авторы статьи выражают особую благодарность Телицыной Ирине Владимировне, преподавателю кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России за консультативную помощь при подготовке и коррекции исследовательских материалов.

Acknowledgments

The authors express their special gratitude to Telitsyna Irina Vladimirovna, a lecturer of the Department of Pharmacognosy, Botany and Phytopreparation Technology (Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University) for advice on the preparation and correction of research materials.

Авторы

Никитина Ангелина Сергеевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель

Authors

Nikitina Angelina Sergeevna – PhD (Pharmacy), Senior lecturer, Department of Pharmacognosy,

кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фармакогностическое изучение и стандартизация лекарственного растительного сырья. ORCID: 0000-0002-8536-6567. E-mail: lina_nikitina@mail.ru

Логвиненко Лидия Алексеевна – научный сотрудник лаборатории ароматических и лекарственных растений ФГБУН «Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», пгт. Никита, Республика Крым. Область научных интересов: интродукция и селекция лекарственных растений, куратор коллекции лекарственных растений.

Никитина Наталья Владимировна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры технологии с курсом биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: технология фитопрепаратов, фитоэкстракты. E-mail: n_niki7@mail.ru.

Нигарян Сирануш Артуровна – аспирант 1-го года обучения кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фармакология, клиническая фармакология. ORCID: 0000-0001-9898-0518. E-mail: 79682650210@yandex.ru

Botany and Phytopreparation Technology Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: phytochemistry, pharmacognostic study and standardization of medicinal plants, essential oils. ORCID: 0000-0002-8536-6567. E-mail: lina_nikitina@mail.ru

Logvinenko Lidiya Alekseevna – Researcher of the Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants in Nikitsky Botanical Garden – National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Republic of Crimea. Research interests: introduction and selection of medicinal plants, supervisor of the collection of medicinal plants.

Nikitina Natal'ya Vladimirovna – PhD (Pharmacy), Senior lecturer, Department of Technology with a course of biotechnology, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: technology of phytopreparations, phytoextracts. E-mail: n_niki7@mail.ru

Nigaryan Siranush Arturovna – 1st year graduate student of the Department of Pharmacology with a course of Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: pharmacology, clinical pharmacology. ORCID: 0000-0001-9898-0518. E-mail: 79682650210@yandex.ru

Поступила в редакцию: 21.05.2018
Отправлена на доработку: 23.09.2018
Принята к печати: 23.11.2018

Received: 21.05.2018
Sent back for revision: 23.09.2018
Accepted for publication: 23.11.2018

УДК 543.544:577.112.3



РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ ГЛУТАТИОНА ВОССТАНОВЛЕННОГО

Алексеева К.А., Писарев Д.И., Малютин А.Ю., Бойко Н.Н.

ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России,
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85
E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Глутатион (γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин) является важнейшим низкомолекулярным внутриклеточным тиольным трипептидом, состоящим из трёх аминокислот – глицина, цистеина и кислоты глутаминовой. Поскольку в отечественной фармакопее отсутствует нормативная документация на глутатион, разработка фармакопейной статьи на указанную субстанцию является актуальной проблемой. **Цель.** Разработка методик определения посторонних специфических примесей в глутатионе. **Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использованы субстанция – глутатион восстановленный (CAS №70-18-8, ЕС №2007254, Applichet, Германия), содержащий примеси и стандартный образец глутатиона восстановленного – Sigma Aldrich (Япония). Анализ проводился с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращённо-фазном варианте и тонкослойной хроматографии. Хроматографирование с помощью ОФ ВЭЖХ проводили после предварительной дериватизации глутатиона и его специфических примесей дансилхлоридом. Поскольку специфические примеси в глутатионе представляют собой дипептиды и аминокислоты, следовательно, они также как и сам глутатион способны вступать в реакцию с дансилхлоридом с образованием дансильных производных, которые далее можно определить в ходе хроматографического разделения. **Результаты.** В результате хроматографирования методом ОФ ВЭЖХ дериватизированного дансилхлоридом глутатиона установлено, что данная реакция позволяет обнаружить примеси в нём. Дериваты глутатиона хорошо разделяются при хроматографировании методом ОФ ВЭЖХ и имеют отличающиеся максимумы поглощения. Дериват глутатиона имел максимум поглощения при $\lambda_{\max} = 284$ нм. Дериваты, принадлежащие специфическим примесям глутатиона, поглощают при $\lambda_{\max} = 288$ нм и $\lambda_{\max} = 296$ нм. Данные полученные с помощью ОФ ВЭЖХ были подтверждены методом ТСХ в системе изо-пропанол – вода 2:1. Обнаружено три компонента, один из которых соответствует глутатиону, два остальных – примеси. **Заключение.** Разработаны методики определения примесей в субстанции глутатиона с помощью методов ОФ ВЭЖХ с предварительной дериватизацией дансилхлоридом и ТСХ с детекцией нингидрином. Сравнительный анализ полученных данных позволяют утверждать, что метод ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией является более достоверным, поскольку более чувствителен к примесям, к тому же даёт возможность изучить УФ-профили примесных компонентов, чем метод ТСХ. Поэтому для обнаружения примесей в субстанции глутатиона более предпочтительно использовать ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией. Результаты настоящего исследования можно рекомендовать для включения в нормативную документацию на субстанцию глутатиона в раздел «Примеси».

Ключевые слова: глутатион, примеси, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография

Для цитирования:

Алексеева К.А., Писарев Д.И., Малютин А.Ю., Бойко Н.Н.
РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ ГЛУТАТИОНА ВОССТАНОВЛЕННОГО
Фармация и фармакология. 2018;6(6):535-547
DOI:10.19163/2307-9266-2018-6-6-535-547
© Алексеева К.А., Писарев Д.И., Малютин А.Ю., Бойко Н.Н., 2018

For citation:

Alexeeva K.A., Pisarev D.I., Malyutina A.Yu., Boyko N.N.
DEVELOPMENT OF METHODS FOR DETERMINATION OF SPECIFIC IMPURITIES IN THE GLUTATIONION RESTORED SUBSTANCE
Pharmacy & Pharmacology. 2018; 6(6):535-547. Russian.
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-6-535-547

DEVELOPMENT OF METHODS FOR DETERMINATION OF SPECIFIC IMPURITIES IN THE GLUTATHION RESTORED SUBSTANCE

Alexeeva K.A., Pisarev D.I., Malyutina A.Yu., Boyko N.N.

Belgorod State Research University, 85, Pobeda St., Belgorod, Russia, 308015

E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) is the most important low molecular weight intracellular thiol tripeptide consisting of three amino acids – glycine, cysteine and glutamic acid. In Russian pharmacopoeia there is no regulatory documentation for glutathione, therefore, the development of a pharmacopoeial item for the specified substance is a relevant problem. **The aim** of the article is the development of methods for determining foreign specific impurities in glutathione. **Materials and methods.** The substance of glutathione reduced (CAS 70-18-8, EC 2007254, Applichem, Germany) containing impurities, and a standard sample of reduced glutathione (Sigma Aldrich, Japan) were used as the objects of the study. The analysis was carried out by using a high-performance liquid chromatography method in the reverse phase version and a thin layer chromatography method. The chromatography using RP HPLC was performed after preliminary derivatization of glutathione and its specific impurities with dancil chloride. Specific impurities in glutathione are dipeptides and amino acids. Therefore, they, like glutathione, can react with dancil chloride. Dancil derivatives are formed, and they can be determined by chromatographic separation. **Results.** As a result of chromatography by the method of RP HPLC of derivatized dancil chloride glutathione it has been established that this reaction makes it possible to detect impurities in it. Glutathione derivatives are well separated by chromatography by implementing the method of RP HPLC and have different absorption maxima. The glutathione derivative had an absorption maximum at $\lambda_{\max}=284$ nm. The derivatives belonging to specific glutathione impurities absorb at $\lambda_{\max}=288$ nm and $\lambda_{\max}=296$ nm. The data obtained using RP HPLC were confirmed by TLC in the isopropanol-water (2:1) system. Three components were found out, one of which corresponds to glutathione, while two others are impurities. **Conclusion.** Methods for determining impurities in the glutathione substance using RP HPLC methods with preliminary derivatization with dancil chloride and TLC with ninhydrin detection have been worked out. A comparative analysis of the data obtained makes it possible to state that the OF-HPLC method with pre-column derivatization is more reliable, since it is more sensitive to impurities, and also makes it possible to study the UV profiles of impurity components better than the TLC method. Therefore, for the detection of impurities in the substance of glutathione, it is more preferable to use RP-HPLC with pre-column derivatization. The results of this study can be recommended for inclusion in the regulatory documentation on the substance of glutathione in the section "Impurities".

Keywords: glutathione; impurities; high performance liquid chromatography; thin layer chromatography

ВВЕДЕНИЕ. Чистота является важнейшим показателем доброкачественности фармацевтических субстанций. Определение чистоты любой фармацевтической субстанции сводится к установлению примесей. Примеси могут представлять собой остатки промежуточных продуктов синтеза, либо накапливаться в процессе хранения, как результат воздействия различных физических (тепло, свет, кислород воздуха, влага) или химических (тяжёлые металлы, pH) факторов на основной действующий компонент. Кроме того, примеси могут иметь техногенный характер, то есть приобретаться в процессе производства действующего вещества, к таким примесям чаще всего относятся остаточные растворители. Примеси могут быть токсичными, то есть способными оказывать негативное влияние на организм, либо иметь иной характер фармакологической активности, нередко противоположной исходному веществу. Примеси также могут быть индифферентными в фармакологическом плане. Последние, накапливаясь в основном веществе, снижают содержание биологически активных веществ и соответственно, уменьшают их активность. Вследствие этого определение чистоты субстанций, которые используются для изго-

товления лекарственных препаратов, имеет большое значение. Поэтому в фармакопейной статье (ФС) или фармакопейной статье предприятия ФСП на любую фармацевтическую субстанцию обязательно отмечаются возможные примеси, допустимые пределы их содержания, и приводятся испытания, подтверждающие отсутствие примесных компонентов.

Настоящее исследование посвящено разработке методик определения примесей в субстанции глутатиона.

Глутатион (γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин) является важнейшим низкомолекулярным внутриклеточным тиольным трипептидом, состоящим из трёх аминокислот – глицина, цистеина и кислоты глутаминовой. Биологическая функция глутатиона охватывает как поддержание окислительно-восстановительного статуса клетки, так и обезвреживание ксенобиотических молекул. Он также является основным окислительно-восстановительным агентом большинства аэробных организмов, играет важнейшую роль в глутатионзависимом катализе – процессе метаболической адаптации, характерной для всех форм жизни. В ходе эволюции живые системы начали использовать его в качестве универсального нуклеофила для химического превращения множества

электрофильных веществ. Происходит это благодаря тому, что глутатион входит в состав множества так называемых глутатион-зависимых ферментов, среди которых глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, пероксидредуктаза, глиоксалазы 1 и 2, глутатионтрансфераза, ускоряющих большинство химических реакций в многочисленных путях метаболизма. [1–4].

За счёт сульфгидрильной группы цистеина он участвует в реакциях восстановления и конъюгации, с помощью которых удаляются пероксиды и многие ксенобиотические соединения [5]. Реакции элиминации пероксидов происходят благодаря тому, что глутатион выполняет роль кофактора у фермента глутатионпероксидазы, при этом предотвращается окисление свободных тиольных групп важнейших белков, в том числе ферментов, снижается перекисное окисление фосфолипидов мембран клеток [6]. Удаление ксенобиотических соединений осуществляется путем прямой конъюгации с глутатионом и последующей секрецией аддукта из клетки [7]. Таким образом, данная молекула составляет основу интрацеллюлярного окислительно-восстановительного статуса, тем самым, защищая клетки от активных форм кислорода [8].

Для анализа глутатиона используется ряд физико-химических методов. Спектрофотометрия, основанная на взаимодействии глутатиона 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты [9] и с реактивом Элмана [10]. Спектрофлуориметрический метод основан на взаимодействии о-фталевого альдегида с SH-группой глутатиона, с образованием флуоресцентного конъюгата [11, 12]. Методом жидкостной хроматографии с различными детекторами [13], а также с предколоночной дериватизацией. В качестве дериватизаторов используют этакриновую кислоту и ее метиловый эфир [14], N-этилмалеимид [15].

Для идентификации глутатиона, связанного с белками в органах и клетках, используется жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией и tandemной масс-спектрометрией [16, 17], в том числе этот метод используется для определения глутатиона в мозге крыс линии Wistar [18].

Для совместного определения глутатиона и его прекурсоров – цистеина, цистеинилглицина и гомоцистеина в слюне используется реакция восстановления дисульфидов в тиолы, дериватизации производных 2-S-хинолином с 2-хлор-1-метилхинолинийтетрафторборатом и количественном определении с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [19]. В литературе [20, 21] представлено вольтамперометрическое определение глутатиона.

Глутатион описан во многих фармакопеях, в том числе Европейской, Британской, Японской и т.д. [22–24]. В отечественной фармакопее отсутствует нормативная документация на глутатион, следовательно, разработка ФС на указанную субстанцию является актуальной проблемой. Настоящий материал может быть использован для включения в разрабатываемую фармакопейную статью на глутатион, а именно в раздел «Примеси».

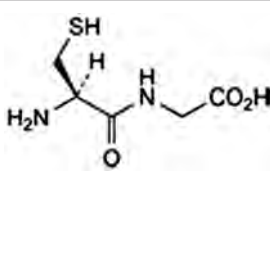
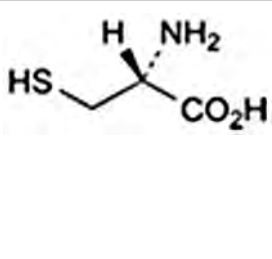
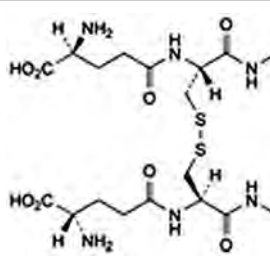
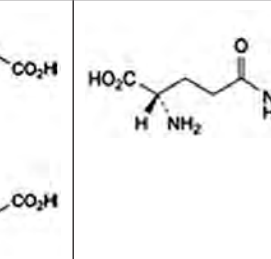
ЦЕЛЬ. Разработка методик определения постоянных специфических примесей в глутатионе.

Для реализации поставленной цели применялись два аналитических подхода для определения примесей. Первый аналитический подход заключался в использовании классической тонкослойной хроматографии, второй – в применении ОФ ВЭЖХ после предварительной дериватизации глутатиона и соответствующих примесей дансилхлоридом в дансильные производные. Ранее нами предпринимались попытки определения глутатиона с помощью предколоночной дериватизации с 4-метокси-2-нитрофенилроданидом [25].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В качестве объекта исследования использована субстанция глутатиона восстановленного (CAS №70-18-8, ЕС №2007254, Applichem, Германия), содержащего примеси и стандартный образец глутатиона восстановленного – Sigma Aldrich (Япония).

Европейская и Британская фармакопеи (ЕФ, БФ) предусматривают наличие 5 примесей в глутатионе [22, 23], структуры четырёх из которых приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Структурные формулы примесей в глутатионе согласно ЕФ и БФ

			
L-Цистеинилглицин	L-Цистеин	Глутатион окисленный	L-глутамилцистеин

Пятая примесь с неизвестной структурой является продуктом деградации глутатиона. Идентификацию примесей согласно ЕФ и БФ проводится с использованием метода капиллярного электрофореза.

Японская фармакопея предлагает для определения примесей метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором при длине волны λ – 210 нм [24].

Использование ОФ ВЭЖХ для определения примесей в глутатионе.

Настоящий хроматографический метод является универсальным, поскольку с его помощью одновременно определяется большое число параметров, характеризующих разделение, идентификацию, количественную оценку компонентов [26].

Хроматографическое разделение методом ОФ ВЭЖХ проводили на приборе «Agilent Technologies 1200 Infinity» (США). Электронные спектры регистрировали с помощью диодно-матричного детектора серии Agilent 1200. Разделение проводили на

стальной колонке Ascentis express C₁₈ 2,7 μm × 100 мм × 4,6 мм.

Состав мобильной фазы включал (А) – 1%-ный водный раствор кислоты муравьиной, (Б) – спирт этиловый. Элюирование осуществляли в следующих условиях:

Скорость потока: 0,5 мл/мин

Температура колонки: 35°C

Детекция: 284, 288, 296 нм

Объём вводимой пробы: 1 μл

Элюирование осуществляли в градиентном режиме, приведённом в таблице 2.

Таблица 2 – Условия градиентного элюирования дериватов глутатиона

Время, мин	А, %	В, %
0	100	10
60	0	100

Методика дериватизации глутатиона и примесей. 2 мл 0,1%-ного раствора глутатиона в 0,05 н. водном растворе тетрабората натрия помещали в склянку для анализа, добавляли 2 мл 0,1%-ного спиртового раствора дансилхлорида, взбалтывали. Полученный раствор доводили до метки 0,05 н. раствором натрия тетрабората, перемешивали и хроматографировали в приведённых выше условиях.

Использование хроматографии в тонком слое сорбента для определения примесей в глутатионе.

Тонкослойная хроматография – доступный и дешёвый метод качественного и полуколичественного анализа органических соединений. Его отличают высокая чувствительность, экспрессность, доступность и простота выполнения, возможность использования агрессивных реагентов для проявления веществ [27].

Определение примесей в тонком слое сорбента проводили на пластинах марки TLC Silica gel 60 F 254, TLC Silica gel 60 фирмы Merck, на алюминиевой подложке с толщиной слоя сорбента 200 мкм, с нанесённым рабочим слоем фракционированного сорбента толщиной 200 мкм. Хроматографирование проводили восходящим способом в стандартных условиях.

Анализируемый объект в концентрации 0,5%

растворяли в воде и наносили микрошприцем в количестве 2 мкл на линию старта. В качестве подвижной фазы использована бинарная система изо-пропанол – вода в соотношении 2:1.

Для детектирования зон адсорбции глутатиона и примесей на хроматограмме использовали дериватизацию с помощью обработки хроматограмм 0,5%-ным спиртовым раствором нингидрина с последующим нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100°C в течении 5 минут, при этом зоны адсорбции глутатиона и примесей проявлялась в виде красно-фиолетовых пятен.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Поскольку специфические примеси в глутатионе представляют собой дипептиды и аминокислоты, следовательно, они также, как и сам глутатион способны вступать в реакцию с дансилхлоридом с образованием дансильных производных, которые далее можно определить в ходе хроматографического разделения методом ОФ ВЭЖХ.

В результате хроматографирования методом ОФ ВЭЖХ дериватизированного дансилхлоридом глутатиона установлено, что данная реакция позволяет обнаружить примеси в глутатионе (рис. 1).

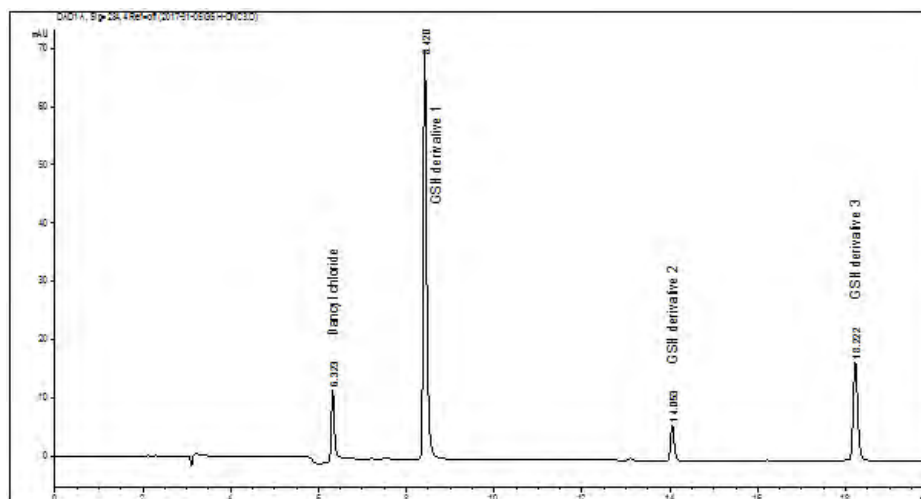


Рисунок 1 – Хроматограмма дансилхлоридных дериватов глутатиона

На представленной хроматограмме обнаруживаются три деривата со временами удерживания 8,4 мин, 14,053 и 18,2 мин., причём компонент со временем удерживания

8,4 мин принадлежит чистому глутатиону, что подтверждается хроматографированием стандартного образца (СО) глутатиона, лишённого примесей (рис. 2).

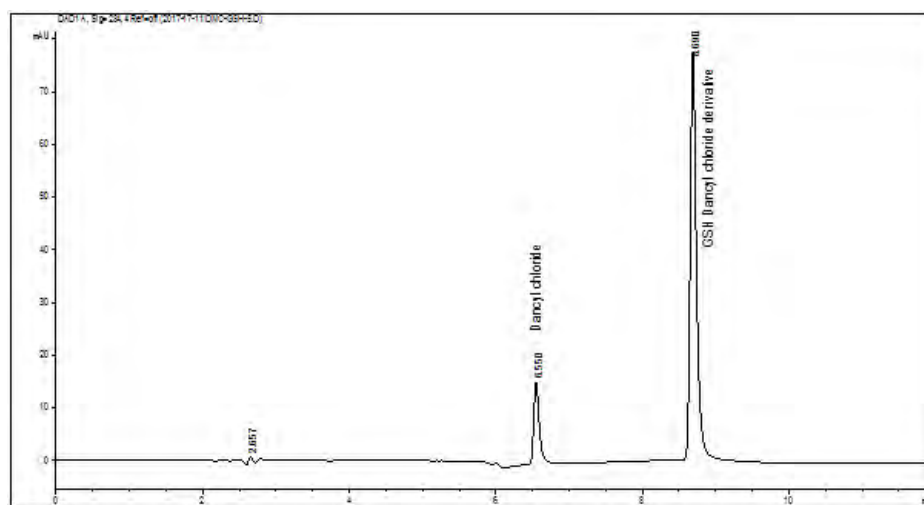
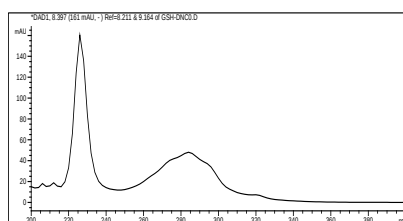


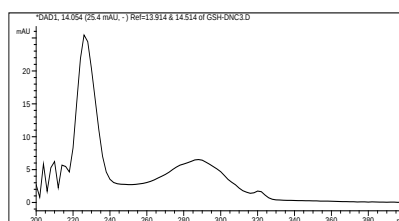
Рисунок 2 – Хроматограмма СО глутатиона (без примесей)

Остальные компоненты представляют собой примеси в анализируемом образце глутатиона.

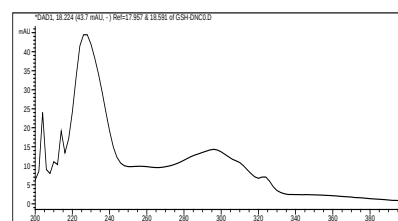
УФ-спектры всех дериватов представлены на рисунке 3.



УФ-спектр деривата 1 глутатиона



УФ-спектр деривата 2 глутатиона



УФ-спектр деривата 3 глутатиона

Рисунок 3 – УФ-спектры дериватов глутатиона

Представленные на рисунке 3 УФ-спектры полученных дериватов несколько отличаются друг от друга. Дериват глутатиона 1 имел максимум поглощения при $\lambda_{\max} = 284$ нм. Дериваты, принадлежащие специфическим примесям глутатиона поглощают при $\lambda_{\max} = 288$ нм (дериват 2) и $\lambda_{\max} = 296$ нм (дери-

ват 3). Дериват со временем удерживания 14,053 был идентифицирован как цистеин, а компонент, имевший время удерживания 18,222 – глутатион окисленный.

Рассчитанные параметры пригодности хроматографической системы представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Параметры пригодности хроматографической системы для определения примесей в глутатионе с помощью дериватизации дансилхлоридом

t_R	Area	N	R_s	T_f	W_b
8,42	386,60	62598	16,39	0,68	0,0792
14,053	36,40	150256	40,22	0,73	0,2667
18,222	121,05	156705	25,30	0,81	0,1083

Примечание: t_R – абсолютное время удерживания, N – число теоретических тарелок, R_s – коэффициент разделения пиков, T_f – коэффициент асимметрии, W_b – ширина пика на базовой линии

По полученным данным составлены условия проверки для проверки пригодности хроматографической системы.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы

0,025 г цистеина и 0,025 г субстанции глутатиона восстановленного помещали в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, растворяли в 10 мл 0,05 М

раствора натрия тетрабората, доводили объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах раствора сравнения выполняются следующие условия:

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику дансильного дери-

вата глутатиона должна быть не менее 56000 теоретических тарелок;

- коэффициент разделения пиков дансильного деривата глутатиона и цистеина должен быть не менее 15;
- относительное стандартное отклонение площади пика DNC-производного глутатиона должно быть не более 2,0%.
- коэффициент симметрии пика DNC-производного глутатиона на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения глутатиона должен быть от 0,6 до 1,0.



Рисунок 4 – ТСХ хроматограмма глутатиона с примесями

На рисунке показаны 3 зоны адсорбции, две из которых принадлежат примесям.

Компонент с коэффициентом подвижности R_f – 0,35, имеющий красно-фиолетовую окраску, принадлежит глутатиону. Компоненты со значениями R_f – 0,45 (бледно-красного цвета) и 0,3 (коричневого цвета) принадлежат примесям.

В ходе изученного информационного массива по аналитическим подходам для определения примесей в субстанции глутатиона, предлагаемым зарубежными фармакопеями, в том числе такими авторитетными как Европейская и Британская установлено, что данные источники регламентируют тестировать чистоту глутатиона методом капиллярного электрофореза. Указанный метод хоть и является эффективным, однако не так часто задействован в рутинной аналитической работе, поэтому его использование для определения примесей в глутатионе может вызвать затруднения. В Японской фармакопее предусмотрено определение примесей в глутатионе методом ВЭЖХ с УФ-детекцией при длине волны 210 нм. Чувствительность и надёжность такого подхода вызывает сомнения, поскольку все примеси, которые определяются в глутатионе являются алифатическими аминокислотами и пептидами, которые очень слабо поглощают в УФ-области спектра. Также регламентируемая длина волны (210 нм) – не является специфичной для данных соединений, так как в этой области спектра поглощает большинство известных органических соединений, в том числе растворители.

Приоритетным инструментом в отечественных аналитических лабораториях, как наиболее полно отвечающим требованиям фармацевтического анализа, до сих пор остаётся метод ОФ ВЭЖХ. Поэтому практически вся методическая база для большин-

Предел обнаружения глутатиона для данной методики с требуемой правильностью и прецизионностью – 0,001%. На хроматограмме, полученной при количественном определении содержание глутатиона окисленного должно быть не более 1,5%. Содержание других примесей должно быть не более 0,5%. Суммарное содержание примесей должно быть не более 2,5%.

Данные, полученные с помощью ОФ ВЭЖХ, были подтверждены в ходе хроматографирования методом ТСХ. На рисунке 4 представлена хроматограмма глутатиона, содержащего примеси.

ства лекарственных веществ адаптирована именно под данный метод. Вместе с тем, актуальным методом для определения примесей остаётся метод тонкослойной хроматографии. Поэтому предложенный нами подход, а именно сочетание предколоночной дериватизации дансилхлоридом с последующим определением методом ОФ ВЭЖХ и тонкослойной хроматографии для определения примесей в глутатионе, легко реализуем практически в любой лаборатории. Его отличают отсутствие сложной пробоподготовки, чувствительность, экспрессность. Кроме того, предколоночная дериватизация дансилхлоридом с последующим хроматографическим определением ОФ ВЭЖХ может быть использована также для подлинности и количественного определения глутатиона. Следовательно, можно утверждать, что данный аналитический подход является универсальным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В результате проведённых исследований разработаны методики определения примесей в субстанции глутатиона с помощью методов ОФ ВЭЖХ с предварительной дериватизацией дансилхлоридом и ТСХ с детекцией нингидрином. Сравнительный анализ полученных результатов позволяют утверждать, что метод ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией является достоверным, поскольку более чувствителен к примесям, к тому же показывает возможность изучить УФ-профили примесных компонентов, чем метод ТСХ. Поэтому для обнаружения примесей в субстанции глутатиона более предпочтительно использовать ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией. Результаты настоящего исследования можно рекомендовать для включения в нормативную документацию на субстанцию глутатиона в раздел «Примеси».

INTRODUCTION. Purity is the most important indicator of a good quality of pharmaceutical substances. The purity determination of any pharmaceutical substance is reduced to the determination of impurities. Impurities can be residues of intermediate products of synthesis or can be accumulated during the storage as a result of impact of various physical (heat, light, oxygen, moisture) or chemical

(heavy metals, pH) factors on the main active component. In addition, impurities can have a man-made character, i. e., be acquired during an active ingredient production process; such impurities most often include residual solvents. Impurities can be toxic, i. e. able to have a negative impact on the body or to have a different nature of pharmacological activity which is often opposite to the original substance. Impu-

urities can also be indifferent within pharmacological terms. The latter, being accumulated in the main substance, reduce the content of biologically active substances and therefore reduce their activity. As a consequence, the determination of purity of the substances used for the manufacture of medicines is of great importance. Therefore, in a pharmacopoeial item or in a manufacturer's monograph for any pharmaceutical substance possible impurities, permissible limits of their content are necessarily noted and the tests confirming the absence of impurity components are given.

This study is devoted to the development of methods for determining impurities in the substance of glutathione.

Glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) is the most important low molecular intracellular thiol tripeptide consisting of three amino acids – glycine, cysteine and glutamic acid. The biological function of glutathione encompasses both the maintenance of the redox status of a cell and the neutralization of xenobiotic molecules. Glutathione is the main redox agent of most aerobic organisms. It plays the main role in glutathione-dependent catalysis, a process of metabolic adaptation characteristic for all life forms. Within the course of evolution, all living systems began to use it as a universal nucleophile for the chemical transformation of many electrophilic substances. This is due to the fact that glutathione is a part of many so-called glutathione-dependent enzymes including glutathione reductase, glutathione peroxidase, peroxide reductase, glyoxalase 1 and 2, glutathione transferase, which accelerate most of these chemical reactions in multiple metabolic pathways [1–4].

Due to the cysteine sulfhydryl group it participates in reduction and conjugation reactions. Peroxides and many xenobiotic compounds are removed with the help of these reactions [5]. Peroxide elimination reactions occur due to the fact that glutathione plays the role of cofactor within the glutathione peroxidase enzyme, along with it preventing the oxidation of free thiol groups of the most important proteins, including enzymes, and the peroxidation of cell membrane phospholipids is also reduced [6]. The removal of xenobiotic compounds is carried out by direct conjugation with glutathione and subsequent secretion of the adduct from the cell [7]. Thus, this molecule forms the basis of the intracellular redox status thereby protecting cells from active oxygen forms [8].

A number of physicochemical methods are used for glutathione. First of all, it is spectrophotometry based on the interaction of glutathione with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic

acid [9] and with Ellman's reagent [10]. The spectrofluorimetric method is based on the interaction of o-phthalic aldehyde with the glutathione SH-group forming fluorescent conjugate [11, 12]. It is also a liquid chromatography method with various detectors [13], as well as with pre-column derivatization. Ethacrynic acid and its methyl ester [14], N-ethylmaleimide [15] are used as derivatizers. To identify glutathione bound to proteins in organs and cells, liquid chromatography in combination with mass spectrometry and tandem mass spectrometry is used [16, 17]. This method is also used to determine glutathione in the brains of Wistar rats [18]. For the joint determination of glutathione and its precursors (cysteine, cysteinylglycine and homocysteine) in saliva, the reduction reaction of disulfides to thiols, derivatization of 2-S-quinoline derivatives with 2-chloro-1-methylquinoline tetrafluoroborate and quantification using high performance liquid chromatography is used [19]. Voltamperometric glutathione determination is also described [20, 21].

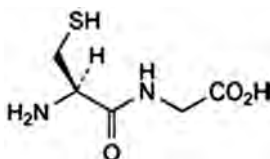
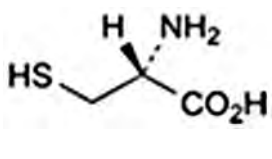
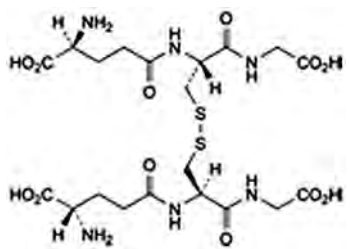
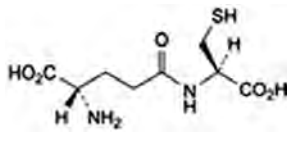
Glutathione is a part of many pharmacopoeias including European, British, Japanese, etc. [22–24]. In Russian pharmacopoeia there is no regulatory documentation for glutathione, therefore the development of the pharmacopoeial item for the specified substance is an actual problem. This material can be used for inclusion into the pharmacopoeial item on glutathione, namely in the section "Impurities".

THE AIM of the article is the development of methods for the determination of specific impurities in glutathione. To achieve this goal, two analytical approaches for the impurities determination were developed. The first analytical approach implies classical thin-layer chromatography; the second implies the use of RP-HPLC (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) after preliminary derivatization of glutathione and the corresponding impurities by dancil chloride into dancil derivatives. Earlier an attempt was made to determine glutathione by using precolumn derivatization with 4-methoxy-2-nitrophenyl-rhodium [25].

MATERIALS AND METHODS. As the object of the study, the reduced substance of glutathione (CAS 70-18-8, EC 2007254, Applichem, Germany) containing impurities and the standard reduced glutathione sample (Sigma Aldrich (Japan)) was used.

European (Ph. Eur.) and British (B.P.) Pharmacopoeias allow the presence of 5 impurities in glutathione [22, 23], the structures of four of which are enlisted in Table 1.

Table 1 – Structural formulas of impurities in glutathione according to Ph. Eur. and B.P.

			
L-Cysteinylglycine	L-Cysteine	Glutathione oxidized	L-glutamylcysteine

The fifth impurity with an unknown structure is the product of glutathione degradation.

The identification of impurities according to the European and British Pharmacopoeias is carried out by method of capillary electrophoresis.

For the impurities determination, Japanese Pharmacopoeia offers a method of high-performance liquid chromatography (HPLC) with an ultraviolet detector at the wavelength of $\lambda - 210$ nm [24].

Use of RP-HPLC to determine impurities in glutathione

This chromatographic method is universal due to the fact that it simultaneously determines a large number of parameters characterizing separation, identification and quantitative evaluation of the components [26].

Chromatographic separation by the method of RP HPLC was performed on an “Agilent Technologies 1200 Infinity” device (USA). Electronic spectra were recorded using an *Agilent 1200* series diode array detector.

The separation was carried out on an Ascentis express C182.7 $\mu\text{m} \times 100$ mm $\times$ 4.6 mm steel column.

The mobile phase composition included: 1% aqueous solution of formic acid (A) and ethyl spirit (B). The elution was carried out under the following conditions:

Flow rate: 0.5 ml/min

Column temperature: 35°C

Detection: 284, 288, 296 nm

Injection volume: 1 μl

The elution was carried out in a gradient mode shown in Table 2.

Table 2 – Conditions for glutathione derivatives gradient elution

Time, min	A,%	B,%
0	100	10
60	0	100

Derivatization methods of glutathione and impurities

2 ml of 0.1% glutathiol solution in 0.05 n. sodium tetraborate aqueous solution was placed in a flask for analysis, 2 ml of 0.1% spirit dancil chloride solution was added and agitated. The resulting solution was brought to the mark of 0.05 n. by sodium tetraborate solution, stirred and chromatographed under the above mentioned conditions.

Use of chromatography in a thin layer of sorbent for the determination of impurities in glutathione

Thin layer chromatography is an affordable and cheap method of qualitative and semi-quantitative analysis of organic compounds. It is distinguished by high sensitivity, rapidity, accessibility and implementation simplicity, the possibility of using aggressive reagents for the substances manifestation [27].

Determination of impurities in a thin layer of sorbent was carried out on *TLC Silica gel 60 F 254*, *TLC Silica gel 60* plates from Merck, on an aluminum substrate with a sorbent layer thickness of 200 μm with a 200 μm thick applied sorbent working layer. Chromatography

was carried out in an ascending manner under standard conditions.

The object being analyzed at the concentration of 0.5% was dissolved in water and applied with a microsyringe in the amount of 2 μl on the start line. The binary system isopropanol – water in the ratio of 2:1 was used as the mobile phase.

To detect the glutathione adsorption zones and impurities on the chromatogram, derivatization by treating the chromatograms with 0.5% spirit solution of ninhydrin followed by heating in a drying cabinet at t 100°C for 5 minutes was used. Hereby, the adsorption zones of glutathione and impurities appeared as red-and-violet spots.

RESULTS AND DISCUSSION. Since specific impurities in glutathione are dipeptides and amino acids, they, like glutathione itself, can react with dancil chloride to form dancil derivatives which can be further determined during chromatographic separation by RP HPLC method.

As a result of RP-HPLC chromatography of glutathione derivatized by dancyl chloride it was established that this reaction allows detecting impurities in glutathione (Figure 1).

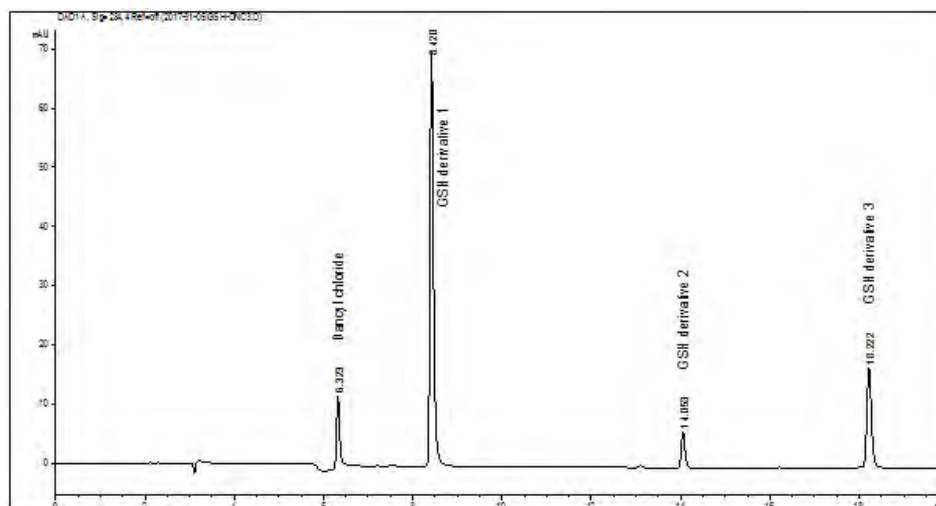


Figure 1 – Chromatogram of dancilchloride derivatives of glutathione

The chromatogram shows three derivatives with retention times of 8.4, 14.053 and 18.2 minutes. Moreover, the component with retention time of 8.4 minutes

belongs to pure glutathione which is confirmed by standard sample chromatography (SS (standard sample)) of glutathione devoid of impurities (Figure 2).

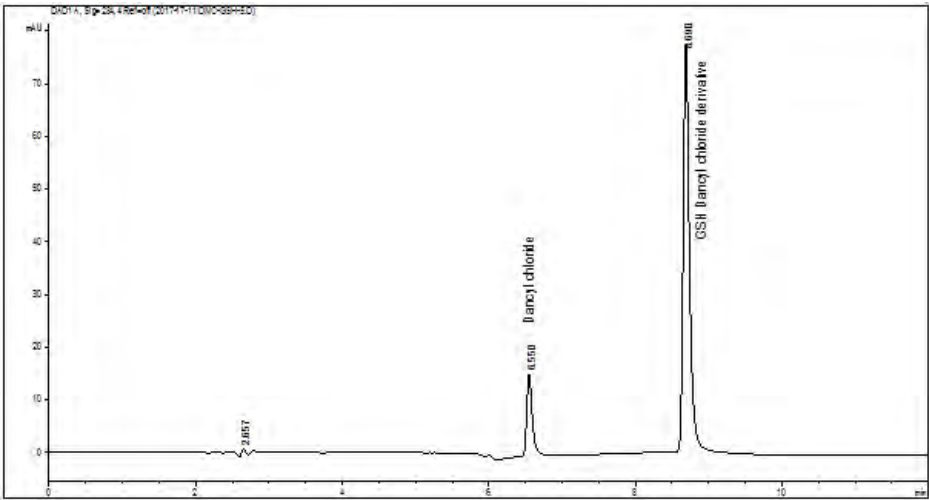


Figure 2 – Chromatogram of glutathione standard sample (without impurities)

The remaining components are impurities in the glutathione sample being analyzed.

The UV spectra of all derivatives are shown in Figure 3.

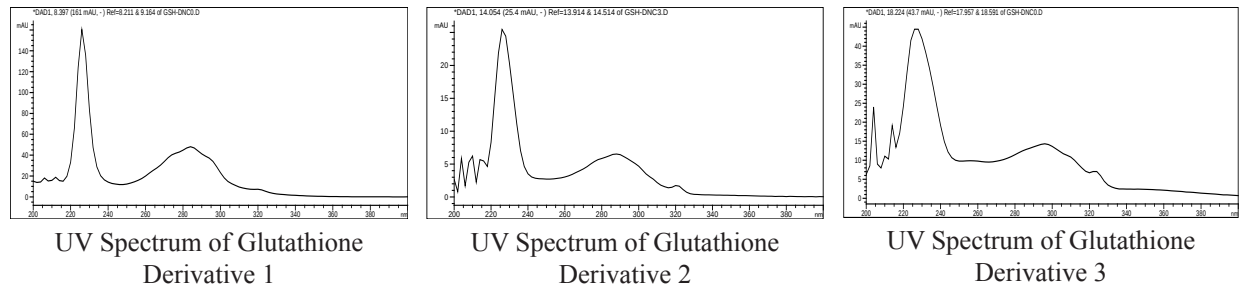


Figure 3 – UV Spectra of Glutathione Derivatives

The resulting derivatives presented in the figure, are somewhat different from each other in their UV spectra. Glutathione derivative 1 had an absorption maximum at $\lambda_{max} = 284$ nm. The derivatives belonging to specific glutathione impurities absorb at $\lambda_{max} = 288$ nm (Derivative 2) and $\lambda_{max} = 296$ nm (Derivative 3). The

derivative with the retention time of 14.053 min. was identified as cysteine, and the component with the retention time of 18.222 min. was identified as oxidized glutathione.

The calculated parameters of the chromatographic system suitability are presented in Table 3.

Table 3 – Chromatographic system suitability parameters for the impurities determination in glutathione with help of dancil chloride derivatization

t_R	Area	N	R_s	T_f	W_b
8.42	386.60	62598	16.39	0.68	0.0792
14.053	36.40	150256	40.22	0.73	0.2667
18.222	121.05	156705	25.30	0.81	0.1083

Note: t_R is the absolute retention time, N is the number of theoretical plates, R_s is the peak separation factor, T_f is the asymmetry coefficient, W_b is the peak width on the baseline

According to the data obtained, the test conditions to verify the suitability of the chromatographic system were compiled.
Preparation of the solution to verify the suitability of the chromatographic system. 0.025 g of cysteine

and 0.025 g of glutathione reconstituted substance were placed in a volumetric flask with a capacity of 25.0 ml, then dissolved in 10 ml of 0.05 M sodium tetraborate solution. After that the solution volume was brought to the necessary mark with the same solvent and mixed up.

The chromatographic system is considered suitable if the following conditions on the reference solution chromatograms are satisfied:

- the effectiveness of the chromatographic column calculated from the peak of the dancil glutathione derivative must be at least 56,000 theoretical plates;
- the peaks separation coefficient of the dancil glutathione derivative and cysteine must be at least 15;
- the relative standard deviation of the peak area of the DNC-glutathione derivative should be not more than 2.0%.
- the symmetry coefficient peak of the DNC-glutathione derivative on the chromatograms of the tested

solution and the glutathione reference solution should be from 0.6 to 1.0.

The glutathione detection limit for this technique with the required accuracy and precision is 0.001%. On the chromatogram obtained during the quantitative determination, the content of oxidized glutathione should be not more than 1.5%. The content of other impurities should not exceed 0.5%. The total content of impurities should not exceed 2.5%.

The data obtained with the help of RP HPLC, were confirmed during the chromatography carried out by TLC method. Figure 4 shows the chromatogram of glutathione containing impurities.



Figure 4 – TLC chromatogram of glutathione with impurities

The figure shows 3 zones of adsorption, two of which belong to impurities.

The component with the mobility coefficient of $R_f=0.35$ having a red-violet coloring belongs to glutathione. The components with R_f values of 0.45 (pale red) and 0.3 (brown) belong to impurities.

In the course of the studied data base on the analytical approaches to the detection of the impurities in the glutathione substance proposed by foreign pharmacopoeias including such authoritative as European and British ones, it has been found out that these sources regulate testing the purity of glutathione by capillary electrophoresis. Although this method is effective it is not so often involved in routine analytical work so its use to determine impurities in glutathione can cause some difficulties. For the determination of impurities in glutathione, Japanese Pharmacopoeia implies HPLC with UV detection at the wavelength of 210 nm. The sensitivity and reliability of this approach are open to question since all the impurities determined in glutathione, are aliphatic amino acids and peptides which are absorbed very weakly in the UV spectrum. The regulated wavelength (210 nm) is not specific for these compounds either, since most of the known organic compounds including solvents are absorbed within this spectrum.

In Russian analytical laboratories, the RP-HPLC method is still the priority means meeting the requirements of pharmaceutical analysis completely. Therefore, almost the entire methodological framework for most medicinal substances is adapted specifically to

this method. At the same time, the method of thin-layer chromatography remains actual for the determination of impurities. That is why the suggested method, i.e. the combination of pre-column derivatization with dancil chloride followed by the RP-HPLC determination and thin-layer chromatography for the determination of impurities in glutathione, can be easily put into practice in almost any laboratory. It is distinguished by the absence of a complex sample preparation, sensitivity and rapidity. In addition, the pre-column derivatization with dancil chloride followed by RP-HPLC chromatographic determination, can be also used for authenticity and quantitative determination of glutathione. Therefore, this analytical approach can be considered universal.

CONCLUSION. As a result of the carried out research, the methods for determining impurities in the glutathione substance on the basis of RP HPLC methods with preliminary derivatization with dancil chloride and TLC with ninhydrin detection have been developed. A comparative analysis of the obtained results suggests that the RP-HPLC method with pre-column derivatization is more reliable since it is more sensitive to impurities and also makes it possible to study the UV profiles of impurity components better than the TLC method. That is why it is more preferable to use RP-HPLC with pre-column derivatization for the detection of impurities in the glutathione substance. The results of this study can be recommended for inclusion into the regulatory documentation on glutathione in the section “Impurities”.

Библиографический список

1. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. – 2013. – T. 1830, №5. – С. 3217–3266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.
2. Kojer K., Bien M., Gangel H., Morgan B., Dick T.P., Riemer J., Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state // *The EMBO Journal*. – 2012. – T. 31, №14. – С. 3169–3182. DOI: [10.1038/emboj.2012.165](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.165).
3. Mieyal J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sabens E.A., Shelton M.D., Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation // *Antioxid Redox Signal*. – 2008. – T. 10, №11. – С. 1941–1988. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2089>.

4. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2005. – Т. 45. – С. 51–88. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
5. Yu B.P., Chung H.Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging // *Mech Ageing Dev.* – 2006. – Т. 127, №5. – С. 436–443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.01.023>.
6. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // *Mol Aspects Med.* – 2009. – Т. 30, №1–2. – С. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
7. Boyland E., Chasseaud L.F. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis // *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* – 1969. – Т. 32. – С. 173–219.
8. Zimmermann A.K., Loucks F.A., Schroeder E.K., Bouchard R.J., Tyler K.L., Linseman D.A. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for BCL-2 antioxidant function at mitochondria // *J Biol Chem.* – 2007. – Т. 282, №40. – С. 29296–29304. DOI: [10.1074/jbc.M702853200](https://doi.org/10.1074/jbc.M702853200).
9. Woodbridge J.E. Princeton N.J. Патент США: US3864085A. Glutathione reagent and test method. Дата: 31.10.1973.
10. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch Biochem Biophys.* – 1959. – Т. 82, №1. – С. 70–77. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
11. Agrawal S.B., Agrawal M., Lee E.H., Kramert G.F., Pillai P. Changes in polyamine and glutathione contents of a green algae, *Chlorogonium elongatum* (Dang) France exposed to mercury // *Environ. Exp. Botany.* – 1992. – Т. 32, №2. – С. 145–151. DOI: [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90039-5).
12. Hissin P.J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // *Anal Biochem.* – 1976. – Т. 74, №1. – С. 214–226. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2).
13. Sutariya V., Wehrung D., Geldenhuys W.J. Development and validation of a novel RP-HPLC method for the analysis of reduced glutathione // *J. Chromatogr. Sci.* – 2012. – Т. 50, №3. – С. 271–276. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr055>.
14. Di Pietra A.M., Gotti R., Bonazzi D., Andrisano V., Cavrini V. HPLC determination of glutathione and L-cysteine in pharmaceuticals after derivatization with ethacrynic acid // *J Pharm Biomed Anal.* – 1994. – Т. 12, №1. – С. 91–98. DOI: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)80015-4](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)80015-4).
15. Giustarini D., Dalle-Donne I., Milzani A., Fanti P., Rossi R. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide // *Nat Protoc.* – 2013. – Т. 8, №9. – С. 1660–1669. DOI: [10.1038/nprot.2013.095](https://doi.org/10.1038/nprot.2013.095).
16. Iwasaki Y., Saito Y., Nakano Y., Mochizuki K., Sakata O., Ito R., Saito K., Nakazawa H. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples // *J Chromatogr. B Analyt Technol Biomed LifeSci.* – 2009. – Т. 877, №28. – С. 309–3317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.001>.
17. Lee S.G., Yim J., Lim Y., Kim J.H. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to measure oxidized and reduced forms of glutathione in whole blood and verification in a mouse model as an indicator of oxidative stress // *J. Chromatogr. B.* – 2016. – Т. 1019. – С. 45–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.10.041>.
18. Gawlik M., Krzyżanowska W., Gawlik M.B., Filip M. Optimization of determination of reduced and oxidized glutathione in rat striatum by HPLC method with fluorescence detection and pre-column derivatization // *Acta Chromatographica.* – 2014. – Т. 26, №2. – С. 335–345. DOI: <https://doi.org/10.1556/ACHrom.26.2014.2.10>.
19. Bald E., Głowacki R. Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection // *Amino Acids.* – 2005. – Т. 28, №4. – С. 431–433. DOI: [10.1007/s00726-005-0195-8](https://doi.org/10.1007/s00726-005-0195-8).
20. Safavi A., Maleki N., Farjami E., Mahyari F.A. Simultaneous Electrochemical Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide at a Nanoscale Copper Hydroxide Composite Carbon Ionic Liquid Electrode // *Anal Chem.* – 2009. – Т. 81, №18. – С. 7538–7543. DOI: [10.1021/ac900501j](https://doi.org/10.1021/ac900501j).
21. Raoof J.B., Ojani R., Karimi-Maleh H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor // *J Appl Electrochem.* – 2009. – Т. 39, №8. – С. 1169–1175. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10800-009-9781-x>.
22. British Pharmacopoeia. T.1. Her Majesty's stationery office. – Лондон, 2005. – С. 924–926.
23. European Pharmacopoeia – European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg, France, 2004. – С. 2727.
24. Japanese Pharmacopoeia. 17th edition. English version. The Ministry of health, labour and welfare. 2062 с.
25. Алексеева К.А., Писарев Д.И., Новиков О.О., Малютин А.Ю. Разработка методики предколонной дериватизации глутатиона восстановленного 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом для определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Фармация и фармакология.* – 2018. – Т. 6, №3. – С. 229–240. DOI: [10.19163/2307-9266-2018-6-3-229-240](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2018-6-3-229-240).
26. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии; АН ЛатвССР, Ин-т органич. синтеза. – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
27. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. В 2-х ч. / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. пер. со словац. – М.: Мир, 1980.

References

1. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2013;1830(5):3217–3266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.
2. Kojer K, Bien M, Gangel H, Morgan B, Dick TP, Riemer J. Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. *The EMBO Journal*. 2012;31:3169–82. DOI: [10.1038/emboj.2012.165](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.165).
3. Mieyal JJ, Gallogly MM, Qanungo S, Sabens EA, Shelton MD. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(11):1941–88. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2089>.
4. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51–88. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
5. Yu BP, Chung HY. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech Ageing Dev*. 2006;127:436–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.01.023>.
6. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1–2):1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
7. Boyland E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol. Biol*. 1969;32:173–219.
8. Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL, Linseman DA. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for BCL-2 antioxidant function at mitochondria // *J Biol Chem*. 2007;282(40):29296–304. DOI: [10.1074/jbc.M702853200](https://doi.org/10.1074/jbc.M702853200).
9. Woodbridge JE, Princeton NJ. Patent USA US3864085A. Glutathione reagent and test method. Priority date: 31.10.1973.
10. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70–7. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
11. Agrawal SB, Agrawal M, Lee EH, Kramert GF, Pillai P. Changes in polyamine and glutathione contents of a green algae, *Chlorogonium elongatum* (Dang) France exposed to mercury. *Environ Exp Botany*. 1992;32(2):145–51. DOI: [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90039-5).
12. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74(1):214–26. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2).
13. Sutariya V, Wehrung D, Geldenhuys WJ. Development and validation of a novel RP-HPLC method for the analysis of reduced glutathione. *J Chromatogr Sci*. 2012;50(3):271–6. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr055>.
14. Di Pietra AM, Gotti R, Bonazzi D, Andrisano V, Cavrini V. HPLC determination of glutathione and L-cysteine in pharmaceuticals after derivatization with ethacrynic acid. *J Pharm Biomed Anal*. 1994;12(1):91–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)80015-4](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)80015-4).
15. Giustarini D, Dalle-Donne I, Milzani A, Fanti P, Rossi R. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nat Protoc*. 2013;8(9):1660–9. DOI: [10.1038/nprot.2013.095](https://doi.org/10.1038/nprot.2013.095).
16. Iwasaki Y, Saito Y, Nakano Y, Mochizuki K, Sakata O, Ito R, Saito K, Nakazawa H. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed LifeSci*. 2009;877(28):3309–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.001>.
17. Lee SG, Yim J, Lim Y, Kim JH. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to measure oxidized and reduced forms of glutathione in whole blood and verification in a mouse model as an indicator of oxidative stress. *J Chromatogr B*. 2016;1019:45–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.10.041>.
18. Gawlik M, Krzyżanowska W, Gawlik MB, Filip M. Optimization of determination of reduced and oxidized glutathione in rat striatum by HPLC method with fluorescence detection and pre-column derivatization. *Acta Chromatographica*. 2014;26(2):335–345. DOI: <https://doi.org/10.1556/ACHrom.26.2014.2.10>.
19. Bald E, Głowacki R. Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection. *Amino Acids*. 2005;28(4):431–3. DOI: [10.1007/s00726-005-0195-8](https://doi.org/10.1007/s00726-005-0195-8).
20. Safavi A, Maleki N, Farjami E, Mahyari FA. Simultaneous Electrochemical Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide at a Nanoscale Copper Hydroxide Composite Carbon Ionic Liquid Electrode. *Anal. Chem*. 2009;81(18):7538–43. DOI: [10.1021/ac900501j](https://doi.org/10.1021/ac900501j).
21. Raoof JB, Ojani R, Karimi-Maleh H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor *J Appl Electrochem*. 2009;39(8):1169–75. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10800-009-9781-x>.
22. British Pharmacopoeia. Her Majesty's stationery office, London, UK. 2005;1:924–926.
23. European Pharmacopoeia, 2014. 8th ed. – European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg, France: 2727.
24. Japanese Pharmacopoeia. 17th edition. English version. The Ministry of health, labour and welfare. 2062 p.
25. Alexeeva KA, Pisarev DI, Novikov OO, Malyutina AY. Development of methods of pre-columnar derivatization of glutathiones recovered by 4-methoxy-2-nitrophenylisothiocyanate for determination by method of high-eff

- fective liquid chromatography. Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(3):229–240. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-3-229-240.
26. Shatts VD, Sakhartova OV. Vysokoeffektivnaya zhidkostnaya khromatografiya: Osnovy teorii. Metodologiya. Primeneniye v lekarstvennoy khimii [High Performance Liquid Chromatography: Fundamentals of Theory. Methodology. Use in medicinal chemistry]. AN LatvSSR, In-t organic synthesis. Riga: Zinatne, 1988. 390 p. Russian.
27. Sharshunova M, Schwartz V, Mihalets C. Tonkosloynaya khromatografiya v farmatsii i klinicheskoy biokhimii. V 2-kh ch. [Thin-layer chromatography in pharmacy and clinical biochemistry. In 2 parts], translate from the Slovak. Moscow: Mir, 1980. Russian.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Авторы

Алексеева Ксения Александровна – аспирант 3 года обучения кафедры общей химии ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. ORCID: 0000-0002-0711-3505. E-mail: 740890@bsu.edu.ru

Писарев Дмитрий Иванович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры общей химии ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. ORCID: 0000-0002-2996-7712. E-mail: pisarev@bsu.edu.ru

Малюткина Анастасия Юрьевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры общей химии ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. ORCID: 0000-0001-6170-2151. E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Бойко Николай Николаевич – кандидат фармацевтических наук, младший научный сотрудник научно-образовательного центра «Фармация», ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтические процессы, фитотехнология. ORCID: 0000-0001-9222-2935. E-mail: boykoniknik@gmail.com

Authors

Alekseeva Kseniya Aleksandrovna – a post-graduate student of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. ORCID: 0000-0002-0711-3505. E-mail: 740890@bsu.edu.ru

Pisarev Dmitriy Ivanovich – PhD (Pharmacy), Associate Professor, Professor of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. ORCID: 0000-0002-2996-7712. E-mail: pisarev@bsu.edu.ru

Malyutina Anastasiya Yurevna – PhD (Pharmacy), Associate Professor of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. ORCID: 0000-0001-6170-2151. E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Boyko Nikolay Nikolaevich – PhD (Pharmacy), junior research scientist of Scientific and Educational Centre “Pharmacy”, Belgorod State Research University. Research interests: pharmaceutical processes, phytotechnology. ORCID: 0000-0001-9222-2935. E-mail: boykoniknik@gmail.com

Поступила в редакцию: 23.10.2018
Отправлена на доработку: 21.11.2018
Принята к печати: 10.12.2018

Received: 23.10.2018
Sent back for revision: 21.11.2018
Accepted for publication: 10.12.2018

ИЗУЧЕНИЕ ДОЗОЗАВИСИМОГО ЦЕРЕБРОТРОПНОГО ЭФФЕКТА ПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИНА ПОД ШИФРОМ PIR-9 НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Воронков А.В.¹, Шабанова Н.Б.¹, Воронкова М.П.², Лысенко Т.А.¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

²ФГБОУ ВО «Волгоградский медицинский университет» Минздрава России,

400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, 1

E-mail: Vahlushina@mail.ru

В современных условиях частота возникновения цереброваскулярной патологии неуклонно растет. Нарушения мозгового кровообращения способствуют увеличению степени летальности, инвалидизации и потере трудоспособности населения. Обширный арсенал средств, обладающих церебропротекторным действием, не удовлетворяет клинических специалистов. В связи с чем, является очевидной потребность в новых соединениях, проявляющих церебропротропные свойства, а так же способных улучшить прогноз течения патологий ишемического генеза. **Цель.** Изучение дозозависимого церебротропного эффекта производного пиримидина под шифром PIR-9 на фоне экспериментальной ишемии головного мозга крыс. **Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 140 крысах-самцах Wistar (m=170–190 г), разделенных на 7 равных групп. В качестве исследуемых веществ были использованы производное пиримидина – PIR-9 (25, 50 и 100 мг/кг), винпоцетин (3,2 мг/кг) и циннаризин (5,6 мг/кг), взвесь очищенной воды и твина-80. Экспериментальную церебральную ишемию воспроизводили с помощью необратимой окклюзии общих сонных артерий (хлоралгидратный наркоз – 350 мг/кг). Экспериментальные субстанции, референтные препараты и вода очищенная вводилась профилактически в течение 10-ти дней до операции. Через сутки проводили оценку выживаемости, неврологического дефицита, поведенческой активности, изменения когнитивно-мнестических функций, а также некоторых показателей энергообмена мозга. **Результаты.** При экспериментальном исследовании церебротропного действия субстанции под шифром PIR-9 (производное пиримидин-4-(1H)-она) в различных дозировках на фоне необратимой окклюзии общих сонных артерий отмечено уменьшение неврологических, поведенческих, мнестических и когнитивных нарушений, при этом наилучший эффект наблюдался на фоне введения соединения PIR-9 в дозе 50 мг/кг. Кроме того, после профилактического введения исследуемого вещества PIR-9 (50 мг/кг) наблюдалось улучшение процессов энергетического обмена в постишемическом периоде. **Заключение.** В ходе проведенного исследования установлено, что субстанция под лабораторным шифром PIR-9 проявляла наиболее выраженный церебропротекторный эффект в дозе 50 мг/кг, не уступающий по своей силе референтному препарату циннаризину и превосходя винпоцетин.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, поведенческие нарушения, лактатацидоз, потребление глюкозы, нарушения энергообмена, производные пиримидин-4-(1H)-она, крысы

Для цитирования:

Воронков А.В., Шабанова Н.Б.,
Воронкова М.П., Лысенко Т.А.
ИЗУЧЕНИЕ ДОЗОЗАВИСИМОГО
ЦЕРЕБРОТРОПНОГО ЭФФЕКТА
ПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИНА ПОД ШИФРОМ
PIR-9 НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС
Фармация и фармакология. 2018;6(6):548-567
DOI:10.19163/2307-9266-2018-6-6-548-567
© Воронков А.В., Шабанова Н.Б., Воронкова М.П.,
Лысенко Т.А., 2018

For citation:

Voronkov A.V., Shabanova N.B.,
Voronkova M.P., Lysenko T.A.
STUDY OF CEREBROTROPIC DOSE-DEPENDENT
EFFECT OF PYRIMIDINE DERIVATIVE UNDER
PIR-9 CODE AGAINST THE BACKGROUND
OF EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA
IN RATS
Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(6):548-567. Russian.
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-6-548-567

STUDY OF CEREBROTROPIC DOSE-DEPENDENT EFFECT OF PYRIMIDINE DERIVATIVE UNDER PIR-9 CODE AGAINST THE BACKGROUND OF EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS

Voronkov A.V.¹, Shabanova N. B.¹, Voronkova M.P.², Lysenko T.¹

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

²Volgograd State Medical University, 1, Square of Pavshikh Bortsov, Volgograd, Russia, 400131
E-mail: Vahlushina@mail.ru

Nowadays, the incidence of cerebrovascular disease is steadily increasing. Disorders of cerebral circulation contribute to the increase in the degree of mortality, disability, and incapacitation of the population. An extensive arsenal of drugs with cerebroprotective effects does not satisfy clinical specialists. In this connection, there is an obvious need for new compounds exhibiting cerebrotropic properties, as well as those able of improving the prognosis of the course of ischemic genesis pathologies. **The aim** of the article is to study the dose-dependent cerebrotropic effect of a pyrimidine derivative under PIR-9 code against the background of experimental cerebral ischemia in rats. **Materials and methods.** The experiment was conducted on 140 male Wistar rats ($m=170-190$ g) divided into 7 equal groups. Pyrimidine derivative PIR-9 (25, 50 and 100 mg/kg), Vinpocetine (3.2 mg/kg) and Cinnarizine (5.6 mg/kg) suspension of purified water and Tween-80 were used as the studied substances. Experimental cerebral ischemia was reproduced by irreversible occlusion of common carotid arteries (chloral hydrate anesthesia – 350 mg/kg). Experimental substances, reference preparations and purified water were administered prophylactically within 10 days before surgery. One day later the survival, neurological deficiency, behavioral activity, changes in cognitive-mnemonic functions, as well as some indicators of brain energy exchange were evaluated. **Results.** In an experimental study of the cerebrotropic effect of the substance under PIR-9 code (pyrimidine-4-(1H)-one derivative) in various dosages against the background of irreversible occlusion of the common carotid arteries, a decrease in neurological, behavioral, mnemonic and cognitive defects has been established. Hereby, the best effect was observed against the background of the administration of the compound PIR-9 at the dose of 50 mg/kg. In addition, the prophylactic administration of the test substance PIR-9 (50 mg/kg) has shown the improvement of the energy metabolism in the postischemic period. **Conclusion.** In the course of the study it was established that the substance under the laboratory code PIR-9 exhibited the most pronounced cerebroprotective effect at the dose of 50 mg/kg, which was not inferior in its strength to the reference drug Cinnarizine and exceeding Vinpocetine.

Keywords: cerebral ischemia, behavioral disorders, lactic acidosis, glucose consumption, energy exchange disorders, pyrimidine-4-(1H)-one derivatives, rats

ВВЕДЕНИЕ. Нарушения церебральной гемодинамики занимают одну из ключевых позиций среди причин ранней смертности, высокого уровня инвалидизации и потери трудоспособности населения, приобретая не только медицинскую, но и социально-экономическую значимость [1–6]. С каждым годом число пациентов с сосудистыми поражениями неуклонно растет, так отмечается около 1 млн. случаев ишемического инсульта в экономически развитых странах ежегодно, а к 2030 году прогнозируется увеличение данного показателя до 3,4 млн. [7]. Ежегодно в Российской Федерации регистрируется около 500000 случаев развития ишемического инсульта [1], что, несомненно, делает проблему профилактики и лечения заболеваний ишемического генеза одной из актуальных на сегодняшний день [8, 9].

С целью фармакотерапии цереброваскулярных патологий применяют большое количество лекарственных средств, обладающих противоишемическими свойствами, тем не менее, данные препараты не в полной мере удовлетворяют практикующих специалистов, вследствие чего перед экспериментальной медицинской химией и фармакологией встают новые цели и задачи в области целенаправленного поиска и изучения новых соединений, обладающих церебротропной активностью [10].

На основе дериватов пириимидина создается большое количество новых биологически активных

веществ [11–13]. Ранее была изучена церебротропная активность нового производного пириимидина-4(1H)-она под лабораторным шифром PIR-9, синтезированного на кафедре органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ [14]. Вследствие этого интересным стал вопрос изучения зависимости «доза-эффект» субстанции PIR-9 в условиях необратимой окклюзии общих сонных артерий.

ЦЕЛЬ. Изучить дозозависимый церебротропный эффект производного пириимидина под шифром PIR-9 на фоне экспериментальной ишемии головного мозга крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В качестве лабораторных животных были использованы крысы, полученные из питомника лабораторных животных «Рапполово» (г. Санкт-Петербург). Все манипуляции, производимые над особями, выполнены в соответствии с международными нормами экспериментальной этики (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Strasbourg, 22 June, 1998)) и с требованиями лабораторной практики (GLP). Животных размещали в макролоновом клетках с решетчатыми стальными крышками и углублением для корма. Подстилочным материалом служили нехвойные

древесные опилки. Все крысы, в течение эксперимента, содержались в стандартных условиях вивария (влажность – 65±5%, температура – 22±2°C). Особи находились при естественном освещении со свободным доступом к пище и воде. Клетки, подстил и поилки для питья менялись по мере загрязнения.

Дизайн исследования. Исследование выполнено на 140 крысах-самцах линии Wistar (m = 170–190 г). Перед началом эксперимента животные были рандомизированы по весу и поведенческой активности в тестах «Открытое поле» (ОП) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), затем особей разделили на 7 групп (n = 20). Первая группа представлена ложно оперированными животными (ЛО), вторая – крысами негативного контроля (НК). Обе группы получали внутрибрюшинно взвесь твина-80 в воде очищенной. Третьей и четвертой группам вводили препараты сравнения винпоцетин (3,2 мг/кг) и циннаризин (5,6 мг/кг) [15]. Пятая, шестая и седьмая группы получали экспериментальную субстанцию PIR-9 в дозах 25, 50 и 100 мг/кг, соответственно [16, 17]. Исследуемое соединение, референтные препараты и вода очищенная (с твином-80) вводились внутрибрюшинно десять дней до моделирования ишемии, последнее введение проводилось за час до операции. Церебральную ишемию воспроизводили путем необратимой окклюзии общих сонных артерий [18, 19]. В качестве наркозного средства использовали хлоралгидрат в дозе 350 мг/кг. Определяемые показатели. Через 24 часа после операции определяли летальность животных и степень неврологического дефицита по бальной шкале McGraw [20, 21]. В тесте «Открытое поле» оценивали поведенческие изменения животных (локомоторная и ориентировочно-исследовательская активность) [22]. Уровень тревож-

ности определяли с помощью теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» [23]. Оценку мнестических и когнитивных функций проводили тестами пассивного (УРПИ) и активного (ТЭИ) избегания аверсивной среды [24, 25]. Далее у крыс получали артериальную кровь из базилярных артерий, венозную – из сагитального венозного синуса для биохимических исследований. Концентрацию лактата измеряли при помощи набора реагентов «Молочная кислота Абрис +». Спектрофотометрическим методом определяли оптическую плотность (Е) (длина волны 500 нм). Расчет уровня молочной кислоты проводили по формуле: $C = 3,34 \cdot \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}}$ (ммоль/л). Потребление глюкозы головным мозгом вычисляли по разнице содержания в артериальной и венозной крови.

Статистическая обработка. Результаты, полученные в эксперименте, обрабатывали с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США, для операционной системы Windows) и Microsoft Excel 2010. Результаты выражали в виде среднего и его стандартной ошибки (M±m). Критерием Shapiro-Wilk's оценивали нормальность распределения. Параметрический t-критерий Стьюдента использовался при нормальном распределении данных. В случае ненормального распределения статистическая обработка проводилась U-критерием Мана-Уитни. Отличия считали достоверными при уровне значимости более 95% (p<0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Экспериментальная ишемия головного мозга привела к гибели 70% животных группы нелеченых крыс, неврологический дефицит выживших особей группы НК составил 7,83±0,33 баллов, у ложнооперированных животных смертности и изменений неврологической симптоматики не отмечалось [26–28] (табл. 1).

Таблица 1 – Оценка уровня летальности и тяжести неврологических нарушений на фоне введения различных дозировок соединения PIR-9 и препаратов сравнения при экспериментальной ишемии головного мозга крыс

Группа	Процент выживаемости, %	Степень неврологических нарушений, баллы
ЛО	100	–
НК	30	7,83±0,33
Винпоцетин	60	2,42±0,03#
Циннаризин	70	2,29±0,29#
PIR-9 25 мг/кг	50	3,10±0,18#
PIR-9 50 мг/кг	80	2,19±0,23#, Δ
PIR-9 100 мг/кг	60	2,58±0,27#

Примечание: # – статистически значимо относительно группы крыс НК (p<0,05), Δ – статистически значимо относительно группы крыс PIR-9 25 мг/кг (p<0,05).

ЛО – группа ложнооперированных крыс; НК – группа крыс негативного контроля; Винпоцетин – группа крыс, получавших винпоцетин (3,2 мг/кг); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25, 50, 100 мг/кг, соответственно

На фоне профилактического приема референтных препаратов винпоцетина и циннаризина выживаемость животных превысила показатель животных без фармакотерапии и составила 60% и 70%, соответственно. У группы крыс, которым вводили винпоцетин, неврологический индекс составил 2,42±0,03 баллов, что в 3,2

раза (p<0,05) было ниже аналогичного показателя нелеченых особей. Тяжесть неврологических нарушений, у животных, которым вводили циннаризин, в 3,4 раза (p<0,05) была меньше индекса группы крыс, не подверженных фармакотерапии и составила 2,29±0,29 баллов, что согласуется с данными литературы [29, 30].

Введение различных доз соединения PIR-9 в свою очередь также способствовало улучшению выживаемости (25 мг/кг – 50%, 50 мг/кг – 80%, 100 мг/кг – 60%) и уменьшению степени неврологического дефицита. Стоит отметить субстанцию PIR-9 в дозировке 50 мг/кг, выживаемость крыс, получавших данное соединение, составила 80%, что превышало показатели обоих референтных препаратов, при этом неврологический индекс на 72% ($p<0,05$) был ниже такового нелеченых крыс и на 29,4% ($p<0,05$) ниже значения группы животных, которым вводили PIR в дозе 9 25 мг/кг.

В условиях острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) наблюдалось существенное снижение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, так количество пройденных квадратов снизилось на 80% ($p<0,05$) от исходных значений, стоек на 89,5% ($p<0,05$), заглядываний на 82,1% ($p<0,05$). В сравнении с группой ложнооперированных животных локомоторная активность была ниже на 76,8% ($p<0,05$), ориентировочно-исследовательская на 87,2% ($p<0,05$) (табл. 2), что не противоречит проведенным ранее экспериментальным исследованиям [31, 32].

Таблица 2 – Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активностей в тесте «Открытое поле» на фоне введения различных дозировок соединения PIR-9 и препаратов сравнения при экспериментальной ишемии головного мозга крыс

Группа Число пройденных квадратов Стойки			Двигательная активность	Ориентировочно-исследовательская активность	
			Заглядывания		
ЛО	M±m	Исход	34,1±1,5	12,8±0,8	4,2±0,4
		Итог	28,9±2,3	11,6±1,0	4,0±0,7
НК	M±m	Исход	33,5±1,6	12,4±0,8	3,9±0,3
		Итог	6,7±0,6*	1,3±0,3*	0,7±0,3*
Винпоцетин	M±m	Исход	33,6±1,4	12,7±0,9	4,0±0,4
		Итог	14,8±1,4#	1,5±0,2	1,0±0,3
Циннаризин	M±m	Исход	32,9±1,5	12,8±0,8	4,1±0,4
		Итог	20,3±1,6#к	4,9±0,5#	2,1±0,3#
PIR-9 25 мг/кг	M±m	Исход	33,1±0,9	12,4±0,5	4,0±0,4
		Итог	11,0±1,5	3,8±0,4#к	1,6±0,2#
PIR-9 50 мг/кг	M±m	Исход	33,9±1,6	12,6±0,9	4,1±0,4
		Итог	22,3±1,2#к,Δ,▲	5,3±0,4#к,Δ,▲	2,3±0,3#к
PIR-9 100 мг/кг	M±m	Исход	33,7±1,5	12,5±0,7	4,2±0,5
		Итог	13,3±1,0#	4,0±0,4#к	1,8±0,3#

Примечание: * – статистически значимо относительно группы крыс ЛО ($p<0,05$); # – статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,05$); к – статистически значимо относительно группы крыс винпоцетина ($p<0,05$), Δ – статистически значимо относительно группы крыс PIR-9 25 мг/кг ($p<0,05$); ▲ – статистически значимо относительно группы крыс PIR-9 100 мг/кг ($p<0,05$); ЛО – группа ложнооперированных крыс; НК – группа крыс негативного контроля; Винпоцетин – группа крыс, получавших винпоцетин (3,2 мг/кг); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25, 50, 100 мг/кг, соответственно

Применение препаратов сравнения винпоцетина и циннаризина позволило частично скорректировать данные поведенческие нарушения. Двигательная активность на фоне приема кавинтона 120,9% ($p<0,05$) превысила идентичный показатель группы крыс негативного контроля. У особей, которые получали циннаризин, локомоторная активность снизилась минимально (на 38,3% ($p<0,05$)) относительно исходных показателей (32,9±1,5 квадратов), в то же время количество пройденных квадратов на 203% ($p<0,05$) превышало аналогичное значение нелеченых крыс. Также, стоит отметить, что на фоне приема циннаризина двигательная активность на 37,2% ($p<0,05$) достоверно превышала данные группы крыс, которым вводили винпоцетин. Ориентировочно-исследовательская активность при приеме циннаризина статистически значимо превысила показатели животных, не подверженных фармакотерапии (стойки в 3,8 раз ($p<0,05$), заглядывания в 3 раза ($p<0,05$)). На фоне

профилактического введения винпоцетина значимых изменений по показателям ориентировочно-исследовательской активности не отмечено [17, 30, 33].

У ишемизированных животных на фоне профилактического приема субстанции PIR-9 25 мг/кг значимых отличий по числу пройденных квадратов относительно НК группы крыс не наблюдалось. Однако ориентировочно-исследовательская активность имела положительную тенденцию изменений, так количество стоек в 2,9 раз ($p<0,05$) было выше показателя групп крыс НК и в 2,5 раза ($p<0,05$) достоверно отличалось от животных, получавших препарат сравнения винпоцетин, число заглядываний в 2,3 раза ($p<0,05$) превышало аналогичный показатель группы нелеченых животных.

При внутрибрюшинном введении вещества PIR-9 50 мг/кг локомоторная активность снизилась на 34,2% относительно исхода (33,9±1,6) и в 3,3 раза ($p<0,05$) превысила значение группы нелеченых крыс.

При этом число пройденных квадратов также достоверно превышало показатель группы особей, которые получали винпоцетин (в 1,5 раза ($p<0,05$)). Нельзя не отметить, что на фоне приема PIR-9 50 мг/кг двигательная активность была выше идентичного показателя групп крыс получавших данное соединение в дозе 25 и 100 мг/кг на 102,7% ($p<0,05$) и 67,7% ($p<0,05$) соответственно. Ориентировочно-исследовательская активность животных, которые получали PIR-9 50 мг/кг в 3,8 раз ($p<0,05$) была выше данных группы крыс НК, и в 3 раза ($p<0,05$) превышала значения животных, получавших внутривентрикулярно винпоцетин. Количество стоек у особей, на фоне введения PIR-9 50 мг/кг, статистически достоверно превосходило значения групп крыс, получавших PIR-9 25 мг/кг и 100 мг/кг на 39,5% ($p<0,05$) и 32,5% ($p<0,05$).

О степени тревожности крыс в постинсультном

периоде судили по данным теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». На фоне церебральной ишемии у животных негативного контроля наблюдалось значительное повышение уровня тревожности. У нелеченых особей отмечено уменьшение времени нахождения на центральной площадке (ВЦ) и в открытых рукавах лабиринта (ВО) на 69,9% ($p<0,05$) и 69,7% ($p<0,05$), а также увеличение времени, проведенного в закрытых рукавах (ВЗ), и груминга на 55,2% ($p<0,05$) и в 2,3 раза ($p<0,05$) по сравнению с исходными данными (табл. 3). Кроме того все вышеперечисленные показатели тревожности достоверно отличались от аналогичных значений ложнооперированных крыс, так ВЦ и ВО были ниже на 70,5% ($p<0,05$) и 69,6% ($p<0,05$), значения «время в закрытых рукавах» и «груминг» выше на 55,5% ($p<0,05$) и в 2,3 раза ($p<0,05$), что также находит отражение в источниках литературы [34].

Таблица 3 – Оценка изменения уровня тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на фоне введения различных дозировок соединения PIR-9 и препаратов сравнения при экспериментальной ишемии головного мозга крыс

Группа		Время нахождения в центральном квадрате (сек.)	Время в открытых рукавах лабиринта (сек.)	Время в закрытых рукавах лабиринта (сек.)	Груминг (количество актов)
		М±m			
ЛО	Исход	26,7±2,1	50,7±4,6	102,6±5,3	3,6±0,5
	Итог	28,1±2,4	51,6±4,4	100,3±5,0	3,4±0,7
НК	Исход	27,6±2,5	51,9±3,9	100,5±4,7	3,4±0,6
	Итог	8,3±2,0#	15,7±2,4#	156,0±1,5#	7,7±0,9#
Винпоцетин	Исход	27,1±2,5	51,3±3,5	101,6±4,4	3,5±0,6
	Итог	17,8±2,0#	28,3±3,5	133,8±2,9#	2,7±0,6#
Циннаризин	Исход	27,5±1,9	50,6±3,2	101,9±2,7	3,3±0,7
	Итог	16,1±3,0#	34,0±3,0#	129,9±4,8#	3,6±0,6#
PIR-9 25 мг/кг	Исход	27,3±2,3	52,2±4,6	100,5±5,0	3,6±0,6
	Итог	11,6±1,9	22,8±3,7	145,6±2,7	3,4±0,9#
PIR-9 50 мг/кг	Исход	26,8±2,2	53,0±4,8	100,2±4,9	3,5±0,6
	Итог	23,1±2,5#, Δ, ▲	47,6±3,0#, κ, μ, Δ, ▲	109,3±4,6#, κ, μ, Δ, ▲	2,4±0,6#
PIR-9 100 мг/кг	Исход	25,5±2,6	50,8±4,4	103,7±5,0	3,3±0,6
	Итог	14,2±2,5	21,8±3,1	144,0±3,8	3,3±0,7#

Примечание: * – статистически значимо относительно группы крыс ЛО ($p<0,05$); # – статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,05$); κ – статистически значимо относительно группы крыс винпоцетина ($p<0,05$); μ – статистически значимо относительно группы крыс циннаризина ($p<0,05$); Δ – статистически значимо относительно группы крыс PIR-9 25 мг/кг ($p<0,05$); ▲ – статистически значимо относительно группы крыс PIR-9 100 мг/кг ($p<0,05$)

ЛО – группа ложнооперированных крыс; НК – группа крыс негативного контроля; Винпоцетин – группа крыс, получавших винпоцетин (3,2 мг/кг); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25, 50, 100 мг/кг, соответственно.

На фоне профилактического введения винпоцетина относительно крыс, не подверженных фармакотерапии, достоверно изменились такие показатели как: «время в центре» (на 114,5% ($p<0,05$)), «время в закрытых рукавах» (на 14,2% ($p<0,05$)) и «груминг» (в 2,9 раз ($p<0,05$)). У животных, которые получали препарат сравнения циннаризин отмечено изменение всех изучаемых показателей: ВЦ выше на 94% ($p<0,05$), ВО выше на 116,6% ($p<0,05$), ВЗ ниже на

16,7% ($p<0,05$), груминг ниже в 2,3 раза ($p<0,05$) аналогичных значений крыс группы негативного контроля [16].

Среди различных дозировок исследуемого вещества PIR-9 отличилась доза 50 мг/кг, так время в центральной зоне и в открытых рукавах лабиринта превысило значения группы крыс без фармакотерапии (на 178,3% ($p<0,05$) и 203,2% ($p<0,05$)), кроме того по показателю ВО данное соединение на 68,2% ($p<0,05$)

и 40% ($p < 0,05$) статистически достоверно было выше групп крыс, которым вводили винпоцетин и циннаризин. Время, проведенное в закрытых рукавах лабиринта, у крыс, получавших PIR-9, было ниже значения нелеченых крыс на 29,9% ($p < 0,05$), а также групп особей, после введения винпоцетина и циннаризина на 18,3% ($p < 0,05$) и 15,9% ($p < 0,05$) соответственно. Субстанция PIR-9 в дозах 25 и 100 мг/кг по показателю «количество актов груминга» в 2,3 раза ($p < 0,05$) достоверно отличалось у обеих групп от нелеченых животных. При сравнении уровня тревожности на фоне введения всех дозировок вещества под шифром PIR-9 выявлены достоверные отличия по показателям «вре-

мя в центре», «время в открытых рукавах» и «время в закрытых рукавах» у группы, получавшей дозировку 50 мг/кг, относительно крыс, которым вводили 25 и 100 мг/кг, что может свидетельствовать о положительной динамике уменьшения степени тревожности у крыс, получавших PIR-9 именно в дозе 50 мг/кг.

В условиях острого нарушения мозгового кровообращения количество животных группы негативного контроля справившихся с тестом условного рефлекса пассивного избегания сократилось до 33,3%, время захода в темную камеру увеличилось лишь на 30,7% от данных до моделирования ишемии ($28,7 \pm 2,6$ секунд) (рис. 1) [32].

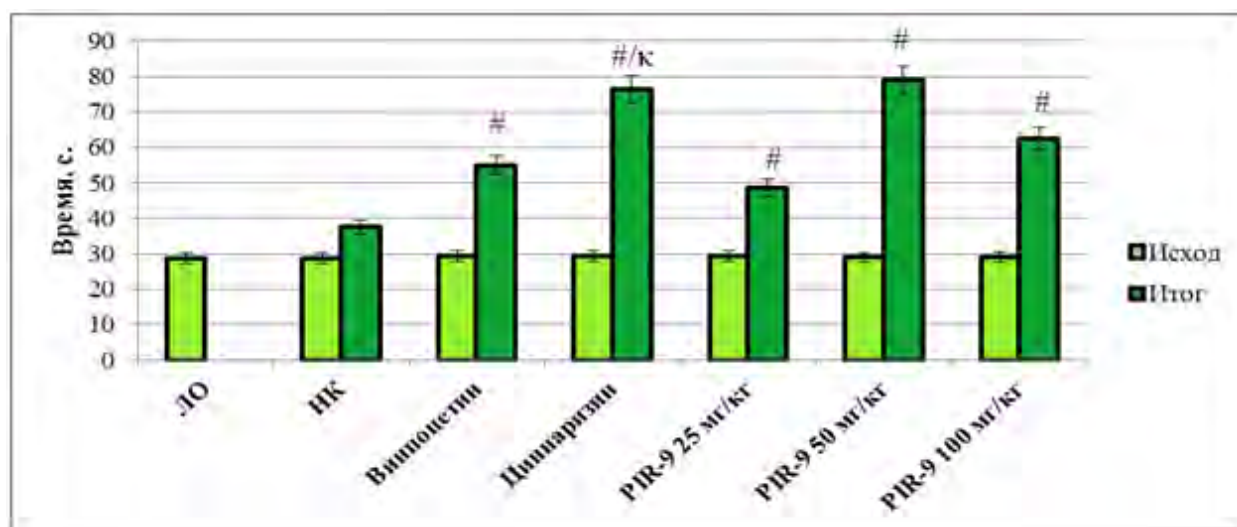


Рисунок 1 – Оценка изменения латентного периода захода крыс в темный отсек в тесте УРПИ на фоне введения различных дозировок соединения PIR-9 и препаратов сравнения при экспериментальной ишемии головного мозга крыс

Примечание: # – статистически значимо относительно группы крыс НК ($p < 0,05$); к – статистически значимо относительно группы крыс кавинтона ($p < 0,05$)

ЛО – группа ложнооперированных крыс; НК – группа крыс негативного контроля; Кавинтон – группа крыс, получавших кавинтон (3,2 мг/кг); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25, 50, 100 мг/кг, соответственно

Число крыс, получавших референтные препараты винпоцетин и циннаризин, повторно посетивших темный отсек УРПИ, составило 50% и 43%, соответственно. Время захода группы крыс, получавших винпоцетин, превысило значение группы НК на 46,7% ($p < 0,05$), а получавших циннаризин – на 103,5% ($p < 0,05$). При этом у животных, которым вводили циннаризин время посещения темной камеры на 27,9% ($p < 0,05$) было значимо больше показателя крыс, на фоне приема винпоцетина, что сопоставимо с литературными данными [14].

У животных, получавших внутривенно PIR-9 25, 50 и 100 мг/кг, количество особей вновь посетивших темный отсек составило 40%, 12,5% и 33%, соответственно. Прием всех дозировок субстанции PIR-9 привел к достоверному увеличению времени посещения темной камеры, в сравнении и животными, не получавшими фармакологическую поддержку. Так, в условиях получения PIR-9 25 мг/кг время было выше на 29,3% ($p < 0,05$), на фоне приема 100 мг/кг вещества – на 66,7% ($p < 0,05$) относительно особей группы НК. Наи-

большее увеличение времени посещения темного отсека наблюдалось на фоне приема PIR-9 в дозе 50 мг/кг (на 110,7% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК).

В условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий 66,7% крыс негативного контроля не справились с тестом экстраполяционного избегания, время подныривания у животных, выполнивших задачу, незначительно снизилось относительно данных до операции ($57,1 \pm 4,3$ сек.) (рис. 2) [32].

Введение винпоцетина и циннаризина увеличило количество животных, выполняющих экстраполяционный тест до 50% и 43%, соответственно. Время на решение задачи у крыс, которым вводили винпоцетин, незначительно снизилось как в сравнении с исходными значениями, так и относительно группы крыс НК. Латентный период подныривания особей, получавших циннаризин, значимо сократился на 73,9% ($p < 0,05$), относительно нелеченых крыс, период решения задачи на 69,3% ($p < 0,05$) также достоверно превышал такой показатель крыс группы винпоцетина [14].

Минимальное количество крыс, не решивших ТЭИ, на фоне приема PIR-9 в различных дозировках отмечено при введении данного соединения в дозе 50 мг/кг и составило 25%. Число животных, не справившихся с экстраполяционной задачей, при приеме PIR-9 25 и 100 мг/кг составило 40% и 33%, соответственно.

Период выполнения задачи у особей, получав-

ших PIR-9 50 мг/кг, отличался как от группы крыс НК на 63,42% ($p < 0,05$), так и от животных, которым вводили винпоцетин на 57,1% ($p < 0,05$). В сравнении с животными, получавшими субстанцию PIR-9 в дозировках 25 и 100 мг/кг у крыс, которым вводили данное соединение в дозе 50 мг/кг, время на решение экстраполяционной задачи было меньше на 55,2% ($p < 0,05$) и 38,1% ($p < 0,05$).

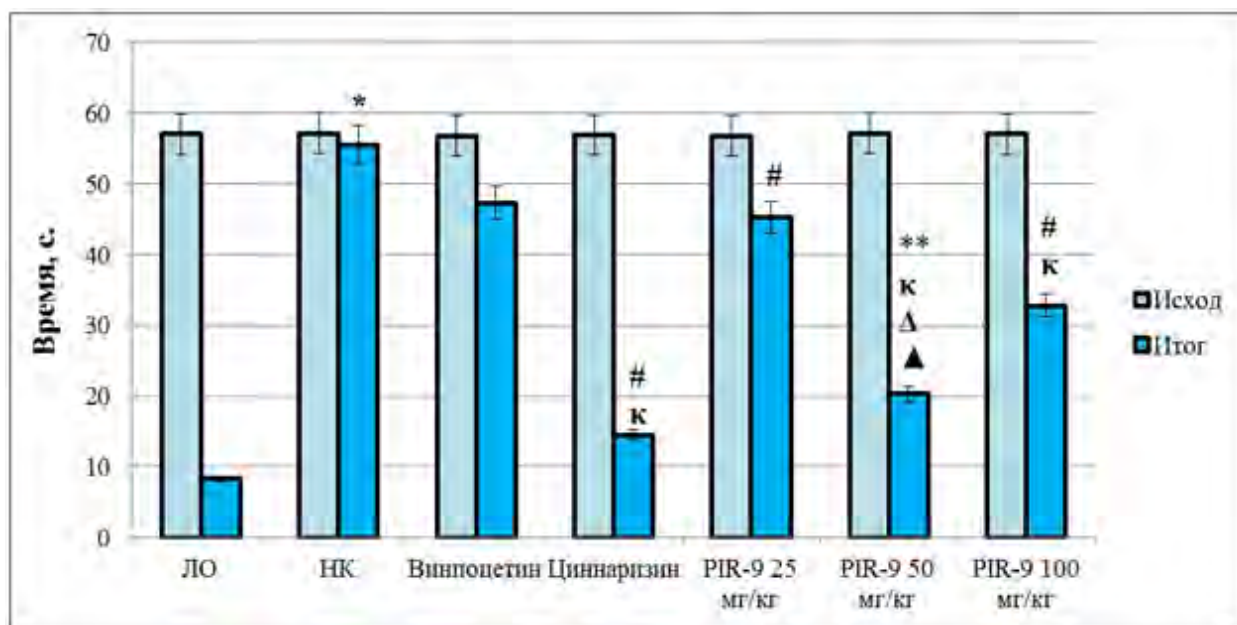


Рисунок 2 – Оценка изменения латентного периода подныривания крыс в тесте экстраполяционного избегания на фоне введения различных дозировок соединения PIR-9 и препаратов сравнения при экспериментальной ишемии головного мозга крыс

Примечание: * – статистически значимо относительно группы крыс ЛО ($p < 0,05$); # – статистически значимо относительно группы крыс НК ($p < 0,05$); k – статистически значимо относительно группы крыс винпоцетина ($p < 0,05$); Δ – статистически значимо относительно группы крыс PIR-9 25 мг/кг ($p < 0,05$); ▲ – статистически значимо относительно группы крыс PIR-9 100 мг/кг ($p < 0,05$).

ЛО – группа ложнооперированных крыс; НК – группа крыс негативного контроля; Винпоцетин – группа крыс, получавших винпоцетин (3,2 мг/кг); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25, 50, 100 мг/кг, соответственно

Из таблицы 4 видно, что у нелеченых животных на фоне церебральной ишемии головного мозга наблюдался значительный лактатацидоз ($11,35 \pm 0,08$ ммоль/л), что в 5,6 раз ($p < 0,05$) превышало показатель ложнооперированных особей [36].

У животных, которым вводили препарат сравнения винпоцетин, концентрация молочной кислоты на 57,5% ($p < 0,05$) была ниже, а у особей, получавших циннаризин – на 62,7% ($p < 0,05$) ниже идентичного показателя крыс, не получавших фармакологическую поддержку [17].

Введение соединения PIR-9 в дозе 25 мг/кг привело к снижению лактата на 54,1% ($p < 0,05$) относительно крыс НК, в дозах 50 и 100 мг/кг на 68,8% ($p < 0,05$) и 56,4% ($p < 0,05$), соответственно. Прием субстанции PIR-9 50 мг/кг привел к достоверному уменьшению концентрации молочной кислоты на 26,6% ($p < 0,05$) в сравнении с винпоцетином и на 16,3 ($p < 0,5$) относительно группы крыс циннаризина. Необходимо отметить, что уровень лактата был достоверно ниже на

фоне введения PIR-9 50 мг/кг относительно доз 25 и 100 мг/кг на 32,1% ($p < 0,05$) и 28,5% ($p < 0,05$).

Потребление глюкозы тканями мозга ложнооперированных животных составило 23,51%, у группы нелеченых крыс на фоне острого нарушения мозгового кровообращения аналогичный показатель был в 3,3 раза ($p < 0,05$) меньше и составил 4,3% (табл. 4) [36].

Профилактическое введение винпоцетина и циннаризина способствовало улучшению утилизации глюкозы до 12,5% и 10,19% соответственно, что достоверно ($p < 0,05$) отличалось от животных, не получавших фармакологическую поддержку. При этом значимые отличия наблюдались и между самими группами препаратов сравнения, так потребление глюкозы крысами, получавшими винпоцетин, было на 20,6% ($p < 0,05$) выше идентичного показателя крыс, которым вводили циннаризин [17, 37].

Введение соединения PIR-9 в дозе 50 мг/кг привело к наиболее значимому увеличению артериовенозной разницы до 15,07%. Этот показатель на

34,3% превосходил данные группы крыс, получавших циннаризин. Нельзя не отметить, что потребление глюкозы на 107,6% ($p<0,05$) и 67,1% ($p<0,05$)

было выше у группы особей, которым вводили PIR-9 50 мг/кг относительно крыс, получавших дозировки 25 и 100 мг/кг соответственно.

Таблица 4 – Концентрация молочной кислоты в плазме крови и потребление глюкозы мозговой тканью на фоне введения различных дозировок соединения PIR-9 и препаратов сравнения при экспериментальной ишемии головного мозга крыс

Группа	Лактат, ммоль/л	Потребление глюкозы, ммоль/л
ЛО	2,02±0,08	1,46±0,05
НК	11,35±0,08*	0,44±0,08*
Винпоцетин	4,82±0,2#	1,23±0,07#/ μ
Циннаризин	4,23±0,09#	1,02±0,03#
PIR-9 25 мг/кг	5,21±0,15#	0,66±0,08
PIR-9 50мг/кг	3,54±0,16#/ $\kappa/\mu/\Delta/\blacktriangle$	1,37±0,05#/ $\mu/\Delta/\blacktriangle$
PIR-9 100мг/кг	4,95±0,14#	0,82±0,03#

Примечание: * – статистически значимо относительно группы крыс ЛО ($p<0,05$); # – статистически значимо относительно группы крыс НК ($p<0,05$); κ – статистически значимо относительно группы крыс винпоцетина ($p<0,05$); μ – статистически значимо относительно группы крыс циннаризина ($p<0,05$); Δ – статистически значимо относительно группы крыс PIR-9 25 мг/кг ($p<0,05$); $\blacktriangle$ – статистически значимо относительно группы крыс PIR-9 100 мг/кг ($p<0,05$);

ЛО – группа ложнооперированных крыс; НК – группа крыс негативного контроля; Винпоцетин – группа крыс, получавших винпоцетин (3,2 мг/кг); Циннаризин – группа крыс, получавших циннаризин (5,6 мг/кг); PIR-9 25, 50, 100 мг/кг – группы крыс, получавших субстанцию PIR-9 в дозировках 25, 50, 100 мг/кг, соответственно

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Билатеральная окклюзия общих сонных артерий вызывает смертность 70% особей группы негативного контроля, при этом у выживших животных степень неврологических нарушений достигает 7,83±0,33 баллов. В условиях экспериментальной церебральной ишемии у нелеченых животных наблюдалось выраженное снижение двигательной (на 80% ($p<0,05$) от исходных значений) и ориентировочно-исследовательской активности (стойко на 89,5% ($p<0,05$), заглядываний на 82,1% ($p<0,05$) от исходных показателей), повышение уровня тревожности, а также снижение когнитивно-мнестических функций. Кроме того, в постишемическом периоде у крыс, не подверженных фармакотерапии, отмечалось снижение потребления глюкозы тканями мозга в 3,3 раза ($p<0,05$) и увеличение содержания молочной кислоты в 5,6 раз ($p<0,05$) относительно ложнооперированных животных.

Профилактическое введение производного пириимидина под лабораторным шифром PIR-9 в различных дозировках (25, 50 и 100 мг/кг) позволило частично скорректировать нарушения, возникшие на фоне необратимой окклюзии общих сонных артерий крыс. Наилучшие результаты отмечены на фоне введения соединения PIR-9 50 мг/кг. Так, выживаемость животных, получавших PIR-9 50 мг/кг,

достигла 80%, неврологический индекс при этом составил 2,19±0,23 баллов, что достоверно отличалось от идентичного показателя крыс группы НК (на 72% ($p<0,05$)) и группы крыс, которым вводили PIR-9 25 мг/кг (на 29,4% ($p<0,05$)). По показателям локомоторной, ориентировочно-исследовательской и мнестической активности данное производное пириимидина также оказалось наиболее активным в дозе 50 мг/кг. Соединение PIR-9 50 мг/кг привело к статистически значимому уменьшению концентрации молочной кислоты на 26,6% ($p<0,05$) относительно группы винпоцетина и на 16,3 ($p<0,5$) в сравнении с группой крыс, получавших циннаризин. Потребление глюкозы мозговой тканью на фоне введения PIR-9 (50 мг/кг) на 34,3% ($p<0,05$) превосходило аналогичный показатель крыс, которым вводили циннаризин, и на 107,6% ($p<0,05$) и 67,1% ($p<0,05$) было выше значений животных, которым вводили PIR-9 в дозах 25 и 100 мг/кг соответственно.

Таким образом, можно сделать вывод, что при изучении зависимости «доза-эффект» субстанция PIR-9 проявляет наиболее выраженное церебротропное действие в дозировке 50 мг/кг сопоставимое с эффектом референтного препарата циннаризина (5,6 мг/кг) и превосходящее эффект винпоцетина (3,2 мг/кг).

INTRODUCTION. Disorders of cerebral hemodynamics belong to one of the key positions among the causes of early mortality, high levels of disability and incapacitation of the population, acquiring not only medical but also socio-economic significance [1–6].

Every year the number of patients with vascular lesions is steadily increasing, so there are about 1 million cases of ischemic stroke in economically developed

countries annually, and by 2030 this figure is projected to increase up to 3.4 million [7]. In the Russian Federation, every year about 500,000 cases of ischemic stroke are registered [1], which undoubtedly makes the problem of prevention and treatment of ischemic diseases one of the most urgent today [8, 9].

To reduce cerebrovascular pathologies in pharmacotherapy, a large number of drugs with anti-ischemic prop-

erties are used, however, these drugs do not fully satisfy practitioners, resulting in new medical goals and objectives, pharmacology faces in the field of targeted search and study of new compounds with cerebrotropic activity [10].

On the basis of pyrimidine derivatives, a large number of new biologically active substances are created [11–13]. Earlier, the cerebroprotective activity of the pyrimidin – 4(1H)- one derivative was studied under the laboratory code PIR-9, synthesized at the Department of Organic Chemistry of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-Branch of the FSBI of HE VolgSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation [14].

As a result, the question of studying the dose-effect relationship of PIR-9 substance under conditions of irreversible occlusion of the common carotid arteries has become relevant.

The aim of the article is to study the dose-dependent cerebrotropic effect of a pyrimidine derivative under code PIR-9 against the background of experimental cerebral ischemia in rats.

MATERIALS AND METHODS.

Animals. The rats obtained from the mouse bank of “Rappolovo” (St. Petersburg) were used as laboratory animals. All manipulations performed on the individuals were performed in accordance with international norms of experimental ethics (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 22 June, 1998.)) and with the requirements of good laboratory practices (GLP). The animals were placed in macrolon cells with lattice steel lids and a forage well. The litter material was non-coniferous sawdust. During the experiment all the rats were kept in standard vivarium conditions (humidity – $65 \pm 5\%$, temperature – $22 \pm 2^\circ\text{C}$). Individuals were under natural light with free access to food and water. The cages, bedding and drinkers changed as they became soiled.

Study design. The study was performed on 140 male Wistar rats ($m = 170\text{--}190\text{ g}$). Before the experiment, the animals were randomized by weight and behavioral activity in the “Open field test” (OFT) and “Elevated plus maze” (EPM), then the individuals were divided into 7 groups ($n = 20$). The first group was represented by falsely operated animals (FO), the second one – by negative control rats (NC). The both groups received an intraperitoneal suspension of Tween-80 in purified water. Comparison drugs Vinpocetine (3.2 mg/kg) and Cinnarizine (5.6 mg/kg) were administered to the third and fourth groups [15]. The fifth, sixth and seventh groups received the experimental substance PIR-9 at the doses of 25, 50 and 100 mg/kg, respectively [16, 17]. The test compound, reference preparations, and purified water (with Tween-80) were injected intraperitoneally ten days before ischemia stimulation, the last injection was carried out one hour before the operation. Cerebral ischemia was reproduced by irreversible occlusion of the common carotid arteries [18, 19]. Chloral hydrate was used as an anesthetic agent at the dose of 350 mg/kg.

Determined indicators. After 24 hours after surgery, lethality of the animals and the degree of neurological de-

ficiency were determined on the McGraw score scale [20, 21]. In the “Open field test”, behavioral changes in animals were evaluated (locomotor and orienting-research activity) [22]. The level of anxiety was determined using the test “Elevated plus maze” [23]. The evaluation of mnemonic and cognitive functions was carried out by tests of conditioned passive avoidance reflex (CPAR) and active avoidance reflex (AAR) of the aversive environment [24, 25]. Further, arterial blood from the basilar arteries, venous blood from the sagittal venous sinus was received for biochemical studies. The lactate concentration was measured using the “Lactic Abris +” reagent kit. The optical density (E) was determined spectrophotometrically (wavelength = 500 nm). The calculation of the lactic acid level was carried out according to the formula: $C = 3.34 \cdot \text{Samples/Calibrator (mmol/l)}$. Brain glucose consumption was calculated from the difference in arterial and venous blood.

Statistical processing. The results obtained in the experiment were processed using the software package STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., USA, for Windows operating system) and Microsoft Excel 2010. The results were expressed as mean and standard error ($M \pm m$). The normality of the distribution was assessed by Shapiro-Wilk’s criterion. Parametric Student’s test was used for normal data distribution. In the case of abnormal distribution, statistical processing was carried out by Mann-Whitney U test. The differences were considered significant at the significance level of more than 95% ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION. Experimental cerebral ischemia led to the death of 70% of animals in the untreated rats group, the neurological deficiency of the survived individuals of the NC group was 7.83 ± 0.33 points, mortality and changes in the neurological symptoms were not observed in the false-operated animals [26–28] (Table 1). Against the background of the prophylactic administration of Vinpocetine and Cinnarizine reference preparations, the survival rate of animals exceeded that of animals without pharmacotherapy and was 60% and 70%, respectively. In the group of rats that were injected with Vinpocetine, the neurological index was 2.42 ± 0.03 points, which was 3.2 times ($p < 0.05$) lower than that of untreated individuals. The severity of neurological disorders in animals injected with Cinnarizine, was 3.4 times ($p < 0.05$) less than the index of the group of rats not subjected to pharmacotherapy and was 2.29 ± 0.29 points, which is consistent with the literature data [29, 30].

The administration of various doses of the PIR-9 compound, in turn, also helped to improve the survival (25 mg/kg – 50%, 50 mg/kg – 80%, 100 mg/kg – 60%) and reduce the degree of neurological deficiency. It is worth noting that substance PIR-9 at the dosage of 50 mg/kg: the survival rate of the rats treated with this compound, was 80%, which exceeded the performance of both reference preparations, while the neurological index was 72% ($p < 0.05$) lower than that of the untreated rats and by 29.4% ($p < 0.05$) below the value of the group of animals that had been injected with PIR-9 at the dose of 25 mg/kg.

Table 1 – Assessment of the mortality level and severity of neurological disorders against the background of the administration of various dosages of PIR-9 compound and the comparison drugs in experimental cerebral ischemia in rats

Group	Survival percentage, %	Degree of neurological disorders, points
FO	100	-
NC	30	7.83±0.33
Vinpocetine	60	2.42±0.03#
Cinnarizine	70	2.29±0.29#
PIR-9 25 mg/kg	50	3.10±0.18#
PIR-9 50 mg/kg	80	2.19±0.23#, Δ
PIR-9 100 mg/kg	60	2.58±0.27#

Note: # – statistically significant relative to the group of NC rats ($p < 0.05$),

Δ – statistically significant relative to the group of PIR-9 25 mg/kg ($p < 0.05$) rats

FO is a group of false-operated rats;

NC is a group of negative control rats;

Vinpocetine – a group of rats treated with Vinpocetine (3.2 mg/kg);

Cinnarizine – a group of rats treated with Cinnarizine (5.6 mg/kg);

PIR-9 25, 50, 100 mg/kg – groups of rats treated with substance PIR-9 in dosages of 25, 50, 100 mg/kg, respectively

In conditions of Acute Cerebrovascular Event (ACE), a significant decrease in motor and research activity was observed, so the number of passed squares decreased by 80% ($p < 0.05$) from the baseline values; the number of stands decreased by 89.5% ($p < 0.05$); the number of peeps decreased by 82.1% ($p < 0.05$). In comparison with the group of false-operated animals, locomotor activity was lower by 76.8% ($p < 0.05$), approximately by 87.2% ($p < 0.05$) (Table 2), which does not contradict the previously conducted experimental studies [31, 32].

The use of reference substances – Vinpocetine and Cinnarizine – made it possible to partially correct these behavioral disorders. The motor activity in the rats receiving Cavinton 120.9% ($p < 0.05$) exceeded the identical indicator in the group of negative control rats. In individuals that had received Cinnarizine, the locomotor activity decreased minimally (by 38.3% ($p < 0.05$)) relative to the baseline (32.9 ± 1.5 squares), while the number of the covered squares exceeded the similar value of the untreated rats by 203% ($p < 0.05$). It is also worth noting that, against the background of taking Cinnarizine, the motor activity was 37.2% ($p < 0.05$) significantly higher than that of the groups of rats injected with Vinpocetine. When taking Cinnarizine, the orienting-research activity statistically significantly exceeded the performance of animals not subjected to pharmacotherapy (stands by 3.8 times ($p < 0.05$), drops by 3 times ($p < 0.05$)). Against the background of the prophylactic administration of Vinpocetine, no significant changes were observed in terms of orienting-research activity [17, 30, 33]. Against the background of prophylactic administration of substance PIR-9 at the dose of 25 mg/kg, in ischemic animals the signifi-

cant differences in the number of passed squares relative to the NC group of rats, were not observed. However, the orienting- research activity had a positive trend in changes, since the number of stands was 2.9 times ($p < 0.05$) higher than the index in the NC rat groups and 2.5 times ($p < 0.05$) significantly different from the animals receiving the reference drug Vinpocetine, the number of peeps was 2.3 times ($p < 0.05$) higher than the same index in the group of untreated animals.

After intraperitoneal administration of the PIR-9 substance at the dose of 50 mg/kg, locomotor activity decreased by 34.2% compared to the outcome (33.9 ± 1.6) and by 3.3 times ($p < 0.05$) exceeded the value of the group of untreated rats. At the same time, the number of the covered squares also reliably exceeded the index of the group of individuals that received Vinpocetine (by 1.5 times ($p < 0.05$)). It should be noted that while receiving PIR-9 at the dose of 50 mg/kg, the physical activity was higher than the identical index of the groups of rats receiving this compound at the doses of 25 and 100 mg/kg by 102.7% ($p < 0.05$) and 67.7 % ($p < 0.05$), respectively.

Orienting- research activity of the animals that had received PIR-9 at the dose of 50 mg/kg was 3.8 times ($p < 0.05$) higher than the data of the group of NC rats, and 3 times ($p < 0.05$) exceeded the values of the animals that had received Vinpocetine intraperitoneally. The number of stands in individuals, against the background of the administration of PIR-9 at the dose of 50 mg/kg, statistically significantly exceeded the values of groups of the rats treated with PIR-9 25 mg/kg and 100 mg/kg by 39.5% ($p < 0.05$) and by 32, 5% ($p < 0.05$).

Table 2 – Assessment of motor and orienting-research activities in the “Open field test” against the background of the administration of various dosages of the PIR-9 compound and reference substances in experimental cerebral ischemia in rats

Group			Movement activity	Orienting- research activity	
			Number of squares	Stands	Peeps
FO	M±m	Outcome	34.1±1.5	12.8±0.8	4.2±0.4
		Total	28.9±2.3	11.6±1.0	4.0±0.7
NC	M±m	Outcome	33.5±1.6	12.4±0.8	3.9±0.3
		Total	6.7±0.6*	1.3±0.3*	0.7±0.3*
Vinpocetine	M±m	Outcome	33.6±1.4	12.7±0.9	4.0±0.4
		Total	14.8±1.4#	1.5±0.2	1.0±0.3
Cinnarizine	M±m	Outcome	32.9±1.5	12.8±0.8	4.1±0.4
		Total	20.3±1.6#,#,κ	4.9±0.5#	2.1±0.3#
PIR-9 25 mg/kg	M±m	Outcome	33.1±0.9	12.4±0.5	4.0±0.4
		Итог	11.0±1.5	3.8±0.4#,#,κ	1.6±0.2#
PIR-9 50 mg/kg	M±m	Outcome	33.9±1.6	12.6±0.9	4.1±0.4
		Total	22.3±1.2 #,κ, Δ, ▲	5.3±0.4 #, κ, Δ, ▲	2.3±0.3#,#,κ
PIR-9 100 mg/kg	M±m	Outcome	33.7±1.5	12.5±0.7	4.2±0.5
		Total	13.3±1.0#	4.0±0.4#,#,κ	1.8±0.3#

Note: * – statistically significant relative to the group of FO rats ($p < 0.05$);

– statistically significant relative to the group of NC rats ($p < 0.05$);

κ – statistically significant relative to the group of Vinpocetine rats ($p < 0.05$), Δ – statistically significant relative to the group of PIR-9 25 mg/kg ($p < 0.05$) rats;

▲ – statistically significant relative to the group of PIR-9 100 mg/kg ($p < 0.05$) rats;

FO is a group of false-operated rats; NC is a group of negative control rats;

Vinpocetine – a group of rats treated with Vinpocetine (3.2 mg/kg);

Cinnarizine – a group of rats treated with Cinnarizine (5.6 mg/kg);

PIR-9 25, 50, 100 mg/kg – groups of rats treated with the PIR-9 substance in dosages of 25, 50, 100 mg/kg, respectively

The degree of anxiety of rats in the post-ischemic period was judged according to the data of the “Elevated plus maze” test. Against the background of cerebral ischemia in animals of the negative control, a significant increase in anxiety level was observed. In untreated individuals, the time spent in the central square (CS) and in the open arms of the labyrinth (OA) decreased by 69.9% ($p < 0.05$) and 69.7% ($p < 0.05$), as well as the increase in time conducted in the enclosed arms of the labyrinth (EA), and grooming by 55.2% ($p < 0.05$) and 2.3 times ($p < 0.05$) as compared with the initial data (Table 3).

In addition, all the above indicators of anxiety were significantly different from similar values of false-operated rats, so the indicators of the central square and the open arms of the labyrinth were lower by 70.5% ($p < 0.05$) and 69.6% ($p < 0.05$), the values of “the time in enclosed arms” and “grooming” are by 55.5% higher ($p < 0.05$) and 2.3 times more ($p < 0.05$), which is also reflected in the literature [34]. Against the background of prophylactic administration of Vinpocetine relative to the rats not subjected to pharmacotherapy, such indicators as “the time in the center” (by 114.5% ($p < 0.05$)), “the time in enclosed arms” (by 14.2% ($p < 0.05$)) and “grooming” (2.9 times ($p < 0.05$)). In the animals that had received Cinnarizine as a reference substance, the change of all the studied parameters was noted: the

indicators in the central square were higher by 94% ($p < 0.05$), the indicators in the open arms of the labyrinth (OA) were higher by 116.6% ($p < 0.05$), and the indicators in the enclosed arms of the labyrinth were higher by 16.6% ($p < 0.05$), grooming was 2.3 times lower ($p < 0.05$) than similar values of negative control group rats [16].

Among the different dosages of the PIR-9 substance, the dose of 50 mg/kg came to the top, so the time in the central zone and in the open arms of the maze exceeded the values of the group of rats without pharmacotherapy (by 178.3% ($p < 0.05$) and 203.2% ($p < 0.05$)); in addition, in terms of the open arms of the labyrinth, this compound was 68.2% ($p < 0.05$) and 40% ($p < 0.05$) statistically significantly higher than in the groups of rats that were injected with Vinpocetine and Cinnarizine.

The time spent in the in the enclosed arms of the labyrinth by the rats treated with PIR-9, was by 29.9% lower than that of untreated rats ($p < 0.05$), as well as of the groups of the individuals after administration of Vinpocetine and Cinnarizine, by 18.3% ($p < 0.05$) and 15.9% ($p < 0.05$), respectively. The PIR-9 substance in the doses of 25 and 100 mg/kg in terms of the “number of grooming acts” was 2.3 times ($p < 0.05$) significantly different in both groups from untreated animals. When comparing the level of anxiety against the background of the admin-

istration of all the dosages of the substance under PIR-9 code, significant differences were found in the indicators “time in the center”, “time in the open arms” and “time in enclosed arms” in the group that received a dosage of

50 mg/kg, relative to the rats that had been injected with 25 and 100 mg/kg, which may indicate a positive trend in reducing the degree of anxiety in the rats treated with PIR-9 at the dose of 50 mg/kg.

Table 3 – Assessment of the changes in the level of anxiety in the “Elevated plus maze” test against the background of the administration of various dosages of the PIR-9 compound and reference substances in experimental cerebral ischemia in rats

Group		Time spent in the central square (sec.)	Time in the open arms of the labyrinth (sec.)	Time in the enclosed arms of the labyrinth (sec.)	Grooming (number of acts)
		M±m			
FO	Outcome	26.7±2.1	50.7±4.6	102.6±5.3	3.6±0.5
	Total	28.1±2.4	51.6±4.4	100.3±5.0	3.4±0.7
NC	Outcome	27.6±2.5	51.9±3.9	100.5±4.7	3.4±0.6
	Total	8.3±2.0#	15.7±2.4#	156.0±1.5#	7.7±0.9#
Vinpocetine	Outcome	27.1±2.5	51.3±3.5	101.6±4.4	3.5±0.6
	Total	17.8±2.0#	28.3±3.5	133.8±2.9#	2.7±0.6#
Cinnarizine	Outcome	27.5±1.9	50.6±3.2	101.9±2.7	3.3±0.7
	Total	16.1±3.0#	34.0±3.0#	129.9±4.8#	3.6±0.6#
PIR-9 25 mg/kg	Outcome	27.3±2.3	52.2±4.6	100.5±5.0	3.6±0.6
	Total	11.6±1.9	22.8±3.7	145.6±2.7	3.4±0.9#
PIR-9 50 mg/kg	Outcome	26.8±2.2	53.0±4.8	100.2±4.9	3.5±0.6
	Total	23.1±2.5#,Δ,▲	47.6±3.0#,κ,μ Δ,▲	109.3±4.6#,κ,μ Δ,▲	2.4±0.6#
PIR-9 100 mg/kg	Outcome	25.5±2.6	50.8±4.4	103.7±5.0	3.3±0.6
	Total	14.2±2.5	21.8±3.1	144.0±3.8	3.3±0.7#

Note: * – statistically significant relative to the group of FO rats ($p < 0.05$);

– statistically significant relative to the group of NC rats ($p < 0.05$);

κ – statistically significant relative to the group of Vinpocetine rats ($p < 0.05$);

μ – statistically significant relative to the group of Cinnarizine rats ($p < 0.05$);

Δ – statistically significant relative to the group of PIR-9 25 mg/kg ($p < 0.05$) rats;

▲ – statistically significant relative to the group of PIR-9 100 mg/kg ($p < 0.05$) rats

FO – a group of false-operated rats;

NC – a group of negative control rats;

Vinpocetine – a group of rats treated with Vinpocetine (3.2 mg/kg);

Cinnarizine – a group of rats treated with Cinnarizine (5.6 mg/kg);

PIR-9 25, 50, 100 mg/kg – groups of rats treated with the PIR-9 substance in dosages of 25, 50, 100 mg/kg, respectively.

Under conditions of acute cerebrovascular event, the number of animals in the negative control group who coped with the passive avoidance conditioned reflex test was reduced to 33.3%, the time of entering the dark chamber increased by only 30.7% from the data before ischemia modeling (28.7 ± 2.6 seconds) (Fig. 1) [32].

The numbers of rats receiving reference preparations Vinpocetine and Cinnarizine, re-visiting the dark section of the conditioned passive avoidance reflex, was 50% and 43%, respectively. The time of the arrival of the group of rats treated with Vinpocetine exceeded the value in the NC group by 46.7% ($p < 0.05$), and those receiving Cinnarizine – by 103.5% ($p < 0.05$). At the same time, in animals that were injected with Cinnarizine, the time of visiting the dark chamber was significantly higher (by 27.9% ($p < 0.05$)), than that of rats while taking Vinpocetine,

which is comparable with the literature data [14]. In the animals receiving PIR-9 25, 50 and 100 mg/kg intraperitoneally, the number of individuals visiting the dark compartment was 40%, 12.5% and 33%, respectively. The acceptance of all the dosages of the PIR-9 substance led to a significant increase in the time of visiting the dark chamber, in comparison with the animals that did not receive any pharmacological support.

Thus, under the conditions of obtaining PIR-9 at the dose 25 mg/kg, the time was higher by 29.3% ($p < 0.05$), while receiving 100 mg/kg of the substance – by 66.7% ($p < 0.05$) relative to the individuals of the NC group. The greatest increase in the time of visiting the dark compartment was observed against the background of receiving PIR-9 at the dose of 50 mg/kg (by 110.7% ($p < 0.05$)) in comparison with the group of NC rats).

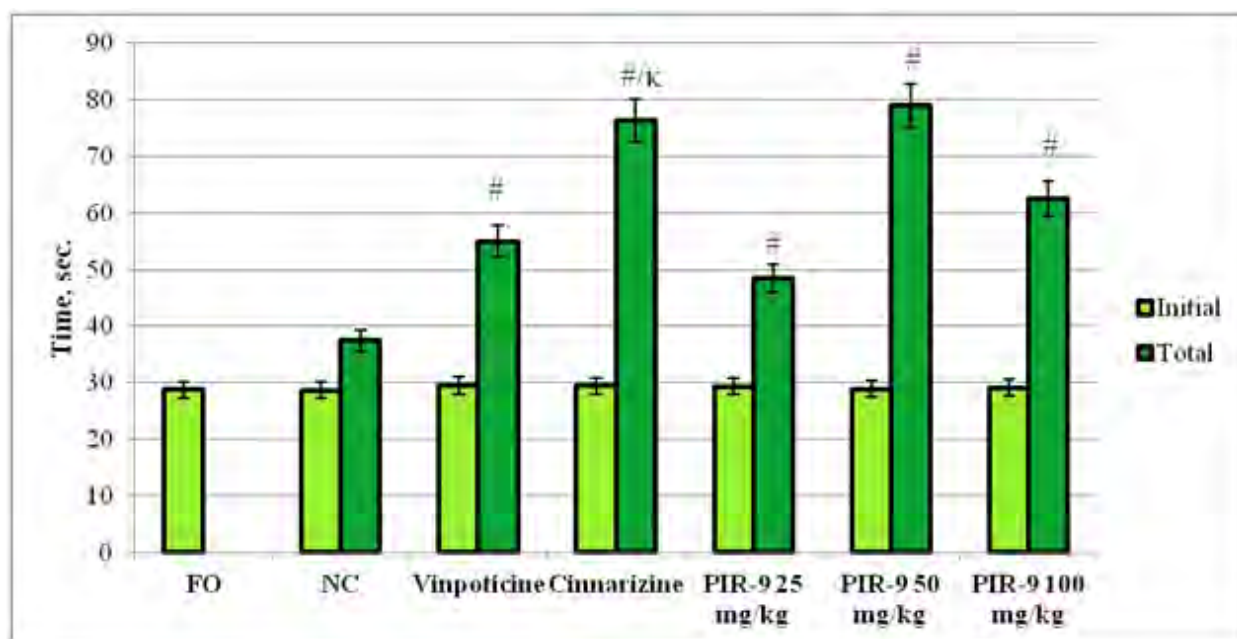


Fig. 1 – Assessment of changes in the latent period of rats' entry into the dark compartment in the test of conditioned passive avoidance reflex against the background of the administration of various dosages of the PIR-9 compound and reference drugs in experimental cerebral ischemia

Note: # – statistically significant relative to the group of NC rats ($p < 0.05$);

κ – statistically significant relative to the group of Cavinton rats ($p < 0.05$)

FO – a group of false-operated rats;

NC – a group of negative control rats;

Cavinton – a group of rats treated with Cavinton (3.2 mg/kg);

Cinnarizine – a group of rats treated with Cinnarizine (5.6 mg/kg);

PIR-9 25, 50, 100 mg/kg – groups of rats treated with PIR-9 substance in dosages of 25, 50, 100 mg/kg, respectively

Under conditions of bilateral occlusion of the common carotid arteries, 66.7% of the negative control rats did not cope with the extrapolation disposal test, the diving time in animals that completed the task slightly decreased relative to the data before the operation (57.1 ± 4.3 seconds) (Fig. 2) [32].

The administration of Vinpocetine and Cinnarizine increased the number of animals performing the extrapolation test to 50% and 43%, respectively. The time to solve the problem in rats that were injected with Vinpocetine slightly decreased both in comparison with baseline values and relative to the group of NC rats. The latent period of diving for individuals treated with Cinnarizine was significantly reduced by 73.9% ($p < 0.05$), relatively to untreated rats, the solution period also significantly exceeded (by 69.3% ($p < 0.05$)) that of the rats of the Vinpocetine group [14].

The minimum number of rats that did not exhibit their active avoidance reflex, was 25%. They were receiving PIR-9 in various dosages, hereby the most recurrent dose was 50 mg/kg. The number of the animals that did not cope with the extrapolation task, when receiving PIR-9 at the doses of 25 and 100 mg/kg, was 40% and 33%, respectively.

The duration of the task in the individuals treated with PIR-9 at the dose of 50 mg/kg differed both from the group of NC rats by 63.42% ($p < 0.05$) and from the animals that had been injected with Vinpocetine by 57.1% ($p < 0.05$). Compared to the animals that had received the PIR-9 substance at the dosages of 25 and 100 mg/kg in rats that had been injected with this compound at the dose of 50 mg/kg, the time to solve the research task was 55.2% less ($p < 0.05$) and 38.1% less, respectively ($p < 0.05$).

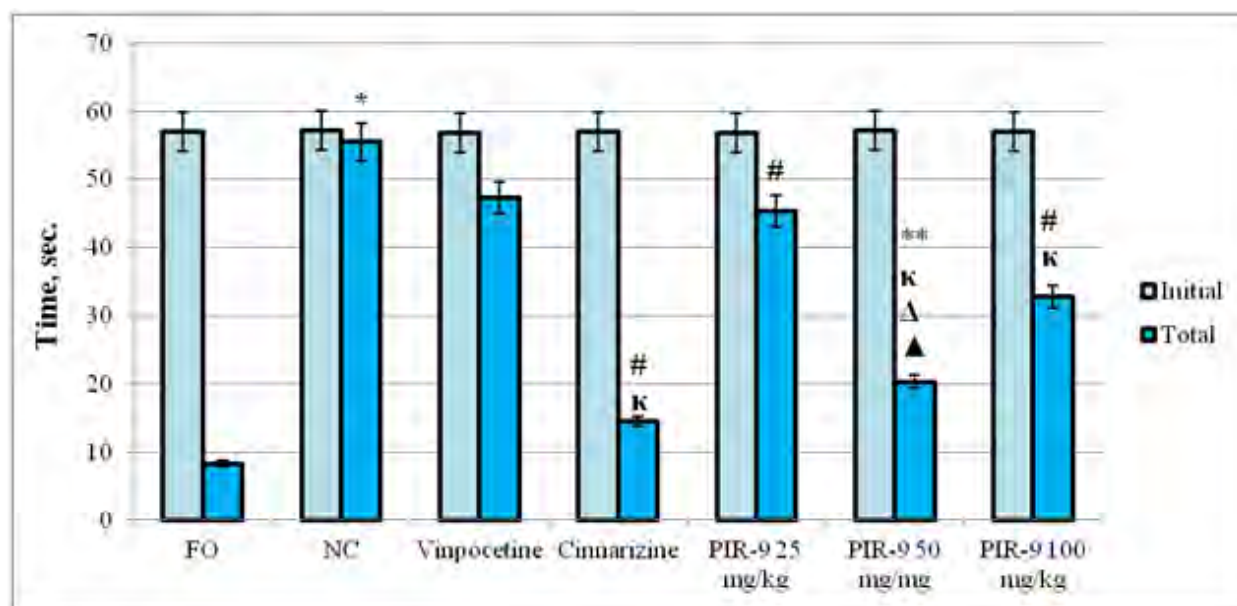


Figure 2 – Assessment of changes in the latent period of rats' diving in the extrapolation disposal test against the background of the administration of various dosages of the PIR-9 compound and reference drugs in experimental cerebral ischemia

Note: * – statistically significant relative to the group of FO rats ($p < 0.05$);
 # – statistically significant relative to the group of NC rats ($p < 0.05$);
 κ – statistically significant relative to the group of Vinpocetine rats ($p < 0.05$);
 Δ – statistically significant relative to the group of PIR-9 25 mg/kg rats ($p < 0.05$);
 ▲ – statistically significant relative to the group of PIR-9 100 mg/kg rats ($p < 0.05$).

FO – a group of false-operated rats;

NC – a group of negative control rats;

Vinpocetine – a group of rats treated with Vinpocetine (3.2 mg/kg);

Cinnarizine – a group of rats treated with Cinnarizine (5.6 mg/kg);

PIR-9 25, 50, 100 mg/kg – groups of rats treated with PIR-9 substance in dosages of 25, 50, 100 mg/kg, respectively

Table 4 shows that untreated animals with cerebral cerebral ischemia were subjected to significant lactic acidosis (11.35 ± 0.08 mmol/l), which was 5.6 times ($p < 0.05$) higher than the index of false-operated individuals [36].

In the animals that had been injected with the reference drug Vinpocetine, the concentration of lactic acid was lower by 57.5% ($p < 0.05$), and in the animals treated with Cinnarizine the concentration of lactic acid was lower by 62.7% ($p < 0.05$) than the identical index of the rats who had not received pharmacological support [17].

The administration of PIR-9 compound at the dose of 25 mg/kg led to the decrease in lactate by 54.1% ($p < 0.05$) relative to NC rats, at the doses of 50 and 100 mg/kg by 68.8% ($p < 0.05$) and 56.4% ($p < 0.05$), respectively. The administration of 50 mg/kg of the PIR-9 substance led to a significant decrease in the concentration of lactic acid – by 26.6% ($p < 0.05$) in comparison with Vinpocetine and by 16.3% ($p < 0.05$) relative to the group of Cinnarizine rats. It should be noted that the lactate level was significantly lower with the administration of PIR-9 at the dose of 50 mg/kg compared to the doses of 25 and 100 mg/kg by 32.1% ($p < 0.05$) and 28.5% ($p < 0.05$).

The consumption of glucose by the brain tissues of the falsely operated animals was 23.51%, in the group of untreated rats against the background of acute cerebrovascular event, the similar indicator was 3.3 times ($p < 0.05$) lower and amounted to 4.3% (Table 4) [36].

Prophylactic administration of Vinpocetine and Cinnarizine contributed to the improvement in glucose utilization up to 12.5% and 10.19%, respectively, which was significantly ($p < 0.05$) different from the animals that had not received pharmacological support. Hereby, significant differences were observed between the reference drug groups, so glucose consumption by rats receiving Vinpocetine was 20.6% ($p < 0.05$) higher than the identical index of the rats administrated with Cinnarizine [17, 37].

The administration of PIR-9 compound at the dose of 50 mg/kg resulted in the most significant increase in arteriovenous difference up to 15.07%. This index was by 34.3% higher than the data of the rats treated with Cinnarizine. It should be noted that the consumption of glucose was by 107.6% ($p < 0.05$) and 67.1% ($p < 0.05$) higher in the group of the individuals that had been injected with PIR-9 at the dose of 50 mg/kg compared to the rats with treated dosages of 25 and 100 mg/kg, respectively.

Table 4 – Concentration of lactic acid in blood plasma and glucose consumption by brain tissue during the administration of various dosages of the PIR-9 compound and reference preparations for experimental cerebral ischemia of rats

Group	Lactate, mmol/l	Consumption of glucose, mmol/l
FO	2.02±0.08	1.46±0.05
NC	11.35±0.08*	0.44±0.08*
Vinpocetine	4.82±0.2#	1.23±0.07#/μ
Cinnarizine	4.23±0.09#	1.02±0.03#
PIR-9 25 мг/кг	5.21±0.15#	0.66±0.08
PIR-9 50 мг/кг	3.54±0.16#/κ/μ/Δ/▲	1.37±0.05#/μ/Δ/▲
PIR-9 100 мг/кг	4.95±0.14#	0.82±0.03#

Note: * – statistically significant relative to the group of FO rats ($p < 0.05$);

– statistically significant relative to the group of NC rats ($p < 0.05$);

κ – statistically significant relative to the group of Vinpocetine rats ($p < 0.05$);

μ is statistically significant relative to the group of Cinnarizine rats ($p < 0.05$);

Δ – statistically significant relative to the group of PIR-9 25 mg/kg rats ($p < 0.05$);

▲ – statistically significant relative to the group of PIR-9 100 mg/kg rats ($p < 0.05$);

FO is a group of false-operated rats;

NC is a group of negative control rats;

Vinpocetine – a group of rats treated with Vinpocetine (3.2 mg/kg);

Cinnarizine – a group of rats treated with Cinnarizine (5.6 mg/kg);

PIR-9 25, 50, 100 mg/kg – groups of rats treated with PIR-9 substance in dosages of 25, 50, 100 mg/kg, respectively

CONCLUSION. Bilateral occlusion of the common carotid arteries causes mortality of 70% of individuals in the negative control group, while in the surviving animals the degree of neurological disorders reaches 7.83 ± 0.33 points. Under the conditions of experimental cerebral ischemia in the untreated animals, a marked decrease in locomotor (by 80% ($p < 0.05$) from the baseline values) and orienting- research activities (stands by 89.5% ($p < 0.05$)), and peeps by 82.1% ($p < 0.05$) of the baseline), the increase of the anxiety level, as well as reduced cognitive-mnemonic functions took place. In addition, in the post-ischemic period in rats not subjected to pharmacotherapy, there was a decrease in glucose consumption by brain tissues by 3.3 times ($p < 0.05$) and an increase in the content of lactic acid by 5.6 times ($p < 0.05$) relative to false-operated animals.

The prophylactic administration of the pyrimidine derivative under the laboratory code PIR-9 in various dosages (25, 50, and 100 mg/kg) made it possible to partially correct disorders arising against the background of irreversible occlusion of the common carotid arteries in rats. The best results were noted during the administration of PIR-9 compound (50 mg/kg). Thus, the survival of the animals treated with PIR-9 50 mg/kg reached 80%,

hereby the neurological index was 2.19 ± 0.23 points, which was significantly different from the identical indicator of the NC rats (72% ($p < 0.05$)) and the groups of rats that had been injected with PIR-9 25 mg/kg (by 29.4% ($p < 0.05$)). In terms of locomotor, orienting-research and mnemonic activities, this pyrimidine derivative was also the most active at the dose of 50 mg/kg. The 50 mg/kg PIR-9 compound resulted in a statistically significant decrease in the concentration of lactic acid by 26.6% ($p < 0.05$) relative to the Vinpocetine group and by 16.3% ($p < 0.05$) in comparison with the group of rats treated with Cinnarizine. The consumption of glucose by the brain tissue against the background of PIR-9 (50 mg/kg) exceeded that of the rats administered with Cinnarizine by 34.3% ($p < 0.05$) and it was 107.6% ($p < 0.05$) and 67.1% ($p < 0.05$) higher than in the animals injected with PIR-9 at the doses of 25 and 100 mg/kg, respectively.

Thus, it can be concluded that while studying the dose-effect relationship, the PIR-9 substance exhibits the most pronounced cerebrotropic effect at the dosage of 50 mg/kg comparable with the effect of the reference drug Cinnarizine (5.6 mg/kg) and the superior effect of Vinpocetine (3.2 mg/kg).

Библиографический список

1. Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Камчатнов П.Р. Ишемический инсульт. Современное состояние проблемы // Доктор.ру. – 2013, №5(83). – С. 7–12.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мартынов М.Ю. Церебральный инсульт: проблемы и решения // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2003, №11. – С. 44–48.
3. Roy-O'Reilly M., McCullough LD. Sex Differences in stroke: the contribution of coagulation // Exp. neurol. – 2014. – T. 259. – С. 16–27. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.02.011.
4. Siniscalchi A., Gallelli L., Malferrari G., Pirritano D., Serra R., Santangelo E., De Sarro G. Cerebral stroke injury: the role of cytokines and brain inflammation // J Basic Clin Physiol Pharmacol. – 2014. – T. 25, №2. – С. 131–137. DOI: 10.1515/jbcpp-2013-0121.
5. Jin R., Liu L., Zhang S., Nanda A., Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke // J Cardiovasc Transl Res. – 2013. – T. 6, №5. – P. 834–51. DOI: 10.1007/s12265-013-9508-6.

6. Feigin V.L., Lawes C.M., Bennett D.A., Barker-Collo S.L., Parag, V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review // *Lancet Neurol.* – 2009. – Т. 8, №4. – С. 355–69. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70025-0.
7. Thom T., Haase N., Rosamond W., Howard V.J., Rumsfeld J., Manolio T., Zheng Z.J., Flegal K., O'Donnell C., Kittner S., Lloyd-Jones D., Goff D.C. Jr., Hong Y., Adams R., Friday G., Furie K., Gorelick P., Kissela B., Marler J., Meigs J., Roger V., Sidney S., Sorlie P., Steinberger J., Wasserthiel-Smoller S., Wilson M., Wolf P.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics–2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. // *Circulation* – 2006. – Т. 113, №6. – С. e85–151. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.171600.
8. Ефимова О.С., Слободенюк А.В., Белкин А.А., Пинчук Е.А. Эпидемиология инсультов: ведущие факторы риска и направления профилактики // *Уральский медицинский журнал.* – 2008, №8(48). – С. 43–46.
9. Усова Н.Н. Инфаркт головного мозга у лиц молодого возраста // *Проблемы здоровья и экологии.* – 2012, №1(31). – С. 23–27.
10. Султанов В.С., Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Церебропротекторные и энергостабилизирующие эффекты полипиренольного препарата ропрена при ишемии головного мозга у крыс // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2010. – Т. 8, №3. – С. 31–47.
11. Gupta J.K., Chaudhary A., Dudhe R., Varuna K., Sharma P.K., Verma P.K. A review on the synthesis and therapeutic potential of pyrimidine derivatives // *International journal of pharmaceutical sciences and research.* – 2010. – Т. 1, №5. – С. 34–49. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.1(5).34-49
12. Кодониди И.П. Молекулярное конструирование N-замещенных производных 1,3-диазинона-4 // *Фармация.* – 2010, №1. – С. 36–40.
13. Самотруева М.А., Цибизова А.А., Ясеняевская А.Л., Озеров А.А., Тюренков И.Н. Фармакологическая активность производных пиримидинов // *Астраханский медицинский журнал.* – 2015. – Т. 10, №1. – С. 12–29.
14. Воронков А.В., Шабанова Н.Б., Кодониди И.П., Шаталов И.С. Церебропротекторная активность новых производных пиримидин-4-(1H)-она PIR-9 и PIR-10 при необратимой окклюзии общих сонных артерий // *Фармация и фармакология.* – 2018. – Т. 6, №2. – С. 167–181. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-2-167-181.
15. Назарова Л.Е., Дьякова И.Н. Влияние феруловой кислоты на зону некроза, возникающего в результате окклюзии средней мозговой артерии // *Медицинский вестник Башкортостана.* – 2011. – Т. 6, №3. – С. 133–135.
16. Воронков А.В., Шабанова Н.Б., Поздняков Д.И., Луговой И.С., Кодониди И.П. Влияние новых производных пиримидин-4(1H)-она на психоэмоциональный дисбаланс и некоторые нарушения энергетического обмена у крыс на фоне ишемии головного мозга // *Современные проблемы науки и образования.* – 2017, №5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=26738> (дата обращения: 24.09.2018).
17. Луговой И.С., Кодониди И.П., Воронков А.В., Шабанова Н.Б., Кодониди М.И. Целенаправленный синтез N-пептидных производных пиримидин-4(1H)-она, обладающих церебропротекторными свойствами. // *Здоровье и образование в XXI веке.* – 2017. – Т. 19, №8. – С. 195–199.
18. Yamamoto M., Shima T., Uozumi T., Sogabe T., Yamada K., Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration // *Stroke.* – 1983. – Т. 14, №6. – С. 977–982.
19. Элементы экспериментальной фармакологии / Сернов Л.Н., Гацура В.В. – М.: Всерос. науч. центр по безопасности биол. актив. веществ, 2000. – 351 с.
20. McGraw C.P., Pashayan A.G., Wendel O.T. Cerebral infarction in the Mongolian gerbil exacerbated by phenoxybenzamine treatment // *Stroke.* – 1976. – Т. 7, №5. – С. 485–488.
21. Ганнушкина И. В. Мозговое кровообращение при разных видах циркуляторной гипоксии мозга // *Вестник Российской академии медицинских наук.* – 2000. – Т. 9. – С. 22–27.
22. Воронина Т.А., Островская Р.У. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / в кн.: *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 308–320.
23. Walf A.A., Frye C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents // *Nat Protoc.* – 2007. – Т. 2, №2. – С. 322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44
24. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M., Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide // *InterdiscipToxicol.* – 2013. – Т. 6, №3. – С. 126–135. DOI: 10.2478/intox-2013-0020.
25. Бондаренко Н.А. Тревожность и проблема тактильной «невнимательности» животных в водных тестах // *Российский журнал когнитивной науки.* – 2017. – Т. 4. – №4. – С. 45–51.
26. Супрун Е.В. Коррекция ронколейкином неврологических и когнитивных нарушений в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий у крыс // *Український вісник психоневрології.* – 2011. – Т. 19, №1(66). – С. 26–30.
27. Арсланбекова В.А., Верхоляк Д.В., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Атапина Н.В., Брель А.К., Лисина С.В. Церебропротекторная активность производного гидроксibenзойной кислоты – соединения С-38 на модели окклюзии общих сонных артерий у крыс // *Вестник ВолГМУ.* – 2017, №4 (64). – С. 54–57.

28. Atochin D.N., Chernysheva G.A., Smolyakova V.I., Osipenko A.N., Logvinov S.V., Zhdankina A.A., Sysolyatin S.V., Kryukov Y.A., Anfinogenova Y., Plotnikova T.M., Plotnikov M.B. Neuroprotective effects of p-tyrosol after the global cerebral ischemia in rats // *Phytomedicine*. – 2016. – Т. 23, №7. – С. 784–792. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.03.015.
29. Громова О.А., Гришина Т.Р., Садин А.В., Никонов А.А., Назаренко О.А., Жидоморов Н.Ю., Вацуро А.А., Борзунов М.П. Влияние циннаризина и алвитила на мозговой кровоток и высшую нервную деятельность при хронической экспериментальной ишемии головного мозга // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2004. – Т. 104, №1. – С. 52–53.
30. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Литвинов А.А., Бакулин Д.А. Влияние различных композиций фенибута с органическими кислотами на неврологический, когнитивный и поведенческий дефицит у крыс при фокальной ишемии головного мозга // *Сибирский медицинский журнал*. – 2012, №8. – С. 61–63.
31. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Ноопепт уменьшает постишемические функционально-метаболические нарушения в головном мозге крыс с разной устойчивостью к гипоксии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2009. – Т. 147, №3. – С. 311–316.
32. Tao J., Cui Y., Duan Y., Zhang N., Wang C., Zhang F. Puerarin attenuates locomotor and cognitive deficits as well as hippocampal neuronal injury through the PI3K/Akt1/GSK-3 β signaling pathway in an in vivo model of cerebral ischemia // *Oncotarget*. – 2017. – Т. 8, №63. – С. 106283–106295. DOI: 10.18632/oncotarget.22290.
33. Jincai W., Tingfang D., Yongheng Z., Zhongmin L., Kaihua Z., Xiaohong L. Effects of vinpocetine and ozagrel on behavioral recovery of rats after global brain ischemia // *J Clin Neurosci*. – 2014. – Т. 21, №4. – С. 661–663. DOI: 10.1016/j.jocn.2013.07.039.
34. Богомолова О.А., Демидова М.А. Влияние новых производных 3-оксипиридина на поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – №6. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=23344> (дата обращения: 24.09.2018).
35. Wen T., Zhang X., Liang S., Li Z., Xing X., Liu W., Tao J. Electroacupuncture Ameliorates Cognitive Impairment and Spontaneous Low-Frequency Brain Activity in Rats with Ischemic Stroke // *J Stroke Cerebrovasc Dis*. – 2018. – Т. 27, №10. – С. 2596–2605. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.05.021.
36. Воронков А.В., Абаев В.Т., Оганесян Э.Т., Поздняков Д.И. Некоторые аспекты церебропротекторной активности 4-гидрокси-3, 5-ди-третбутиа коричной кислоты при ишемическом повреждении головного мозга в эксперименте // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2018. – Т. 13, №1.1 – С. 90–93. DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13025>.
37. Макарова Л.М., Приходько М.А., Погорелый В.Е., Скачилова С.Я., Мирзоян Р.С. Влияние производного глутаминовой и аповинкаминовой кислот на метаболизм головного мозга в постишемическом периоде // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2014. – Т. 77, №2. – С. 12–15.

References

1. Gusev EI, Martynov MYu, Kamtchatnov PR. Ishemicheskij insul't. Sovremennoe sostoyanie problemy' [Ischemic Stroke: Current Status]. *Doktor.ru*. 2013; 5(83):7–12. Russian.
2. Gusev EI, Skvortczova VI, Martynov MYu. Cerebral'ny'j insul't: problemy' i resheniya [Cerebral stroke: problems and solutions]. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2003; 11:44–48. Russian.
3. Roy-O'Reilly M, McCullough LD. Sex Differences in stroke: the contribution of coagulation. *Exp neurol*. 2014; 259:16–27. DOI:10.1016/j.expneurol.2014.02.011.
4. Siniscalchi A, Gallelli L, Malferrari G, Pirritano D, Serra R, Santangelo E, De Sarro G. Cerebral stroke injury: the role of cytokines and brain inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2014; 25(2):131–7. DOI: 10.1515/jbcpp-2013-0121.
5. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(5):834–51. DOI: 10.1007/s12265-013-9508-6.
6. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2009;8(4):355–69. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70025-0.
7. Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng Z.J, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, Lloyd-Jones D, Goff DC Jr., Hong Y, Adams R, Friday G, Furie K, Gorelick P, Kissela B, Marler J, Meigs J, Roger V, Sidney S, Sorlie P, Steinberger J, Wasserthiel-Smoller S, Wilson M, Wolf P; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2006;113(6):e85–151. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.171600.
8. Efimova OS, Slobodenyuk AV, Belkin AA, Pinchuk EA. E'pidemiologiya insul'tov: vedushhie faktory' riska i napravleniya profilaktiki [Epidemiology of strokes: the leading risk factors and directions of prevention]. *Ural medical journal*. 2008;8:43–46. Russian.

9. Usova NN. Infarkt golovnog mozga u lits mladogo vozrasta [Stroke at persons in young age]. Problemy zdorov'ya i ekologii. 2012;1(31):23–7. Russian.
10. Sultantov VS, Zarubina IV, Shabanov PD. Cerebroprotektorny'e i energostabiliziruyushhie e'ffekty` poliprenol'nogo preparata roprena pri ishemii golovnog mozga u kry's [Cerebroprotective and energy stabilizing effects of polyprenol drug ropren in ischemia of the brain in rats]. Reviews on clinical pharmacology and drug therapy. 2010;8(3):31–47. Russian.
11. Gupta JK, Chaudhary A, Dudhe R, Varuna K, Sharma PK, Verma PK. A review on the synthesis and therapeutic potential of pyrimidine derivatives. International journal of pharmaceutical sciences and research. 2010;1(5):34–49. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.1(5).34–49.
12. Kodonidi IP. Molekulyarnoe konstruirovaniye N-zameshenny'x proizvodny'x 1,3-diazinona-4 [Molecular design of n-substituted 1,3-diazinone-4 derivatives]. Pharmacy. 2010;1:36–40. Russian.
13. Samotruyeva MA, Tsimbizova AA, Yasenyavskaya AL, Ozerov AA, Tyurenkov IN. Farmakologicheskaya aktivnost' proizvodny'kh pirimidinov [Pharmacological activity of pyrimidine derivatives]. Astrakhan Medical Journal. 2015;10(1):12–29. Russian.
14. Voronkov AV, Shabanova NB, Kodonidi IP, Shatalov IS. Cerebroprotective activity of new derivatives of pyrimidine-4-(1H)-one PIR-9 and PIR-10 in irreversible occlusion of the common carotid artery. Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(2):167–181. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2018-6-2-167-181>.
15. Nazarova LYe, D'yakova IN. Vliyanie kisloty` ferulovoy na zonu nekroza, vznikayushhego v rezul'tate okklyuzii srednej mozgovoy arterii [Effects of ferulic acid on the necrosis area caused by the middle cerebral artery occlusion]. Medical Bulletin of Bashkortostan. 2011;3:133–135. Russian.
16. Voronkov AV, Shabanova NB, Pozdnyakov DI, Lugovoy IS, Kodonidi IP. Vliyanie novy'x proizvodny'x pirimidin-4(1n)-ona na psixoe'motsional'ny'j disbalans i nekotory'e narusheniya e'nergeticheskogo obmena u kry's na fone ishemii golovnog mozga [Influence of new derivative pirimidin-4(1h)-one on psychoemotional imbalance and some violations of power exchange at rats against the background of brain ischemia]. Modern problems of science and education. 2017;5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=26738>. Russian.
17. Lugovoy IS, Kodonidi IP, Voronkov AV, Shabanova NB, Kodonidi MI. Celenapravlenny'j sintez n-peptidny'x proizvodny'x n-pirimidin-4(1N)-ona, obladayushchix cerebroprotektorny'mi svoystvami [Purposeful synthesis of n-peptide derivatives of pyrimidine-4 (1H)-on having cerebroprotective properties]. Health and Education Millennium. 2017;19(8):195–199. Russian.
18. Yamamoto M, Shima T, Uozumi T, Sogabe T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration. Stroke. 1983;14(6):977–82.
19. Sernov LN, Gaczura VV. E'lementy` e'ksperimental'noj farmakologii. [Elements of experimental pharmacology]. Moscow. 2000: 351 p. Russian.
20. McGraw CP, Pashayan AG, Wendel OT. Cerebral infarction in the Mongolian gerbil exacerbated by phenoxybenzamine treatment. Stroke. 1976;7(5):485–8.
21. Gannushkina IV. Mozgovoe krovoobrashchenie pri razny'kh vidakh tsirkulyatornoj gipoksii mozga [Cerebral circulation in different types of circulatory hypoxia of the brain]. Annals of the Russian academy of medical sciences. 2000;9:22–27. Russian.
22. Voronina TA, Ostrovskaya RU. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu nootropnoj aktivnosti farmakologicheskix veshchestv [Guidelines for the study of nootropic activity of pharmacological substances]. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow, 2005:308–320. Russian.
23. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat Protoc. 2007;2(2):322–8. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
24. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. Interdiscip Toxicol. 2013;6(3):126–35. DOI: 10.2478/intox-2013-0020.
25. Bondarenko NA. Anxiety and the Problem of “Inattentive” Animals in Water Maze Tests. The Russian Journal of Cognitive Science. 2017;4(4):45–51.
26. Suprun EV. Korrekciya ronkolejkinom nevrologicheskix i kognitivny'x narushenij v usloviyax bilateral'noj okklyuzii obshchix sonny'x arterij u kry's [Correction receptor antagonist for interleukin-1 of neurological and cognitive disorders in experimental ischemic stroke]. Ukrainian journal of Psychoneurology. 2011;19(1(66)):26–30. Russian.
27. Arslanbekova VA, Vercholyak DV, Kurkin DV, Bakulin DA, Atapina NV, Brel AK, Lisina SV. Cerebroprotektornaya aktivnost' proizvodnogo gidroksibenzojnoj kisloty - soedineniya S-38 na modeli okklyuzii obshchikh sonnykh arterij u kry's [Cerebroprotective activity of c-38 - derivative hydroxybenzoic acid in rats with bilateral common carotid artery occlusion]. Bulletin of Volgograd State Medical University. 2017;4(64):54–57. Russian.
28. Atochin DN, Chernysheva GA, Smolyakova VI, Osipenko AN, Logvinov SV, Zhdankina AA, Sysolyatin

- SV, Kryukov YA, Anfinogenova Y, Plotnikova TM, Plotnikov MB. Neuroprotective effects of p-tyrosol after the global cerebral ischemia in rats. *Phytomedicine*. 2016;23(7):784–792. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.03.015.
29. Gromova OA, Grishina TR, Sadin AV, Nikonov AA, Nazarenko OA, Zhidomorov NYu, Vaczuro AA, Borzunov MP. Vliyanie cinnarizina i alvitila na mozgovoy krovotok i vy'sshuyu nervnuyu deyatel'nost' pri khronicheskoy e'ksperimental'noj ishemii golovnogogo mozga [Influence of Cinnarizine and alvitil on cerebral blood flow and higher nervous activity in chronic experimental cerebral ischemia]. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2004;104(1):52–53. Russian.
30. Tyurenkov IN, Kurkin DV, Volotova EV, Litvinov AA, Bakulin DA. Vliyanie razlichnykh kompozitsiy fenibuta s organicheskimi kislotami na nevrologicheskij, kognitivny'j i povedencheskij deficit u kry's pri fokal'noj ishemii golovnogogo mozga [Effect of organic acid compositions of phenibut on neurological, cognitive and behavioral deficit in rats with focal ischemic brain damage]. *Siberian Medical Journal*. 2012;8:61–3. Russian.
31. Zarubina IV, Shabanov PD. Noopept reduces the postischemic functional and metabolic disorders in the brain of rats with different sensitivity to hypoxia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009;147(3):339–44.
32. Tao J, Cui Y, Duan Y, Zhang N, Wang C, Zhang F. Puerarin attenuates locomotor and cognitive deficits as well as hippocampal neuronal injury through the PI3K/Akt1/GSK-3 β signaling pathway in an in vivo model of cerebral ischemia. *Oncotarget*. 2017;8(63):106283–106295. DOI: 10.18632/oncotarget.22290.
33. Jincai W, Tingfang D, Yongheng Z, Zhongmin L, Kaihua Z, Xiaohong L. Effects of vinpocetine and ozagrel on behavioral recovery of rats after global brain ischemia. *J Clin Neurosci*. 2014;21(4):661–3. DOI: 10.1016/j.jocn.2013.07.039.
34. Bogomolova OA, Demidova MA. Vliyanie novykh proizvodnykh 3-oksipiridina na povedenie kry's v teste «pri-podnyatyj krestobraznyj labirint» [Effects of new derivatives of 3-oxypyridin on behavior of rats in the elevated plus maze (epm) experiments]. *Modern problems of science and education*. 2015;6:147. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=23344>. Russian.
35. Wen T, Zhang X, Liang S, Li Z, Xing X, Liu W, Tao J. Electroacupuncture Ameliorates Cognitive Impairment and Spontaneous Low-Frequency Brain Activity in Rats with Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(10):2596–2605. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.05.021.
36. Voronkov AV, Abaev VT, Oganessian ET, Pozdnyakov DI. Nekotory'e aspekty' cerebroprotektornoj aktivnosti 4-gidroksi-3, 5-di-tretbutia korichnoj kisloty' pri ishemicheskom povrezhdenii golovnogogo mozga v e'ksperimente [Some aspects of cerebroprotective activity of 4-hydroxy-3,5-di-tretbutyle of cinnamic acid in ischemic damage of the brain in experiment]. *Medical News North Caucasus*. 2018;13(1.1):90–3. Russian.
37. Makarova LM, Prihod'ko MA, Pogorelyi VE, Skachilova SYa, Mirzoyan RS. Vliyanie proizvodnogo glutaminovoj i apovinkaminovoj kislot na metabolism golovnogogo mozga v postishemicheskom periode [Effect of a new derivative of glutamic and apovincaminic acids on brain metabolism in post-ischemic period]. *Experimental and clinical pharmacology*. 2014;77(2):12–15. Russian.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы

Воронков Андрей Владиславович – доктор медицинских наук, доцент, зав. кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: поиск веществ, обладающих эндотелиопротективной активностью; разработка путей фармакологической коррекции состояний, возникающих у лиц, испытывающих постоянное экстремальное физическое и психоэмоциональное напряжение, в том числе в спорте высоких достижений; правовые аспекты спортивной медицины; инновационные подходы в сфере постдипломного образования специалистов. ORCID: 0000-0001-6638-6223. E-mail: prohor.77@mail.ru

Шабанова Наталья Борисовна – аспирант кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: поиск

Authors

Voronkov Andrey Vladislavovich – Doctor of Sciences (Medicine), docent, head of the Department of pharmacology with a course of clinical pharmacology, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: search for substances with endothelioprotective activity; development of ways of pharmacological correction of conditions arising in individuals experiencing constant extreme physical and psychoemotional stress, including sports of high achievements; legal aspects of sports medicine; innovative approaches in the sphere of postgraduate education specialists. E-mail: prohor.77@mail.ru

Shabanova Natalya Borisovna – postgraduate student of the Department of Pharmacology with the course of clinical pharmacology of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: search for sub-

веществ, обладающих церебропротекторной активностью; изучение фармакологических свойств новых производных пиримидин-4(1n)-она. E-mail: Vahlushina@mail.ru.

Воронкова Мария Павловна – доктор биологических наук, доцент, старший преподаватель кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ Минздрава России, г. Волгоград. Область научных интересов: поиск веществ с поливалентным механизмом действия среди соединений синтетической и природной структуры в условиях патологий различного генеза. E-mail: prohor.77@mail.ru.

Лысенко Татьяна Александровна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: поиск веществ среди соединений синтетической и природной структуры, влияющих на изменение системной гемодинамики. E-mail: Vahlushina@mail.ru.

stances with cerebroprotective activity; study of the pharmacological properties of the new pyrimidine-4 (1n)-one derivatives. E-mail: Vahlushina@mail.ru

Voronkova Maria Pavlovna – Doctor of Sciences (Biology), Associate Professor, Senior Lecturer at the Department of Pharmacology and Bioinformatics, VolgSMU, Volgograd. Research interests: search for substances with a polyvalent mechanism of action among compounds of synthetic and natural structure in the conditions of pathologies of various genesis. E-mail: prohor.77@mail.ru.

Lysenko Tatyana Alexandrovna – PhD (Pharmacology), Associate Professor at the Department of Pharmacology with a course of clinical pharmacology at Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of the FSBEI HE VolgMU. Research interests: the search for substances among the compounds of synthetic and natural structures that affect the change in systemic hemodynamics. E-mail: Vahlushina@mail.ru.

Поступила в редакцию: 01.11.2018
Принята к печати: 10.12.2018

Received: 01.11.2018
Accepted for publication: 10.12.2018

АНАЛИЗ ИЗВЕЩЕНИЙ О НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЯХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ, ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ КРЫМ ЗА ПЕРИОД 2011–2016 ГГ.

Матвеев А.В.^{1,2}, Крашенинников А.Е.¹, Егорова Е.А.², Коняева Е.И.²

¹Автономная некоммерческая организация «Национальный научный центр Фармаконадзора»,
127051, Россия, г. Москва, ул. Малая Сухаревская площадь, 2, корп. 2.

²Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»,
295051, Россия, г. Симферополь, бул. Ленина, 5, корп. 7

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ВИЧ остается одной из основных проблем глобального общественного здравоохранения. Основным методом лечения ВИЧ является проведение высоко активной антиретровирусной терапии (ВААРТ), которая представляет собой одновременный прием нескольких антиретровирусных препаратов. Своевременное начало ВААРТ позволяет подавить репликацию вируса в организме человека и содействует укреплению его иммунной системы и восстановлению ее способности бороться с инфекциями. При этом выбор лекарственных препаратов для повышения качества жизни и комплаентности пациентов при проведении антиретровирусной терапии должен быть основан на показателях их эффективности и безопасности. **Цель.** Анализ и изучение нежелательных реакций (НР), возникающих у пациентов с ВИЧ-инфекцией при применении ВААРТ, проживающих на территории Республики Крым. **Материалы и методы.** Объектами исследования стали 274 карты-извещения о НР, зарегистрированные в региональной базе (реестре) спонтанных сообщений ARCADE (Adverse Reactions in Crimea, Autonomic Database) за период 2011–2016 гг. **Результаты.** Результаты исследования показали, что наиболее часто НР наблюдались при применении препаратов группы ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ, НИОТ), что объяснимо включением данных препаратов в качестве основных лекарственных средств (ЛС) в схемы ВААРТ. Среди этих групп антиретровирусных препаратов абсолютными лидерами были препараты эфавиренз и невирапин. Среди комбинированных противовирусных препаратов, активных по отношению к ВИЧ, наиболее часто НР были связаны с применением комбинации ламивудина и зидовудина. Основными клиническими проявлениями НР при применении комбинированных препаратов для лечения ВИЧ было снижение уровня гемоглобина и развитие анемий. При этом в 85% случаев пациенты нуждались в приеме препаратов с целью коррекции возникшей нежелательной лекарственной реакции (НЛР). Нередко прием комбинированных антиретровирусных препаратов был связан с развитием серьезных НЛР. В случае монопрепаратов основными проявлениями НР были нарушения со стороны ЦНС (головокружения, галлюцинации, нарушения сна) и аллергические реакции различной степени тяжести (в том числе 1 случай отека Квинке на прием препарата «Эфверен» (эфавиренз) 600 мг). При этом практически в половине случаев прием антиретровирусных препаратов групп ННИОТ, НИОТ и ингибиторов протеазы вызывал развитие серьезных побочных эффектов, что подтверждает необходимость изучения и анализа НР с целью повышения безопасности фармакотерапии пациентов и улучшения качества их жизни. **Заключение.** Изучение нежелательных реакций лекарственных препаратов, применяющихся для лечения ВИЧ, носит важнейшее значение в повышении безопасности и комплаентности пациентов с ВИЧ к применяемой пожизненно фармакотерапии.

Ключевые слова: нежелательные реакции, антиретровирусные препараты, ингибиторы обратной транскриптазы, ВИЧ-инфекция

Для цитирования:

Матвеев А.В., Крашенинников А.Е.,
Егорова Е.А., Коняева Е.И.
АНАЛИЗ ИЗВЕЩЕНИЙ О НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ
РЕАКЦИЯХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ,
ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ,
ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ
КРЫМ ЗА ПЕРИОД 2011–2016 ГГ.
Фармация и фармакология. 2018;6(6):568–583
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-6-568-583
© Матвеев А.В., Крашенинников А.Е.,
Егорова Е.А., Коняева Е.И., 2018

For citation:

Matveev A.V., Krashenninikov A.E.,
Egorova E.A., Konyaeva E.I.
ANALYSIS OF ADVERSE DRUG REACTION
REPORT FORMS ON THE MEDICINES,
USED FOR AIDS TREATMENT (REGISTERED
IN THE REPUBLIC OF CRIMEAE
IN THE PERIOD FROM 2011 TO 2016)
Pharmacy & Pharmacology. 2018; 6(6):568–583. Russian.
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-6-568-583

ANALYSIS OF ADVERSE DRUG REACTION REPORT FORMS ON THE MEDICINES, USED FOR AIDS TREATMENT (REGISTERED IN THE REPUBLIC OF CRIMEA IN THE PERIOD FROM 2011 TO 2016)

Matveev A.V.^{1,2}, Krashennnikov A.E.¹, Egorova E.A.², Konyaeva E.I.²

¹National Pharmacovigilance Research Center

22/2, Malaya Sukhrevskaya Str., Moscow, Russian Federation, 127051

²Medical Academy n. a. S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU

5/7, Lenin Boulevard, Simferopol, Russian Federation, 295051

E-mail: avmcsmu@gmail.com

According to the data of the World Health Organization (WHO), human immunodeficiency virus (HIV) remains a major global public health problem. The main method of treating HIV is using highly active antiretroviral therapy (HAART), which is the use of multiple medicines acting on different viral targets. The timely onset of HAART can suppress the replication of the virus in the human body and helps to strengthen its immune system and restore its ability to fight infections. At the same time, the choice of medicines to improve the quality of life and patients' compliance during antiretroviral therapy should be based on their effectiveness and safety. **The aim** of this research was to analyze and study the adverse reactions that occur in patients with HIV living in the territory of the Republic of Crimea, when using HAART. **Materials and methods.** The objects of research were 274 report cards about the adverse reactions, registered in the regional base (registry) of spontaneous messages called ARCADE (Adverse Reactions in Crimea, Autonomic Database) for the period from 2011 to 2016. **Results.** The results of the study showed that the most often adverse reactions were observed when using medicines of the group of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI). This is explained by the inclusion of NRTI medicines as the main medicine in the method of HAART. Efavirenz (EFV) and Nevirapine (NVP) were absolute leaders among these groups of antiretroviral medicines. Among the combined antiviral medicines active against HIV, the most frequently adverse reactions were associated with the use of a combination of Lamivudine (3TC) and Zidovudine (ZDV). The main clinical manifestations of adverse reactions in the use of combination medicines for treating HIV were a decrease in the level of hemoglobin and the development of anemia. At the same time, in 85% of cases, the patients needed medication in order to correct the resulting adverse drug reaction (ADR). The combination of antiretroviral therapy has often been associated with the development of serious ADR. In case of monotherapy, the main clinical manifestations of adverse reactions were disorders of the central nervous system (dizziness, hallucinations, sleep disorders) and allergic reactions of varying severity (including 1 case of angioedema to "Efervan" (Efavirenz (EFV)), 600 mg). Hereby, in almost half of the cases, the usage of antiretroviral medicines of the NRTI group and protease inhibitors caused the development of serious side effects. This confirms the necessity to study and analyze adverse reactions in order to increase the safety of patients' pharmacotherapy and improve their quality of life. **Conclusion.** The study of adverse reactions to the medicines used for treatment of HIV is of a paramount importance in improving the safety and compliance of HIV patients to lifelong pharmacotherapy.

Keywords: adverse drug reactions, antiretroviral medicines, nucleoside reverse transcriptase inhibitors, human immunodeficiency virus (HIV)

ВВЕДЕНИЕ. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) одно из первых мест в структуре смертности занимают побочные реакции, возникающие при применении лекарственных препаратов. В настоящее время частота нежелательных явлений при амбулаторном приеме достигает 10–20%, а в госпитализации для лечения осложнений, вызванных лекарственными средствами, при этом могут нуждаться от 0,5 до 5% пациентов [1–3]. Растущая сенсибилизация населения к химическим соединениям и биологически активным веществам вследствие их доступности и широкого распространения на фармацевтическом рынке, увеличивает вероятность развития побочного действия препаратов [1].

Изучение и оценка безопасности лекарственных средств, разработка подходов по оптимизации выбора, назначения и рационального использования лекарственных препаратов является важнейшим вопросом, особенно для заболеваний, занимающих ведущие позиции в распространенности, тяжести и смертности населения.

Одним из таких заболеваний, глобальность которого подтверждается данными ВОЗ, является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) [4]. В мире на начало 2017 года насчитывалось 36,7 миллиона заболевших, среди которых 2,1 миллиона детей, заразившихся ВИЧ от матери во время беременности или родов (вертикальный путь передачи) [5]. Число ВИЧ-инфицированных, зарегистрированных в РФ на конец 2015 г., составило более 1 миллиона человек при показателях смертности 212,5 тысяч человек, что подтверждает высокую социальную опасность этого заболевания [6].

В связи с этим, становится особенно актуальной не только разработка новых препаратов для лечения ВИЧ, но и рациональное применение и изучение нежелательных реакций тех препаратов, которые уже существуют на фармацевтическом рынке и входят в схемы «высокоактивной антиретровирусной терапии» (ВААРТ) [7–10]. В настоящее время стандартная схема ВААРТ включает в себя комбинацию двух нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) в качестве основы в сочетании с нуклеозидным ин-

гибитором обратной транскриптазы (ННИОТ) или усиленным ингибитором протеазы (ИП) [11]. При этом выбор лекарственных препаратов для повышения качества жизни и комплаентности пациентов при проведении антиретровирусной терапии должен быть основан на показателях их эффективности и безопасности.

Стоит отметить наличие определенной специфической токсичности, характерной для каждого из перечисленных классов препаратов, входящих в схему ВААРТ. Так, для НИОТ наиболее характерными нежелательными реакциями являются расстройства ЖКТ, миелосупрессия, кардиомиопатия, лактацидоз, нарушения со стороны ЦНС в виде периферических полинейропатий. Использование препаратов группы ННИОТ связано с возникновением на фоне их приема гепатотоксичности, аллергических реакций и расстройств ЦНС, а прием ингибиторов протеазы наиболее часто связан с возникновением расстройств со стороны ЖКТ, липодистрофии, гиперлипидемии и гипергликемии [7].

ЦЕЛЬ. Определение основных фармакотерапевтических групп противовирусных препаратов, применяющихся при ВИЧ-инфекции, у пациентов, проживающих на территории Республики Крым, а также установление частоты возникновения и клинических проявлений нежелательных реакций при их применении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объектами исследования стали карты-извещения о НР, зарегистрированные в региональной базе (реестре) спонтанных сообщений ARCADE (Adverse Reactions in Crimea, Autonomic Database) за период 2011–2016 гг. Всего было проанализировано 274 карт-извещений о НР, зарегистрированных у пациентов, принимающих комбинированные и монопрепараты для лечения ВИЧ.

Анализ проводился с учетом кодов Анатомо-терапевтической (АТХ) классификации лекарственных средств ВОЗ (АТХ-коды: J05AF, J05AG, J05AE, J05AR) [12]. Для определения причастности кон-

кретного препарата к возникшим у пациента осложнениям терапии проводилось определение причинно-следственной связи «лекарственный препарат – НР» по шкале Наранжо.

Серьезность НР устанавливалась в соответствии с определением, содержащимся в пункте 51 статьи 4 Федерального закона №61-ФЗ от 12 апреля 2010 г. «Об обращении лекарственных средств» [13].

Методология анализа карт-извещений о НР не подразумевала проведения сравнений и определения корреляций данных между собой. Определение частоты НР проводилось в программе MS Excel 2016 пакета Microsoft Office.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для осуществления анализа НР, возникающих при применении препаратов для лечения ВИЧ, было отобрано 274 карты-извещения о НР, зарегистрированных в региональной базе спонтанных сообщений ARCADE за период 2011–2016 гг. Стоит отметить, что в 129 случаях НР (47,1%) были связаны с применением комбинированных ЛС для лечения ВИЧ. Таким образом, количество зарегистрированных НР на антиретровирусные препараты (включая комбинации противовирусных препаратов, активных в отношении ВИЧ) составило 5,4% от общего количества карт-извещений о НР, зарегистрированных за этот период (5047 карт).

Проведение анализа НР на противовирусные препараты для лечения ВИЧ в соответствии с Анатомо-терапевтической (АТХ) классификацией лекарственных средств ВОЗ показало, что среди монопрепаратов наибольшее количество НР было зарегистрировано при применении препаратов группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (97 случаев, 35,40%) и нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (35 случаев, 12,8%). Значительно реже НР были отмечены при применении препаратов группы ингибиторов протеаз (рис. 1).

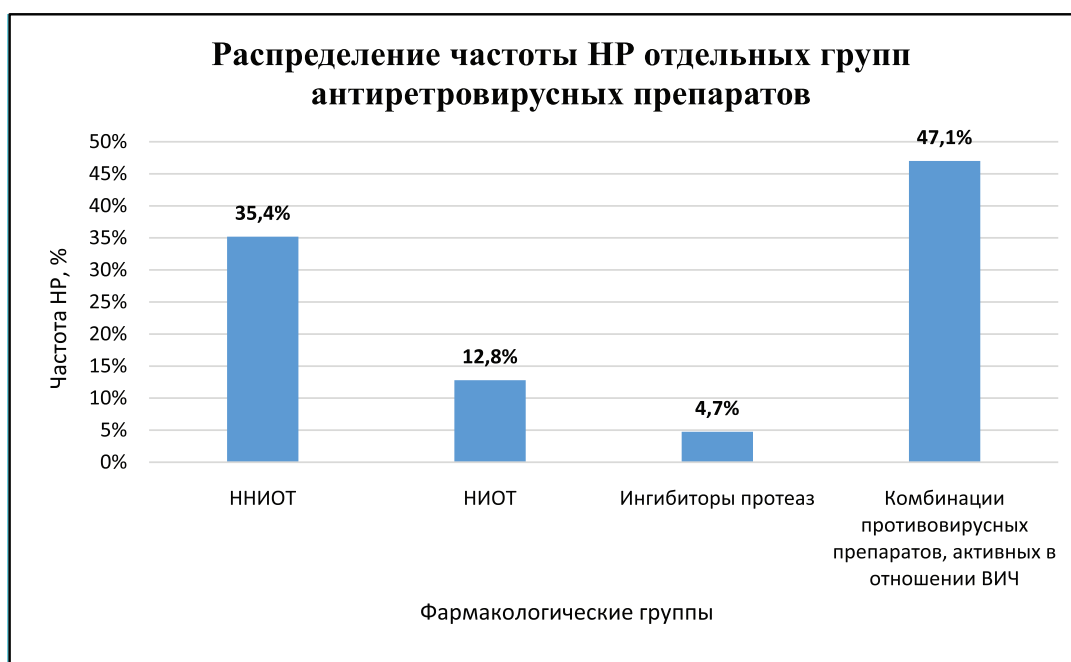


Рисунок 1 – Распределение частоты НР отдельных групп антиретровирусных препаратов

Анализ частоты обусловленности НР конкретными препаратами в каждой из групп показал, что в группе ННИОТ препаратом-«лидером» по частоте разви-

тия НР был эфавиренз (J05AG03) – 81 случай (83,5%), значительно реже НР были связаны с применением невирапина (J05AG01) – 16 случаев (16,5%) (рис. 2).

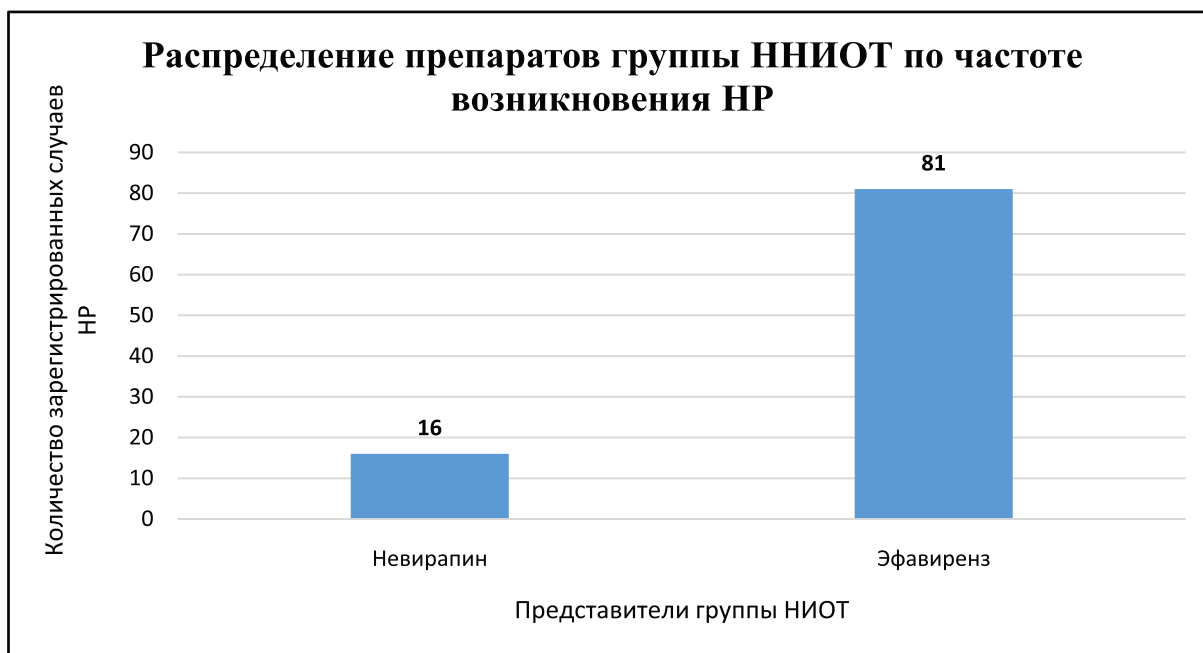


Рисунок 2 – Распределение частоты случаев НР на антиретровирусные препараты группы ННИОТ

Среди препаратов группы НИОТ наибольшее количество случаев НР было зарегистрировано при применении препаратов зидовудин (J05AF01) – 15

случаев (42,9%) и абакавир (J05AF06) – 11 случаев (31,4%). Частота развития НР на другие препараты данной группы представлена на рисунке 3.

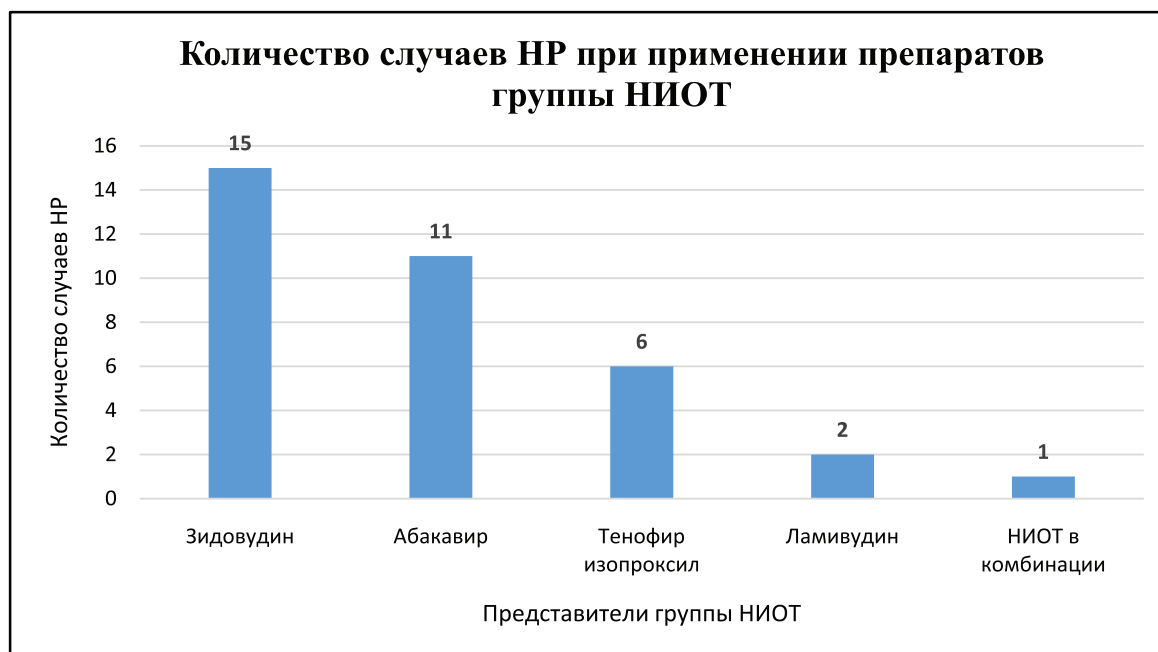


Рисунок 3 – Распределение частоты случаев НР на антиретровирусные препараты группы НИОТ

В группе комбинированных противовирусных препаратов, активных в отношении ВИЧ, НР чаще всего возникали при применении препаратов, сочетающих два нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы ламивудина и зидовудина (116 случаев, 90%). Реже НЛР наблюдались при применении комбинации ингибиторов протеазы ритонавира и лопинавира (11 случаев, 8,5%). В 2 случаях развитие

НЛР было связано с применением трехкомпонентного лекарственного средства, содержащего тенофовир, эмтрицитабин и эфавиренз (рис. 4).

Изучение распределения НР в зависимости от пола пациентов показало, что наиболее часто НР возникали у лиц женского пола – 171 случай (62,4%), при этом у мужчин НР были зарегистрированы в 103 случаях, что составило 37,6%.

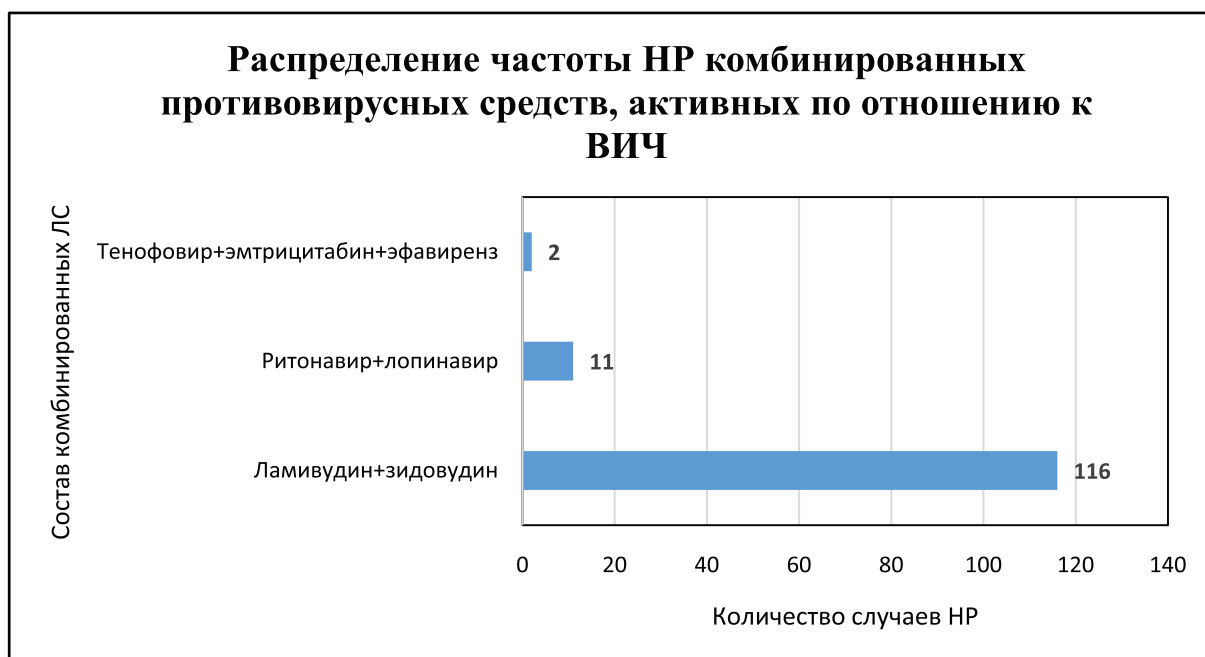


Рисунок 4 – Распределение частоты случаев НР на комбинированные противовирусные средства, активных в отношении ВИЧ

Проведение анализа возрастных периодов пациентов, у которых были зарегистрированы случаи НР при проведении антиретровирусной терапии, показало следующие результаты (рис. 5): наиболее часто осложнения фармакотерапии регистрировались у пациентов в возрасте 31–45 лет – 135 случаев НР (49,3%) и 18–30 лет – 62 случая (22,6%). Это

может быть связано с наиболее высокой частотой заражения и выявления ВИЧ у лиц молодого возраста. В возрасте 46–60 лет (лица среднего возраста) НР были зарегистрированы у 40 пациентов (14,6%). Значительно реже встречались случаи НР у детей и лиц пожилого возраста (27 и 10 случаев соответственно).

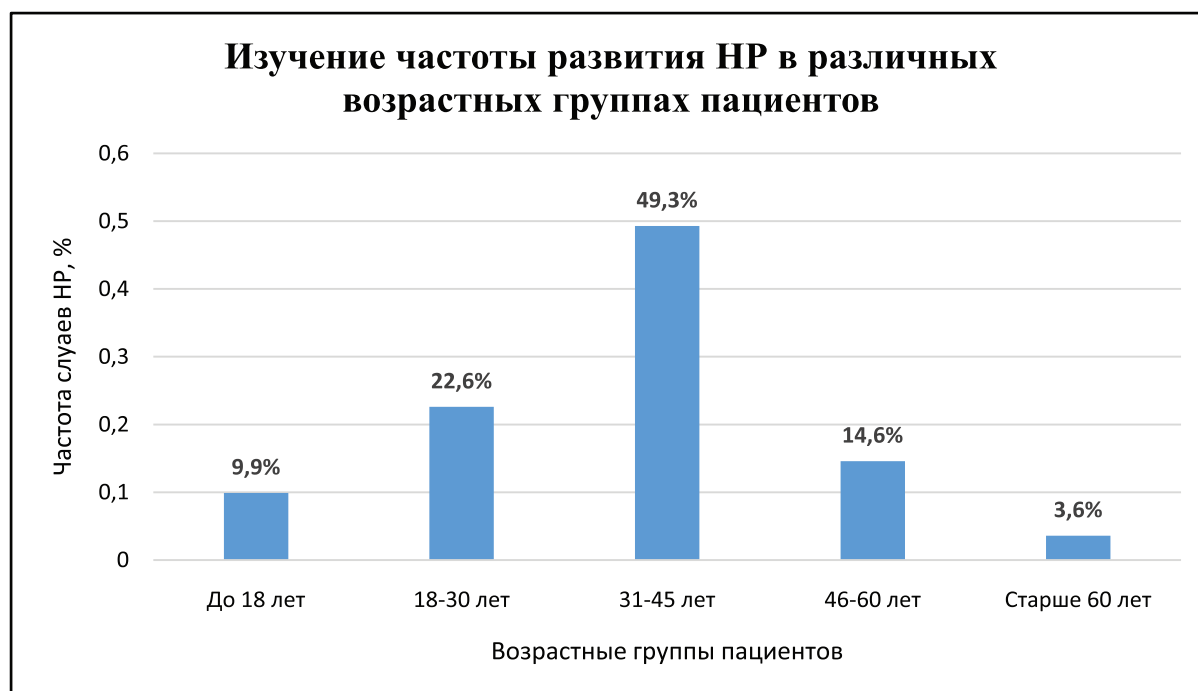


Рисунок 5 – Распределение частоты случаев НР по возрастным группам пациентов

Изучение клинических проявлений НР проводилось в группах моно- и комбинированных препаратов по отдельности, что позволило выявить некоторые особенности НР этих групп препаратов (рис. 6, рис. 7). Так, в группе монопрепаратов, применяемых для лечения ВИЧ (ННИОТ, НИОТ, ингибиторов протеазы), наиболее частыми клиническими проявлениями нежелательных реакций были реакции со стороны ЦНС и аллергические реакции различной степени тяжести (кожный зуд, крапивница, отек Квинке) (40% и 26,2%

случаев соответственно). Значительно реже имели место НР со стороны ЖКТ (12,4%) и системы крови (11% случаев). В отличие от этого, применение комбинированных противовирусных препаратов для лечения ВИЧ чаще всего было связано с возникновением у пациентов нежелательных реакций в виде угнетения кроветворения (95 случаев, 73,4%). В единичных случаях наблюдались НР со стороны ЦНС (13 случаев, 10,1%), ЖКТ (10 случаев, 7,7%) и в виде местных аллергических реакций (9 случаев, 7,0%).

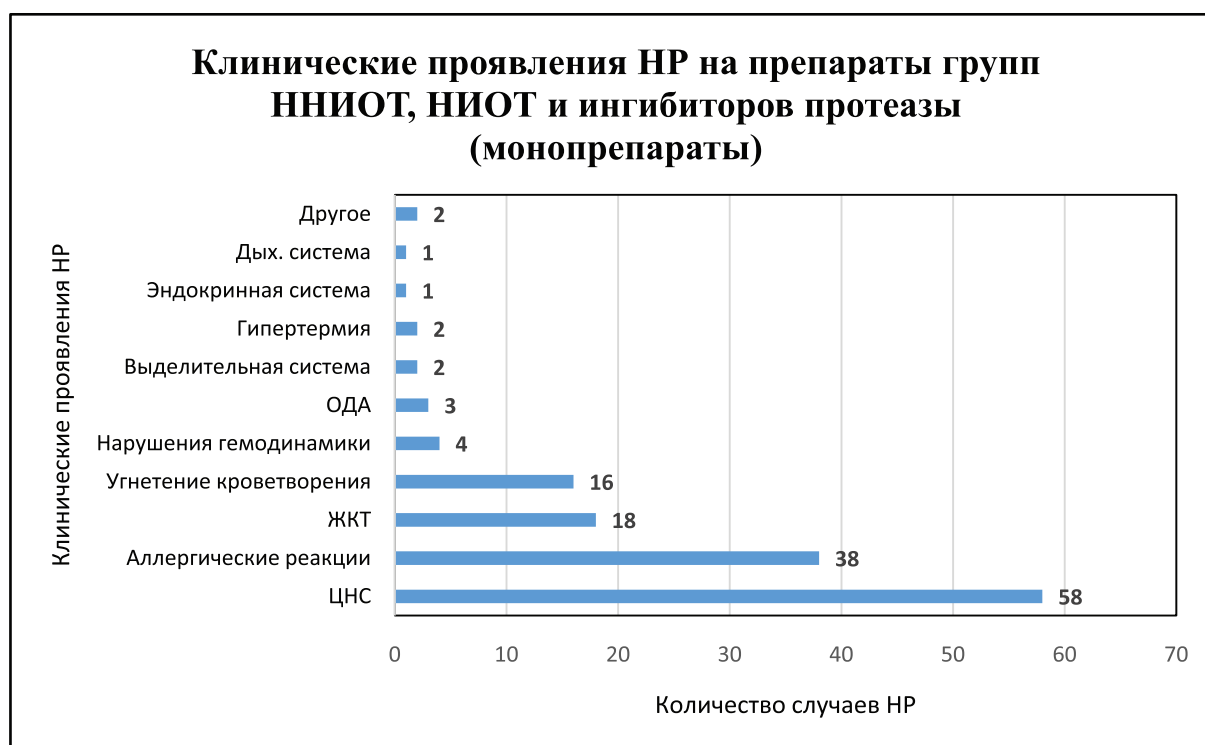


Рисунок 6 – Клинические проявления НР на антиретровирусные препараты групп ННИОТ, НИОТ, ингибиторов протеазы

Стоит отметить, что проведение медикаментозной коррекции с целью купирования клинических проявлений НР антиретровирусных препаратов в виде моно- и комбинированных ЛС потребовалось в 179 случаях (65,3%), что позволяет судить о серьезности и тяжести нежелательных реакций, возникающих при применении препаратов для лечения ВИЧ. В 95 случаях (34,7%) пациенты в коррекции нежелательной реакции не нуждались, и они купировались самостоятельно.

Дальнейший анализ карт-извещений о НР препаратов для лечения ВИЧ был посвящен изучению количеству назначаемых одновременно лекарственных

препаратов и выявлению случаев полипрагмазии при проведении фармакотерапии пациентов с ВИЧ. Так, анализ НР, возникающих при применении монопрепаратов для лечения ВИЧ показал, что 93 случая (64,1%) имело место одновременное их назначение с препаратами других фармакологических групп. Причем одновременное назначение в этих случаях 4 и более лекарственных препаратов наблюдалось в 15 картах-извещениях, что это является важным моментом для оценки причинно-следственной связи между приемом препарата и возникающей НР и может рассматриваться как свидетельство полипрагмазии.

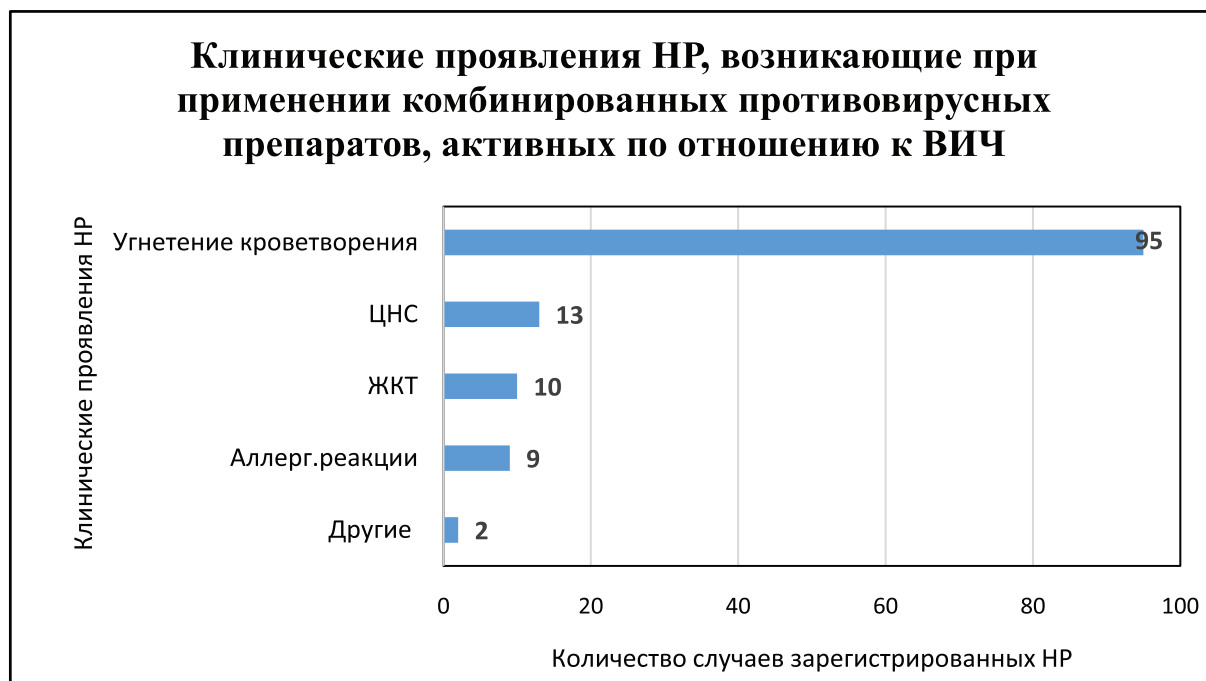


Рисунок 7 – Клинические проявления НР, возникающие при применении комбинированных противовирусных препаратов, активных по отношению к ВИЧ

Одновременное применение двух и трех лекарственных препаратов встречалось в 25 и 7 случаях НР соответственно. Назначение пациентам комбинированных противовирусных препаратов, активных по отношению к ВИЧ, наиболее часто (100 случаев, 77,5%) сопровождалось назначением в качестве сопутствующей терапии одного лекарственного препарата.

Рассмотрение исходов нежелательных лекарственных реакций у пациентов, принимающих антиретровирусные препараты групп ННИОТ, НИОТ и ингибиторов протеазы, показало, что угрожающие жизни пациентов состояния возникали в 5 случаях (3,4%), госпитализация и продление сроков госпитализации потребовалось в 34 (23,5%) и 7 случаях (4,8%) соответственно. Стоит отметить, что развитие временной нетрудоспособности наблюдалось в 11 случаях (7,6 %), в остальных 88 случаях (60,7%) НР были несерьезными и не вызывали вышеперечисленных последствий.

Следующий этап анализа карт-извещений о НР противовирусных препаратов был посвящен определению причинно-следственной связи (ПСС) «лекарственный препарат – НР» в соответствии с алгоритмом Наранжо. Данный анализ показал следующие результаты: причинно-следственная связь между приемом препаратов групп ННИОТ, НИОТ, ингибиторов протеазы и возникшей НЛР в большинстве случаев была определенной (74 случая, 51%), в 67 случаях (46,2%) – вероятной и в 4 случаях (2,8%) – возможной. В группе комбинированных препаратов для лечения ВИЧ наиболее часто ПСС была вероятной (99 случая, 76,7%), в 28 случаях (21,7%) – определенной и в 2 случаях (1,6%) – возможной (рис. 8).

Результаты проведенного анализа карт-извещений о НР препаратов, применяющихся при тера-

пии ВИЧ-инфекции, подтвердили высокую частоту встречаемости таких реакций и их серьезность, что подтверждается данными других исследователей [10, 14–16]. При этом наиболее часто НР наблюдались при применении препаратов группы ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ, НИОТ), что объяснимо их включением в качестве основных ЛС в схемы ВААРТ (высокой антиретровирусной терапии). Среди этих групп антиретровирусных препаратов абсолютными лидерами были эфавиренз и невирапин. Среди комбинированных противовирусных препаратов, активных по отношению к ВИЧ, наиболее часто НР были связаны с применением комбинации ламивудина и зидовудина. Основными клиническими проявлениями НР при применении комбинированных препаратов для лечения ВИЧ было снижение уровня гемоглобина и развитие анемий. При этом в 85% случаев пациенты нуждались в приеме препаратов с целью коррекции возникшей НЛР. Нередко прием комбинированных антиретровирусных препаратов был связан с развитием серьезных НЛР. В случае монопрепаратов, основными проявлениями НР были нарушения со стороны ЦНС (головокружения, галлюцинации, нарушения сна) и аллергические реакции различной степени тяжести (в том числе 1 случай отека Квинке на прием препарата «Эфервен» (эфавиренз) 600 мг). При этом практически в половине случаев прием антиретровирусных препаратов групп ННИОТ, НИОТ и ингибиторов протеазы вызывал развитие серьезных побочных эффектов, что подтверждает необходимость изучения и анализа НР с целью повышения безопасности фармакотерапии пациентов и улучшения качества их жизни.

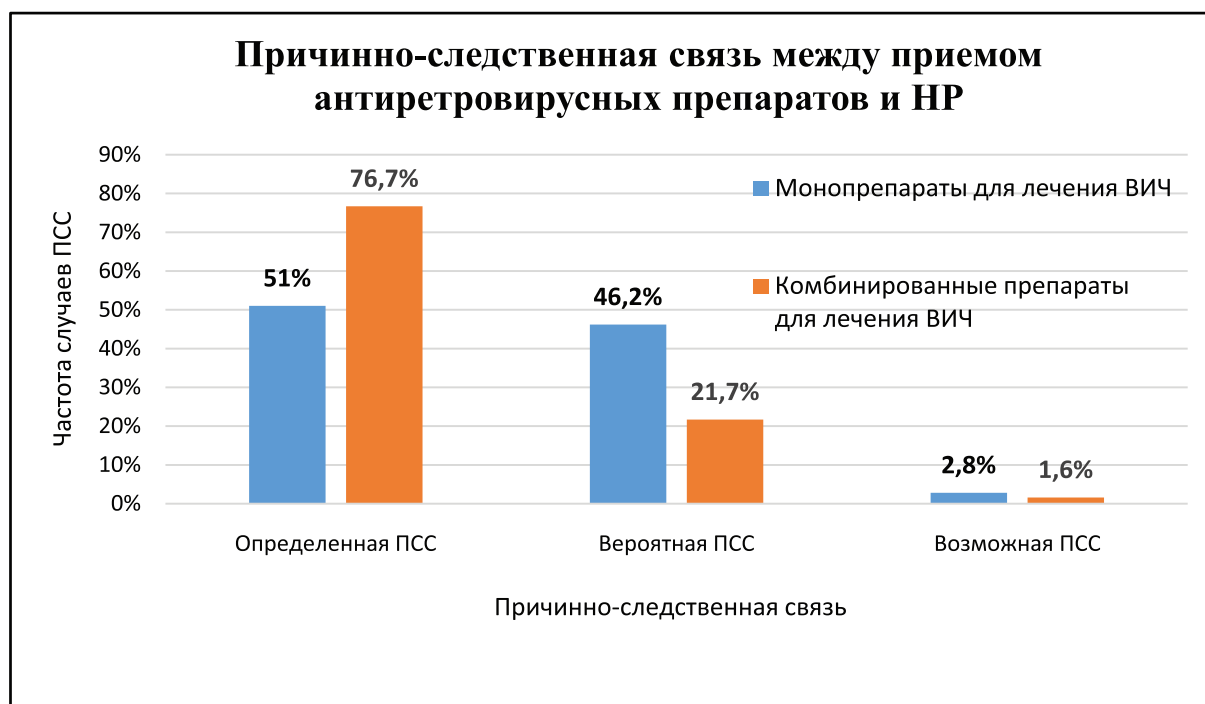


Рисунок 8 – Степени достоверности причинно-следственной связи «НР – лекарственный препарат» по шкале Наранжо

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Согласно исследований последних лет, в РФ наблюдается постоянный рост больных с ВИЧ-инфекцией, находящихся в прогрессирующей стадии заболевания и требующих проведения ВААРТ. Применение антиретровирусных препаратов в этом случае напрямую связано с возникновением нежелательных эффектов, развитием резистентности к вирусу и снижением качества жизни пациента. Частота развития НР при применении различных схем ВААРТ, согласно данным Санкт-Петербургского Центра СПИДа, составляет около 12%, причем чаще всего такие НР являются серьезными и требуют медикаментозной коррекции.

Распознавание потенциально опасных осложнений ВААРТ, изучение механизмов развития НР, а также предотвращение побочных эффектов антиретровирусных препаратов может способствовать повышению приверженности пациентов к длительному лечению ВИЧ, повышению качества их жизни и, как следствие, увеличению продолжительности их жизни.

Рис. 8. Степени достоверности причинно-следственной связи «НР – лекарственный препарат» по шкале Наранжо

INTRODUCTION. According to the World Health Organization (WHO) data, one of the first places in death statistics is taken by adverse reactions that occur during the use of medicines. Currently, the incidence of adverse events in outpatient admission reaches 10–20%, and from 0.5 to 5% of patients may need hospitalization for the treatment of complications caused by medicines [1–3]. The growing sensibilization of the population to chemical compounds and biologically active substances due to their availability and wide distribution in the pharmaceutical market, increases the probability of drugs side effects [1].

The study and evaluation of drug safety, the development of approaches to optimize the selection, prescription and rational use of drugs is the most important issue, especially for the diseases that hold leading positions in the prevalence, severity and mortality of the population.

One of these diseases, the global nature of which has been confirmed by the WHO data, is the human immunodeficiency virus (HIV) [4]. At the beginning of 2017, there were 36.7 million cases in the world, including 2.1 million children who had become infected with HIV

from the mother during pregnancy or childbirth (vertical transmission) [5]. The number of HIV-infected people registered in the Russian Federation at the end of 2015 amounted to more than 1 million people, with mortality rates of 212.500 people, which confirms the high social danger of this disease [6].

In this regard, not only the development of new medicines for the treatment of HIV, but also the rational use and study of adverse reactions of those medicines that already exist on the pharmaceutical market and are included in the HAART, are becoming especially relevant [7–10]. Currently, the standard HAART includes a combination of two Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI) as a basis in combination with non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTI) or an enhanced protease inhibitor [11]. Hereby, the choice of medicines to improve the quality of life and patients' compliance during antiretroviral therapy should be based on their effectiveness and safety.

The presence of certain specific toxicity characteristic for each class of medicines included in the HAART should be notified. So, the most typical adverse reactions

to the NRTI group are gastrointestinal disorders; myelosuppression, cardiomyopathy, lacticidosis; disorders of the CNS in the form of peripheral polyneuropathy. The use of drugs of the NNRTI group is associated with the occurrence of hepatotoxicity, allergic reactions and CNS disorders. The use of protease inhibitors group is most often associated with the occurrence of disorders of the gastrointestinal tract, lipodystrophy, hyperlipidemia and hyperglycemia [7].

THE AIM. The aim of this research was to determine the main pharmacotherapeutic groups of antiviral drugs used for HIV infection in patients living in the Republic of Crimea, as well as to establish the incidence and clinical manifestations of adverse reactions in their use.

MATERIALS AND METHODS. The objects of research were adverse reactions report cards, registered in the regional base (registry) of spontaneous message called ARCADE (Adverse Reactions in Crimea, Autonomous Database) in the period from 2011 to 2016.

In total, 274 adverse reactions report cards have been analyzed in patients taking combined medicines and monotherapy for treatment of HIV.

The analysis was carried out taking into account the codes of The Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification System (ATC Code: J05AF, J05AG, J05AE, J05AR) [12]. To determine the involvement of a particular medicine to the patients' complications of therapy, a cause-effect relationship "medicine – adverse drug reaction (ADR)" was determined according to the Naranjo scale.

The severity of ADRs was established in accordance with the definition in paragraph 51 of Article 4 of Federal Law No. 61-FZ "On the Circulation of Medicines" dated 12 April, 2010 [13].

The methodology for analyzing ADR report cards did not imply making comparisons and determining the data correlations among themselves. The ADR frequency determination was performed in MS Excel 2016 Microsoft Office.

RESULTS AND DISCUSSION. For the analysis of ADRs that occur when using drugs for treating HIV, 274 report cards about ADR cases were selected; they were registered in the regional database of spontaneous messages ARCADE during the period from 2011 to 2016. It is worth notifying that 129 cases of ADR (47,1%) were associated with the use of combined medicines for treating HIV. Thus, the number of registered ADRs to antiretroviral medicines (including combinations of antiviral drugs active against HIV) amounted to 5.4% of the total number of ADR report cards registered during this period (5047 cards).

The analysis of ADR for antiviral medicines for the treatment of HIV in accordance with the "The Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification System" showed that among the monopreparations, the largest number of ADRs was registered when using medicines of the NNRTI group (97 cases, 35,4%) and the NRTI group (35 cases, 12,8%). The ADRs have been registered much less frequently when using medicines of the protease inhibitor group (Fig. 1).

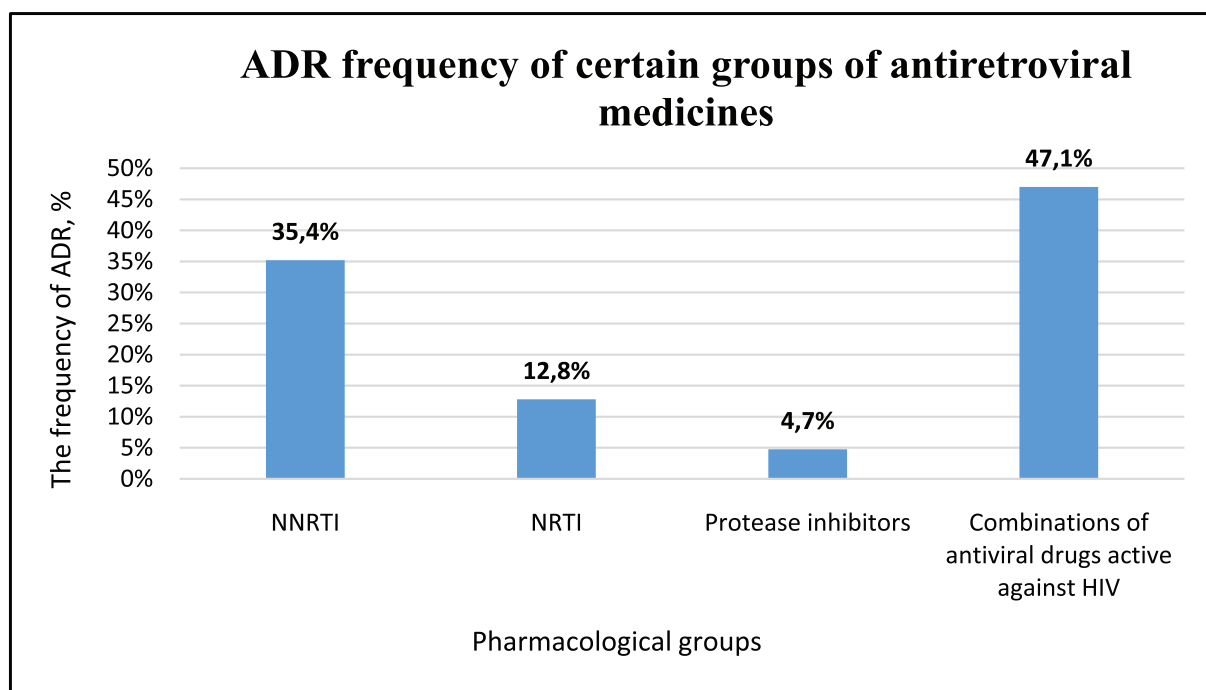


Figure 1 – ADR frequency of certain groups of antiretroviral medicines

The analysis of the ADR frequency dependence on specific drugs in each group showed that in the NNRTI group the drug "leader" in the incidence of the development of

ADR was Efavirenz (EFV) (J05AG03) – 81 cases (83,5%), much less frequently ADR was associated with the use of Nevirapine (NVP) (J05AG01) – 16 cases (16,5%) (Fig. 2).

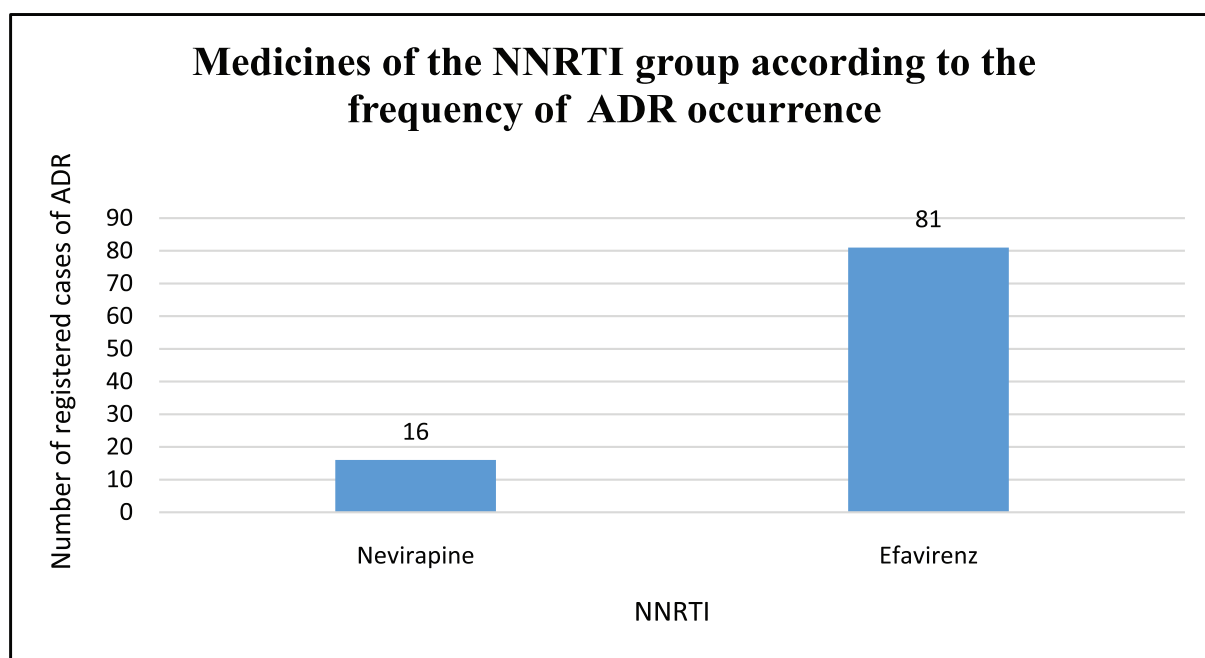


Figure 2 – Medicines of the NNRTI group according to the frequency of ADR occurrence

Among the medicines of the NRTI group, the largest number of ADR cases was registered with the use of Zidovudine (ZDV) (J05AF01) – 15 cases (42,9%) and

Abacavir (ABC) (J05AF06) – 11 cases (31,4%). The development frequency of ADR on other medicines in this group is presented in Fig. 3.

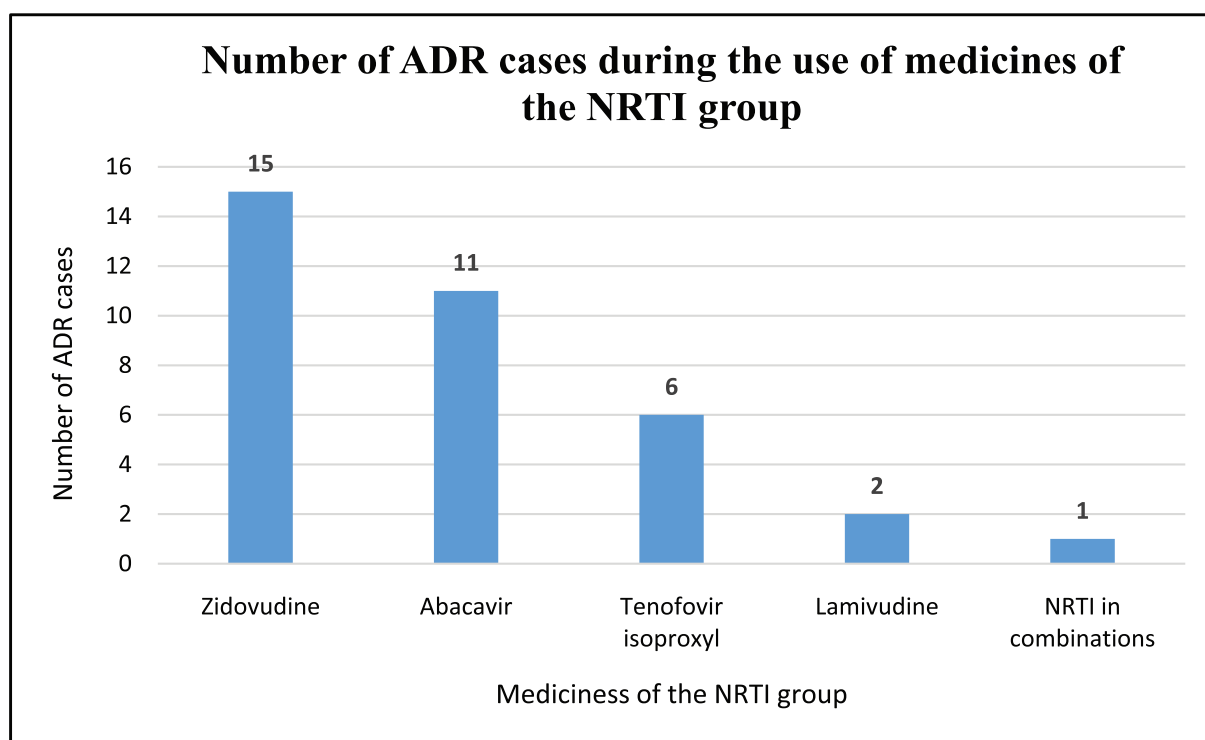


Figure 3 – Number of ADR cases during the use of medicines of the NRTI group

In the group of combined antiviral medicines active against HIV, ADRs most often occurred when using medicines that combine two nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (RTIs) – Lamivudine (3TC) and Zidovudine (ZDV) (116 cases, 90%). Less often ADRs were observed when using combinations of protease inhibitors Ritonavir and Lopinavir (ABT-378) (11 cases, 8.5%). In

2 cases the ADR development was associated with the use of a three-component medicine containing Tenofovir, Emtricitabine and Efavirenz (EFV) (Fig. 4).

The research of the ADR distribution of dependance on the patients' gender showed that ADRs were most frequent in female patients – 171 cases (62.4%), while in male patients ADRs were registered in 103 cases, which amounted to 37.6%.

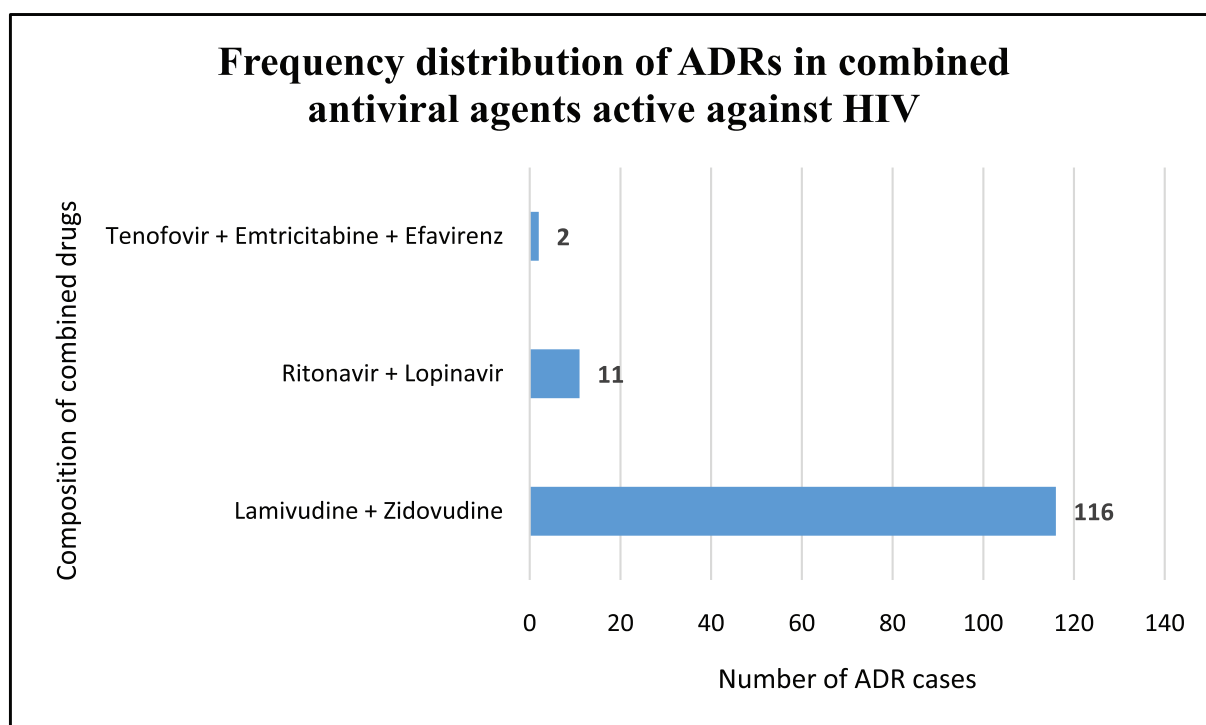


Figure 4 – Frequency distribution of ADRs in combined antiviral agents active against HIV

The analysis of the age periods of the patients in whom ADR cases were reported during antiretroviral therapy showed the following results (Fig. 5): most often complications of pharmacotherapy were recorded in the patients aged 31–45 years – 135 cases (49,3%) and 18 – in the patients aged

30 years – 62 cases (22,6%). This may be due to the highest incidence of infection and HIV detection in young people. At the age of 46–60 years (middle-aged people), ADRs were reported in 40 patients (14,6%). ADRs in children and elderly people were much less common (27 and 10 cases, respectively).

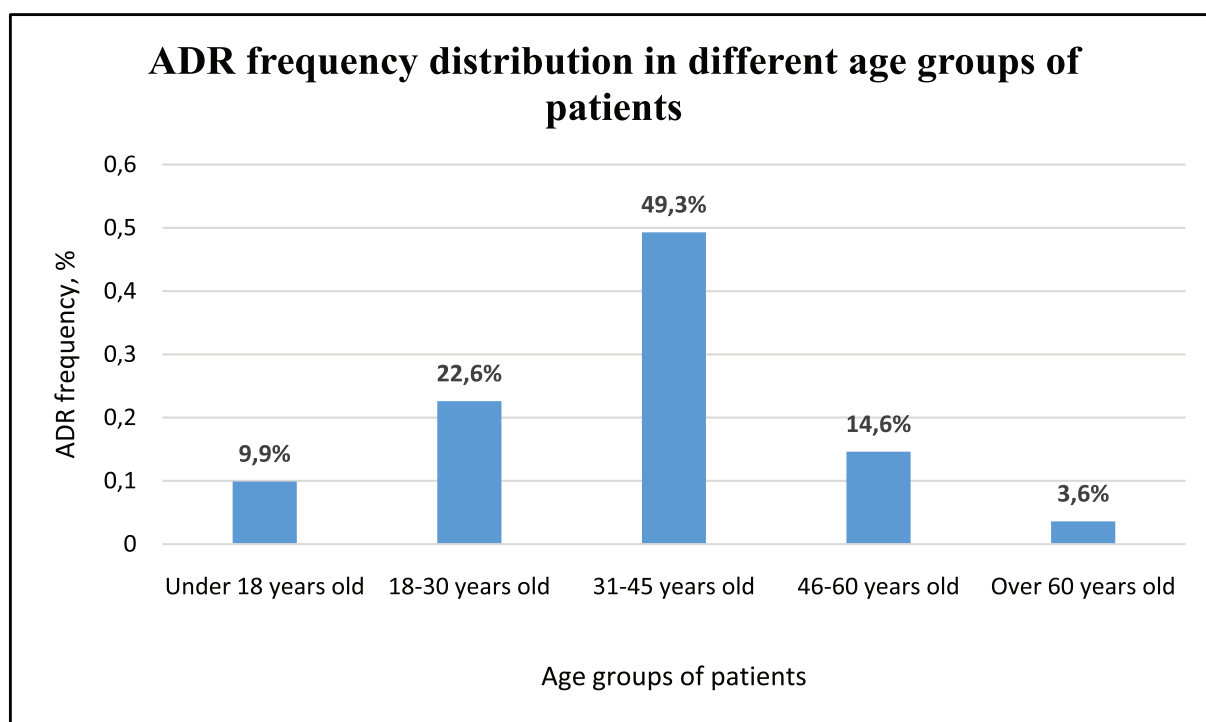


Figure 5 – ADR frequency distribution in different age groups of patients

The research of the clinical ADR manifestations was conducted in the groups of monotherapy and combined medicines separately, which made it possible to

identify some features of the ADRs of these groups of medicines (Fig. 6, Fig. 7). In the group of monotherapy when the most often medicines to treat HIV were

NNRTI, NRTI and protease inhibitors, the most frequent clinical manifestations of adverse reactions were CNS reactions and allergic reactions of varying severity (pruritus, urticaria, angioedema) (40% and 26.2% of cases, respectively). Much less often there were gastrointestinal adverse events (12.4%) and blood system adverse events (11% of cases). In contrast, the use of

combined antiviral drugs for treating HIV was most often associated with the occurrence of adverse reactions in patients in the form of hematopoietic suppression (95 cases, 73.4%). In isolated cases, ADRs were observed in the CNS (13 cases, 10.1%), gastrointestinal tract (10 cases, 7.7%) and in the form of local allergic reactions (9 cases, 7.0%).

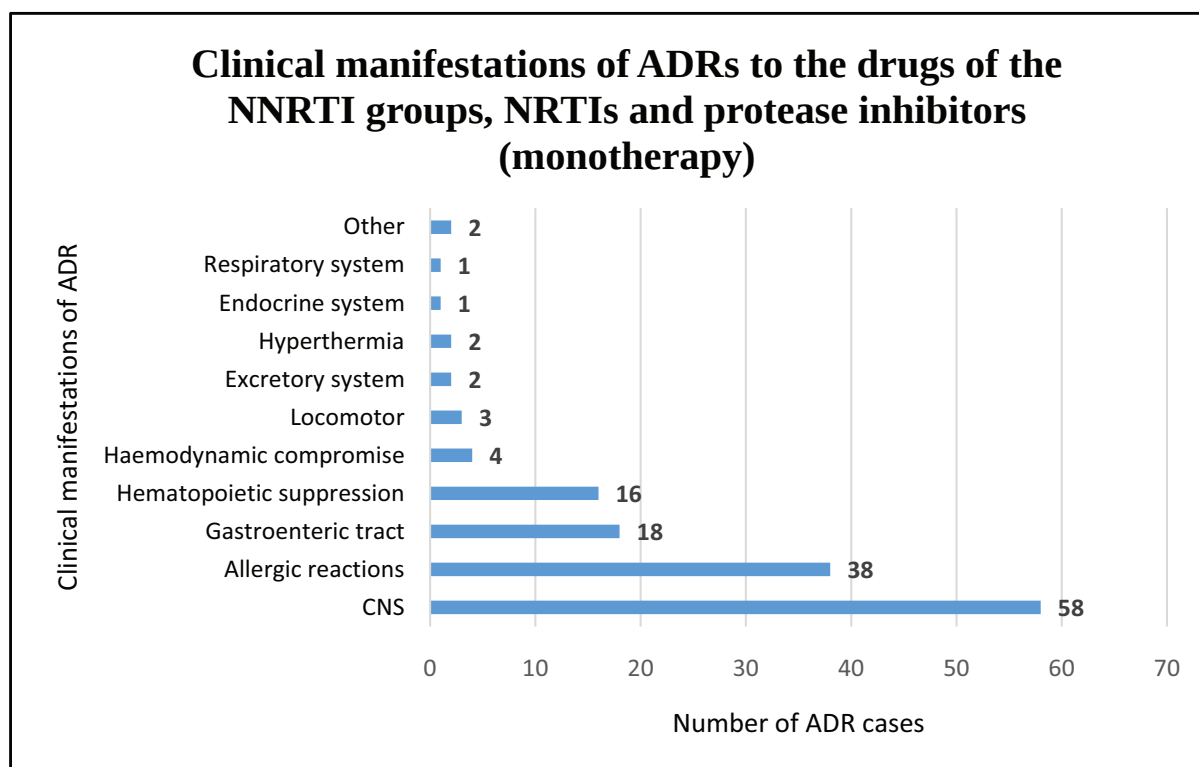


Figure 6 – Clinical manifestations of ADRs to the drugs of the NNRTI groups, NRTIs and protease inhibitors (monotherapy)

Drug correction aimed at stopping ADR clinical manifestations to antiretroviral drugs in the form of mono- and combination drugs was required in 179 cases (65.3%), which makes it possible to judge the severity of adverse reactions that occur when using drugs for the treatment of HIV. In 95 cases (34.7%), the patients did not need to correct the adverse reactions, and they stopped by themselves. Further analysis of the report cards of ADRs to the treatment of HIV was devoted to the study of a number of medicines prescribed simultaneously and the

detection of polypragmasy cases during pharmacotherapy of patients with HIV. The analysis of ADRs occurring when monotherapy was used to treat HIV showed that 93 cases (64.1%) were the results of coadministration of drugs from other pharmacological groups. Moreover, the simultaneous prescription of 4 or more drugs in these cases was observed in 15 report cards, i.e. this is an important point for assessing the cause-effect relationship between taking a drug and an emerging ADR and can be considered as evidence of polypragmasy.

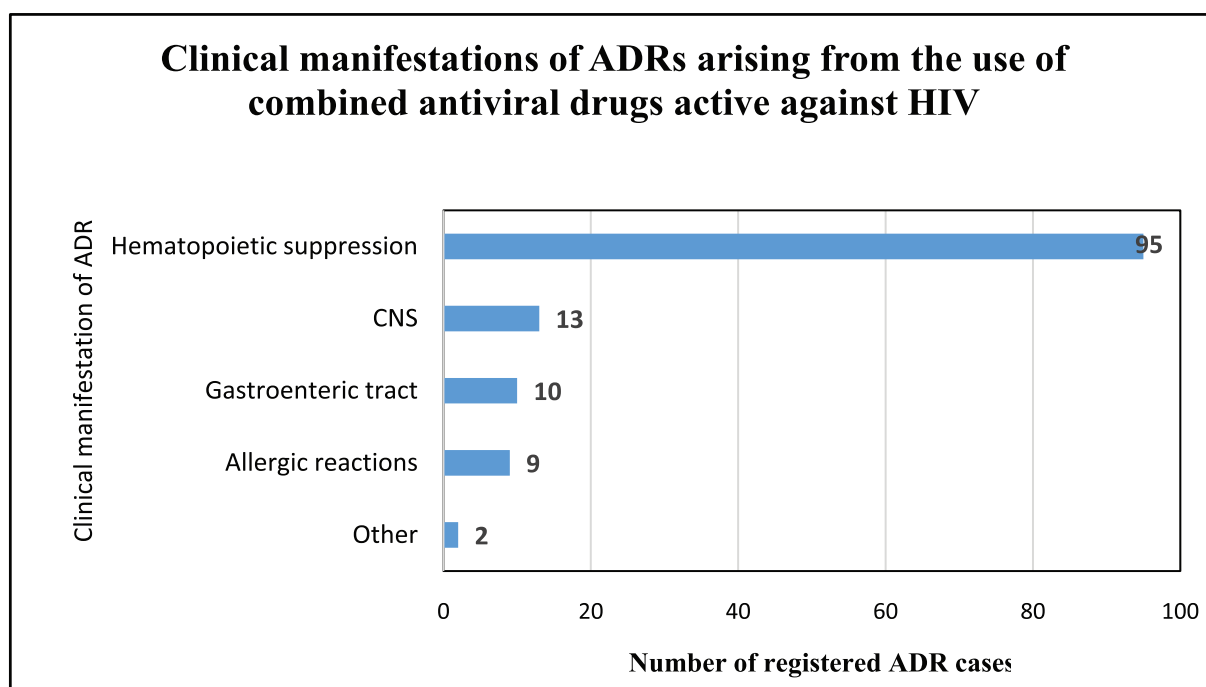


Figure 7 – Clinical manifestations of ADRs arising from the use of combined antiviral drugs active against HIV

The simultaneous use of two and three drugs was found in 25 and 7 cases of ADR, respectively. The prescription of combined antiviral drugs active against HIV to patients was most often (100 cases, 77.5%) and accompanied by the administration of a single drug as a concomitant therapy.

The examination of the outcomes of undesirable drug reactions in patients taking antiretroviral drugs of the NNRTI, NRTI groups and protease inhibitors showed that life-threatening disorders occurred in 5 cases (3.4%), hospitalization and extension of hospitalization terms were required in 34 (23.5%) and 7 cases (4.8%), respectively. It is worth notifying that the development of temporary disability was observed in 11 cases (7.6%), in the remaining 88 cases (60.7%) ADRs were not serious and did not cause the above-listed consequences.

The next stage of the analysis of the ADR report cards of antiviral drugs was devoted to the definition of a cause-effect relationship “medicine – ADR” in accordance with Naranjo scale. The results of the analysis were the following: the cause-effect relations between taking drugs of the NNRTI, NRTI groups, and protease inhibitors and the resulting ADRs were in most cases definite (74 cases, 51%). In 67 cases (46.2%) it was probable and in 4 cases (2.8%) it was possible. In the group of combined drugs for treating HIV, the cause-effect relationship was probable (99 cases, 76.7%), in 28 cases (21.7%) it was definite and in 2 cases (1.6%) it was possible (Fig. 8).

The results of the analysis of the ADR report cards of drugs used in the treatment of HIV infection, confirmed

the high frequency of such reactions and their severity, which is confirmed by the data from other researchers [10, 14–16]. Hereby, the most frequent cases of ADRs were observed when using drugs of the NNRTI and NRTI groups, which are explained by the inclusion of these drugs as the main ones in the HAART. The absolute leaders among these groups of antiretroviral drugs were Efavirenz (EFV) and Nevirapine (NVP). Among the combination of antiviral drugs active against HIV, most frequently ADRs were associated with the use of combinations with Lamivudine (3TC) and Zidovudine (ZDV). The main clinical manifestations of ADRs in the use of combination drugs for treating HIV were a decrease in the level of hemoglobin and the development of anemia. At the same time, in 85% of cases, the patients needed medication in order to correct the resulting ADRs. Antiretroviral therapy by combined antiviral drugs active against HIV has been often associated with the development of severe ADRs. In case of monotherapy, the main clinical manifestations of adverse reactions were disorders of the central nervous system (dizziness, hallucinations, sleep disorders) and allergic reactions of varying severity (including 1 case of angioedema to “Efervan” (Efavirenz (EFV)), 600 mg). Moreover, in almost half of the cases, the usage of antiretroviral medicines of the NNRTI, NRTI groups and protease inhibitors caused the development of severe side effects. This confirms the necessity to study and analyze adverse reactions in order to increase the safety of patients’ pharmacotherapy and improve their quality of life.

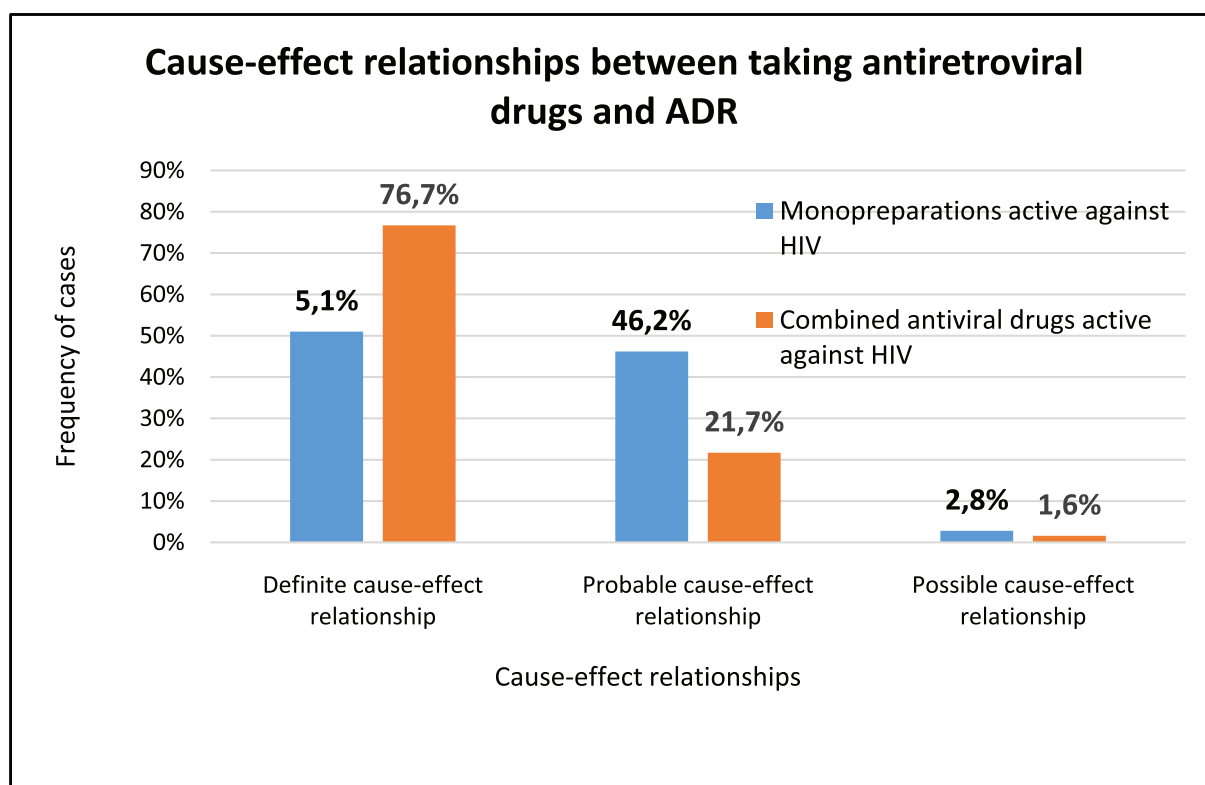


Figure 8 – The degree of reliability of the cause-effect relationship “ADR-medicine” on the Naranjo scale

CONCLUSION. According to recent studies in the Russian Federation, there has been a steady increase in patients with HIV infection who are in a progressive stage of the disease and require HAART. The use of antiretroviral drugs in this case is directly related to the occurrence of undesirable effects, the development of resistance to the virus and a decrease in the patient's quality of life. The development frequency of ADR in the application of various HAART regimens, according

to the St. Petersburg AIDS Center, is about 12%, and most often such ADRs are serious and require medical correction.

Recognizing potentially dangerous complications of HAART, studying the mechanisms for developing ADRs, as well as preventing the side effects of antiretroviral drugs, can increase patients' adherence to long-term treatment of HIV, improve their quality of life and, consequently, increase their life expectancy.

Библиографический список

1. Неблагоприятные побочные реакции лекарственных средств: пособ. для врач. / Под ред. А.Т. Бурбелло. – 2-е изд: перераб. и доп. – СПб.: Стикс, 2009. – 34 с.
2. Матвеев А.В., Крашенинников А.Е., Егорова Е.А. Роль «off-label» назначений как фактора возникновения нежелательных побочных реакций на лекарственные средства в педиатрической практике // Вопросы практической педиатрии. – 2018. – Т. 13, №4. – С. 18–24. DOI: 10.20953/1817-7646-2018-4-18-24
3. Цветов В.М. Мониторинг неблагоприятных побочных реакций лекарственных препаратов в амбулаторно-поликлиническом учреждении на современном этапе: автореф. дис. ... канд. мед. н. – Челябинск, 2007. – 26 с.
4. ВИЧ/СПИД. Информационный бюллетень. Ноябрь 2016 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/ru>.
5. Шалдина М.В., Пирогова И.А. Антиретровирусная терапия как основной метод лечения ВИЧ-инфекции. Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. – 2017. – Т. 2, №4(19). – С. 71–74.
6. Справка ВИЧ-инфекции в РФ на 31 декабря 2015 года. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Режим доступа: <http://childhiv.ru/wp-content/uploads/2015/04/sprav.pdf>.
7. Бобкова М.Р. Ингибиторы протеазы ВИЧ-1: особенности клеточного метаболизма и лекарственная устойчивость (обзор) // Терапевтический Архив. – 2008. – Т. 80, №10. – С. 77–80.
8. Cohen M.S., Chen Y.Q., McCauley M., Gamble T., Hosseinipour M.C., Kumarasamy N., Hakim J.G., Kumwenda J., Grinsztejn B., Pilotto J.H.S., Godbole S.V., Mehendale S. et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy // N Engl J Med. – 2011. – V. 365, №6. – P. 493–505. DOI: 10.1056/NEJMoa1105243.
9. TEMPRANO ANRS 12136 Study Group, Danel C., Moh R., Gabillard D., Badje A., Le Carrou J., Ouassa T., Ouattara E., Anzian A., Ntakpe JB., Minga A., Kouame G.M., Bouhousou F., Emieme A., Kouame A., Inwoley A., Toni T.D., Ahiboh H., Kabran M., Rabe C., Sidibe B., Nzunetu G., Konan R., Gnokoro J., Gouesse P., Messou E., Dohoun L., Kamagate S., Yao A., Amon S., Kouame A.B., Koua A., Kouame E., Ndri Y., Ba-Gomis O.,

- Daligou M., Ackoundzé S., Hawerlander D., Ani A., Dembélé F., Koné F., Guéhi C., Kanga C., Koule S., Séri J., Oyebe M., Mbakop N., Makaila O., Babatunde C., Babatunde N., Bleoué G., Tchoutedjem M., Kouadio A.C., Sena G., Yedédi S.Y., Assi R., Bakayoko A., Mahassadi A., Attia A., Oussou A., Mobio M., Bamba D., Koman M., Horo A., Deschamps N., Chenal H., Sassan-Morokro M., Konate S., Aka K., Aoussi E., Journot V., Nchot C., Karcher S., Chaix M.L., Rouzioux C., Sow P.S., Perronne C., Girard P.M., Menan H., Bissagnene E., Kadio A., Ettiegn-Traore V., Moh-Semdé C., Kouame A., Massumbuko J.M., Chêne G., Dosso M., Domoua S.K., N'Dri-Yoman T., Salamon R., Eholié S.P., Anglaret X. A trial of early antiretrovirals and isoniazid preventive therapy in Africa // *N Engl J Med.* – 2015. – V. 373, №9. – P. 808–822. DOI: 10.1056/NEJMoa1507198.
10. Гудилина Н.А., Ростова Н.Б. Нежелательные побочные реакции лекарственных препаратов как критерий безопасности терапии // *Медицинский альманах.* – 2017, №3. – С. 186–192. DOI: <http://dx.doi.org/10.21145/2499-9954-2017-3-186-192>.
 11. Юрин О.Г., Ефремова О.С. Европейские и Американские рекомендации по лечению ВИЧ-инфекции. Медицинский совет. – 2017, №4. – С. 67–72. DOI: 10.21518/2079-701X-2017-4-67-72.
 12. Справочник лекарственных препаратов Видаль. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.vidal.ru/>.
 13. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 №61-ФЗ. Российская Федерация. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/.
 14. Степанова Е.В., Захарова Н.Г., Торопов С.Э., Минин П.В. Побочные эффекты и оптимизация высокоактивной антиретровирусной терапии по материалам Санкт-Петербургского центра СПИД // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия.* – 2010. – Т. 2, №3, – С. 101–108.
 15. Громыко Н.Л., Теслова О.А., Барановская Е.И. Антиретровирусные препараты в профилактике вертикальной передачи ВИЧ // *Рецепт.* – 2008. – Т. 3, №59. – С. 132–137.
 16. Montessori V., Press N., Harris M. Akagi L., Montaner J.S.G. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection // *CMAJ.* – 2004. – V. 170, №2. – P. 229–238.

References

1. Burbello AT. Neblagopriyatnyye pobochnyye reaktsii lekarstvennykh sredstv: posobiye dlya vrachev [Adverse reactions of drugs: a manual for doctors]. 2009. 34 p. Russian.
2. Matveyev AV., Krashennnikov AE., Egorova EA. Rol «off-label» naznacheniy kak faktora vozniknoveniya nezhelatelnykh pobochnykh reaktsiy na lekarstvennyye sredstva v pediatricheskoy praktike. [The role of “off-label” prescriptions as a factor in the occurrence of unwanted adverse reactions to drugs in pediatric practice.]. *Clinical Practice in Pediatrics*, 2018;13(4):18–24. DOI: 10.20953/1817-7646-2018-4-18-24.
3. Tsvetov VM. Monitoring neblagopriyatnykh pobochnykh reaktsiy lekarstvennykh preparatov v ambulatorno-poliklinicheskom uchrezhdenii na sovremennom etape. [Monitoring of adverse drug reactions in an outpatient clinic at the present stage]. Theses. Chelyabinsk; 2007: 26. Russian
4. VICH/SPID. Informationsionnyy byulleten [HIV / AIDS. News bulletin]. November 2016. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/ru>. Russian.
5. Shaldina MV. Pirogova IA. Antiretrovirusnaya terapiya kak osnovnoy metod lecheniya VICH-infektsii [Antiretroviral therapy as the main treatment for HIV infection]. *Bulletin of the Council of Young Scientists and Specialists of the Chelyabinsk Region*. 2017;4(19):71–74. Russian.
6. Spravka VICH-infektsii v RF na 31 dekabrya 2015 goda. Federalnyy nauchno-metodicheskiy tsentr po profilaktike i borbe sos SPIDom FBUN Tsentralnogo NII epidemiologii Rospotrebnadzora [Certificate of HIV infection in the Russian Federation on December 31, 2015. Federal Scientific and Methodological Center for the Prevention and Control of AIDS of the Central Research Institute for Epidemiology of Rospotrebnadzor]. Available at: <http://childhiv.ru/wp-content/uploads/2015/04/sprav.pdf>. Russian.
7. Bobkova MR. Inhibitory proteazy VICH-1: osobennosti kletchnogo metabolizma i lekarstvennaya ustoychivost. [HIV-1 protease inhibitors: cell metabolism and drug resistance (review)]. *Therapeutic archive*. 2008;80(10): 77–80. Russian.
8. Cohen MS., Chen YQ., McCauley M., Gamble T., Hosseinipour MC, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Grinsztejn B, Pilotto JHS, Godbole SV, Mehendale S et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 2011;365(6):493–505. DOI: 10.1056/NEJMoa1105243.
9. TEMPRANO ANRS 12136 Study Group, Danel C., Moh R, Gabillard D, Badje A, Le Carrou J at al. A trial of early antiretrovirals and isoniazid preventive therapy in Africa. *N Engl J Med.* 2015;373(9):808–22. DOI: 10.1056/NEJMoa1507198.
10. Gudilina NA, Rostova NB. Nezhelatelnyye pobochnyye reaktsii lekarstvennykh preparatov kak kriteriy bezopasnosti terapii. [Unfavourable adverse reactions of medicines as the criterion of therapy safety]. *Meditsinskiy al'manah*. 2017;3:186–92. DOI: <http://dx.doi.org/10.21145/2499-9954-2017-3-186-192>. Russian.
11. Yurin OG., Efremova OS. Evropeyskiye i Amerikanskiye rekomendatsii po lecheniyu VICH-infektsii [The European and American guidelines for treatment of HIV infection]. *Meditsinskiy Sovet*. 2017;4:67–72. Russian.
12. Spravochnik lekarstvennykh preparatov Vidal. [Vidal's Handbook of medicines]. Available at: <https://www.vidal.ru/>. Russian.
13. Federalnyy zakon «Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv» 12.04.2010 y. [Federal Law No61 of April 12, 2010 on the Circulation of Medicines]. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/. Russian.
14. Stepanova EV, Zakharova NG, Toropov SE, Minin PV. Pobochnyye efekty i optimizatsiya vysokoaktivnoy an-

tiretrovirusnoy terapii po materialam Sankt-Peterburgskogo tsentra SPID. VICH-infektsiya i immunosupressiya [Side effects and optimization of highly active antiretroviral therapy according to the materials of the St. Petersburg AIDS Center]. HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. 2010;2(3):101–8. Russian.

15. Gromyko NL, Teslova OA, Baranovskaya EI. Antiretrovirusnye preparaty v profilaktike vertikalnoj peredachi VICH [Antiretroviral drugs in preventing vertical HIV transmission]. Recipe. 2008;3(59):132–7. Russian.
16. Montessori V, Press N, Harris M, Akagi L, Montaner JSG. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. CMAJ. 2004;170(2):229–38.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы

Матвеев Александр Васильевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры внутренней медицины №1 с курсом клинической фармакологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»; исполнительный директор АНО «Национальный научный центр фармаконадзора». Область научных интересов: система фармаконадзора, мониторинг безопасности лекарственных средств, анализ, оценка риска применения лекарственных средств, медицинских изделий и парфюмерной продукции. E-mail: avmcsmu@gmail.com.

Крашенинников Анатолий Евгеньевич – кандидат фармацевтических наук, Генеральный директор АНО «Национальный научный центр фармаконадзора». Область научных интересов: система фармаконадзора, мониторинг безопасности лекарственных средств, анализ, оценка риска применения лекарственных средств, медицинских изделий и парфюмерной продукции. E-mail: anatoly.krashennnikov@drugsafety.ru.

Егорова Елена Александровна – кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры внутренней медицины №1 с курсом клинической фармакологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». Область научных интересов: система фармаконадзора, мониторинг безопасности лекарственных средств, анализ, оценка риска применения лекарственных средств. E-mail: elena212007@rambler.ru.

Коняева Елена Ивановна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры внутренней медицины №1 с курсом клинической фармакологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». Область научных интересов: система фармаконадзора, мониторинг безопасности лекарственных средств, анализ, оценка риска применения лекарственных средств. E-mail: konyayeva.simferopol@gmail.com.

Authors

Matveyev Alexander Vasilyevich – PhD (Medicine), docent of the Department of Internal Medicine No1 with the course of Clinical Pharmacology of Medical Academy n.a. S.I. Georgievsky of Vernadskiy CFU, Simferopol; Executive Director of National Pharmacovigilance Research Center. Research interests: pharmacovigilance system, monitoring of drug safety, analysis, risk assessment of drugs, medical products and perfumes. E-mail: avmcsmu@gmail.com.

Krashennnikov Anatoly Evgenievich – PhD (Pharmacy), CEO of National Pharmacovigilance Research Center. Research interests: pharmacovigilance system, monitoring of drug safety, analysis, risk assessment of drugs, medical products and perfumes. ORCID: 0000-0002-7791-6071. E-mail: anatoly.krashennnikov@drugsafety.ru

Egorova Elena Alekseevna – PhD (Pharmacy), assistant of the Department of Internal Medicine No 1 with the course of Clinical Pharmacology of Medical Academy n.a. S.I. Georgievsky of Vernadskiy CFU, Simferopol. Research interests: pharmacovigilance system, monitoring of drug safety, analysis, risk assessment of drugs, medical products and perfumes. E-mail: elena212007@rambler.ru.

Konyayeva Elena Ivanovna – PhD (Medicine), docent of the Department of Internal Medicine No1 with the course of Clinical Pharmacology of Medical Academy n.a. S.I. Georgievsky of Vernadskiy CFU, Simferopol. Research interests: pharmacovigilance system, monitoring of drug safety, analysis, risk assessment of drugs, medical products and perfumes. E-mail: konyayeva.simferopol@gmail.com.

Поступила в редакцию: 15.11.2018

Принята к печати: 18.12.2018

Received: 15.11.2018

Accepted for publication: 18.12.2018

АГРЕГАТНЫЙ ПОДХОД К ПЕРИОДИЗАЦИИ СТАНОВЛЕНИЯ СИСТЕМЫ ФАРМАКОНАДЗОРА

Крашенинников А.Е.

Автономная некоммерческая организация «Национальный научный центр Фармаконадзора»,
127051, Россия, г. Москва, ул. Малая Сухаревская площадь, 2, корп. 2
E-mail: anatology.krashennnikov@drugsafety.ru.

Цель. Систематизация известной фактологической базы, относящейся к формированию глобальной системы фармаконадзора, и ее дальнейшего использования для периодизации развития выбранного социального института. **Материалы и методы.** Разработка периодизации исторического развития всемирной системы фармаконадзора осуществлялась с использованием системного, гносеологического, историко-описательного методов, а также с помощью метода обобщения. **Результаты.** Результаты проведенного исследования позволили идентифицировать ряд этапов мирового развития и институционализации фармаконадзора. **Заключение.** Проведенное исследование позволило подтвердить, что агрегатный подход, примененный к глобальному генезу мировой системы фармаконадзора, является эффективным научно-методологическим приемом, способствующим разработке нового уровня обобщения и систематизации знаний о фармаконадзоре, как сложном институте, конгломерирующем в себе науку и практическую межгосударственную деятельность.

Ключевые слова: система фармаконадзора, нежелательные реакции, агрегатный подход, периодизация

THE AGGREGATE APPROACH TO THE PERIODIZATION OF THE FORMATION OF THE PHARMACOVIGILANCE SYSTEM

Krashennnikov A.E.

National Pharmacovigilance Research Center
2/2, Malaya Sukhrevskaya Str., Moscow, Russian Federation, 127051
E-mail: anatology.krashennnikov@drugsafety.ru.

The aim of this article is to systematize the known data based on facts relating to the formation of the global pharmacovigilance system, and its further use for the periodization development of the selected social institution. **Materials and methods.** The development of the periodization of the historical development of the world pharmacovigilance system was carried out using the systematic, epistemological, historical descriptive methods, as well as using the method of generalization. **Results.** The results of the study made it possible to identify a number of stages in the global development and institutionalization of pharmacovigilance. **Conclusion.** The carried out research confirmed that the aggregate approach applied to the global genesis of the world pharmacovigilance system is an effective scientific and methodological technique that contributes to the development of a new level of application and systematization of knowledge about pharmacovigilance as a complex institution, conglomerating in-house science and practical interstate activity.

Keywords: pharmacovigilance system, adverse reactions, aggregative approach, periodization

ВВЕДЕНИЕ. Безусловно, при изучении явления развития в отношении любого научного объекта важно учитывать объективную поступательность и качественную фазность процесса генезиса [1–3]. Однако выделение качественно однородных этапов развития

представляет для исследователей признанную сложность [4]. Перечисленные положения в полной мере справедливы как в отношении медицины вообще [5], так и для фармаконадзора в частности, являющего сегодня неоспоримой по значимости интегративной

Для цитирования:

Крашенинников А.Е.
АГРЕГАТНЫЙ ПОДХОД К ПЕРИОДИЗАЦИИ
СТАНОВЛЕНИЯ СИСТЕМЫ
ФАРМАКОНАДЗОРА
Фармация и фармакология. 2018;6(6):584-589
DOI:10.19163/2307-9266-2018-6-6-584-589
© Крашенинников А.Е., 2018

For citation:

Krashennnikov A.E.
THE AGGREGATE APPROACH
TO THE PERIODIZATION OF THE FORMATION
OF THE PHARMACOVIGILANCE SYSTEM
Pharmacy & Pharmacology. 2018; 6(6):584-589. Russian.
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-6-584-589

медико-правовой категорией, установленной Всемирной Организацией Здравоохранения и ратифицированной Российской Федерацией [6, 7]. Ход развития фармаконадзора, как всемирного социального института, обеспечивающего безопасность режима обращения лекарственных средств, в последние годы неоднократно подвергался пристальному вниманию исследователей. Между тем, его эволюционирующая и самоорганизующаяся природа в укрупненном анализе этапов развития так и не была разработана. Следовательно, существует объективная проблема необходимости систематизации известной фактологической базы, относящейся к формированию глобальной системы фармаконадзора, и ее дальнейшего использования для периодизации развития выбранного социального института.

ЦЕЛЬ. В соответствии с выявленной проблемой целью настоящего исследования явилась разработка периодизации исторического развития всемирной системы фармаконадзора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Для достижения цели исследования использовались такие методы, как системный, гносеологический, историко-описательный, а также метод обобщения. Перечисленные методы применялись в рамках агрегатного подхода, идентифицирующего совпадение тенденций развития в моменте времени [4]. Специфика эпохи определялась по нескольким критериям. В качестве первого критерия был выбран уровень глобальности социальных и политических субинститутов фармаконадзора, принимая во внимание тот факт, что на каждом этапе его развития субинституты становились все более сложными и масштабными. Вторым критерием послужило географическое распределение «ядер» появления субинститутов фармаконадзора в начале своего развития, а также степень их информационной консолидации на более поздних этапах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты проведенного исследования позволили идентифицировать ряд этапов мирового развития и институционализации фармаконадзора. На основании агрегации тенденций по двум критериям разработана периодизация глобального развития фармаконадзора, которая вобрала три основных этапа.

I Этап. Этап локального институциогенеза

Данный выделенный нами этап охватывает период с 1848 г., когда была создана первая Комиссия, созданная периодическим медицинским изданием «Ланцет» в Великобритании с целью разбора летального исхода Ханны Гриннер из-за неконтролируемого введения хлороформа через насыщенную ткань, по 1906 г., когда в США было основано Управление по контролю за продуктами и лекарствами. Данный этап характеризовался параллельным развитием и нормативно-правовым закреплением субинститутов фармаконадзора в Великобритании и США на фоне революционной индустриализации и большого количества фальсификаций продуктов питания и лекарственных средств.

Среди значимых субинститутов фармаконадзора той эпохи следует выделить британские субинституты публичных экспертов (1872 г.) и Общество общественных аналитиков (1874 г.), а также североамериканский Департамент сельского хозяйства (1862 г.) [8, 9]. Передовыми деятелями фармаконадзора в Великобритании и в США в это время были, в основном, химики, в том числе назначенный президентом Авраамом Линкольном Чарльз М. Ветерилл. Основной задачей и целью основанных субинститутов было пресечение неконтролируемой торговли лекарственными средствами.

Наиболее показательную свою эффективность в повышении безопасности использования лекарств продемонстрировало в 1962 г. Управление по контролю за продуктами и лекарствами США, когда Фрэнсис О. Келси, ответственная за утверждение лицензий на лекарства, не допустила на рынок США препарат талидомид и была впоследствии награждена Президентом Джоном Ф. Кеннеди за предотвращение катастрофы.

II Этап. Этап тотального институциогенеза

Второй этап глобального развития фармаконадзора охватывает период с 1949 года, когда появление субинститутов институтов фармаконадзора в различных странах мира становится массовым, а мировое медицинское сообщество начинает предпринимать консолидирующие меры в отношении безопасности лекарственных средств с помощью решений неправительственного Совета Международных Организаций в области Медицинских Наук (1949 г.) и Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ).

В 1953–1968 гг. США, Австралия, Канада, Чехословакия, Германия, Нидерланды, Ирландия, Новая Зеландия, Швеция, Великобритания начали собирать отчеты о неблагоприятных реакциях лекарств, применяя формуляры спонтанных сообщений, в том числе британскую «Желтую карточку». Однако усилий отдельных стран оказалось недостаточно, что стало явным на фоне продолжающихся массовых трагедий, связанных с применением лекарственных средств, в том числе: хлорамфениколом в США (1952 г.); сталиномом во Франции (1954 г.); талидомидом в 46 странах (1953–1961 гг.). Последний оказал наиболее разрушительное действие на организм детей по всему миру: до 12 000 пострадавших детей родились до того, как этот препарат был запрещен. В результате, в европейской судебной практике укоренился термин «синдром талидомида». В результате «талидомидовой трагедии» в 1962 г. ВОЗ признала серьезность проблемы безопасности лекарств и на протяжении ближайших 4-х лет разработала ряд Резолюций, в том числе Резолюцию WHA 19.35 1966 г., направленную на международный мониторинг неблагоприятных реакций на лекарства. Последняя стала вехой окончания эпохи, когда институт фармаконадзора фактически постулировался в качестве инициативы и прерогативы передовых, индустриальных стран, и означала переход к глобализации и всемирному мо-

нитингу побочных реакций на лекарства под эгидой ВОЗ.

III Этап. Этап институциональной и информационной консолидации

Третий этап глобального развития фармаконадзора, охватывающий время с 1967 г. по сегодняшний день, сопровождается интенсивной институциональной и информационной консолидацией системы фармаконадзора. Главным субинституциональным нововведением данной эпохи стал пилотный проект ВОЗ по международному мониторингу побочных реакций на лекарства, закрепленный Резолюцией Всемирной Ассамблеи Здравоохранения WHA 20.51. В данном проекте в 1968 г. при финансовой поддержке США был основан Александрийский международный Центр по международному мониторингу безопасности лекарственных средств, к работе которого в последующем присоединились такие страны, как Австралия, Канада, Чехословакия, Германия, Нидерланды, Ирландия, Новая Зеландия, Швеция, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии с национальными центрами мониторинга

лекарств. Так начала свою работу Программа ВОЗ по международному мониторингу лекарственных препаратов (The WHO Programme for International Drug Monitoring). Результаты пилотного проекта, законченного к 1970 г., были настолько эффективны, что Резолюцией WHA 23.1 было установлено формирование постоянного консолидирующего института фармаконадзора на основе многоцентровой международной системы государств-членов. В 1978 г. Центр международного мониторинга лекарств ВОЗ переехал в Швецию в г. Уппсала и стал называться Международным центром по международному мониторингу безопасности лекарственных средств. Международный центр в г. Уппсала объединяет усилия уже 156 стран (2017 г.). Общая база данных нежелательных реакций на лекарственные средства (т.н. VigiBase), в которую поступает информация о нежелательных реакциях лекарственных средств с различных стран мира, на 8 апреля 2018 г. содержала данные из 16727060 неповторяющихся сообщений [10]. Все этапы развития мировой системы фармаконадзора представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Этапы мирового развития и институционализации системы фармаконадзора

Этап развития	Период	События, определяющие развитие системы фармаконадзора
I этап – этап локального институциогенеза	1848–1906 гг.	Создание и развитие первых субинститутов фармаконадзора в Великобритании и США, в т.ч. Управления по контролю за продуктами и лекарствами.
II этап – этап тотального институциогенеза	1949–1966 гг.	Создание субинститутов фармаконадзора во многих странах мира. Разработка и принятие ряда резолюций, направленных на международный мониторинг неблагоприятных реакций на лекарственные средства.
III этап – этап институциональной и информационной консолидации	1967 г. – по настоящее время	Разработка программы ВОЗ по международному мониторингу лекарственных препаратов. Создание Центра международного мониторинга лекарств ВОЗ.

Таким образом, агрегатный подход к анализу доказал свою эффективность, позволил нам выделить три вышеописанных этапа мирового развития и институционализации фармаконадзора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Полученные результаты исследования позволили сформулировать следующие выводы:

1. Агрегатный подход, примененный к изучению исторического генеза мировой системы фармаконадзора, способен консолидировать в моменте закономерности развития разных критериев. В предпринятом исследовании первым критерием является уровень глобальности социальных и политических субинститутов фармаконадзора; вторым критерием является географическое распределение таких субинститутов, а также степень их информационной консолидации.

2. В глобальном генезе мировой системы фармаконадзора, периодизированном на основе двухкритериального (институционального и информационно-географического) агрегатного подхода, выделено три различных по продолжительности и разнокачественных этапа: этапы локального институциогенеза, тотального институциогенеза, а также этап институциональной и информационной консолидации.

3. Агрегатный подход, примененный к глобальному генезу мировой системы фармаконадзора, является эффективным научно-методологическим приемом, способствующим разработке нового уровня обобщения и систематизации знаний о фармаконадзоре, как сложном институте, конгломерирующем в себе науку и практическую межгосударственную деятельность.

INTRODUCTION. Of course, when studying the phenomenon of development with respect to any scientific object, it is important to take into account the objective progress and the qualitative phase nature of the genesis process. [1–3]. However, the selection of qualitatively homogeneous stages of development represent a recognized complexity for researchers [4]. These provisions are fully valid both in relation to medicine in general [5] and for pharmacovigilance in particular, which today is indisputable in its importance as an integrative medical-legal category established by the World Health Organization and ratified by the Russian Federation [6, 7]. The development of pharmacovigilance as a world social institution that ensures the safety of the medicine circulation regime, has been subjected to the close attention of researchers in recent years. Meanwhile, its evolving and self-organizing nature in the enlarged analysis of the stages of development has never been developed. Consequently, there is an objective problem of the necessity to systematize the known factual base relating to the formation of a global system of pharmacovigilance, and its further use for the periodization of the development of the selected social institution.

THE AIM. In accordance with the identified problem, the aim of this study was to develop a periodization of the historical development of the world pharmacovigilance system.

MATERIALS AND METHODS. To achieve the goal of the research, such methods as systemic, epistemological, historical descriptive, as well as the method of generalization were used. The listed methods were used in the framework of the aggregate approach, which identifies the coincidence of development trends at a point in time [4]. The specificity of the era was determined by several criteria. As the first criterion, the globalization level of the social and political subinstitutes of pharmacovigilance was chosen, taking into account the fact that at each stage of its development subinstitutes became more complex and large-scale. The second criterion was the geographical distribution of the “nuclei” of the emergence of subinstitutes of pharmacovigilance at the beginning of its development, as well as the degree of their information consolidation at later stages.

RESULTS AND DISCUSSION. The results of the research made it possible to identify a number of stages in the global development and institutionalization of pharmacovigilance. Based on the aggregation of trends according to two criteria, a periodization of the global development of pharmacovigilance has been developed, which has incorporated three main stages.

Stage I. The stage of local institutional genesis

This stage we have singled out covers the period from 1848, when the first Commission was convened by the periodic medical publication of “The Lancet” in the UK to analyze the fatal outcome of Hannah Grinner due to the uncontrolled introduction of chloroform through the saturated tissue, until 1906, when The United States Food and Drug Administration was founded. This stage was characterized by the parallel development and reg-

ulatory consolidation of subinstitutes of pharmacovigilance in the United Kingdom and the United States amid revolutionary industrialization and a large number of falsifications of food and medicines. Among the significant subinstitutions of the pharmacovigilance of that era there are the British subinstitutes of public experts (1872), the Society of Social Analysts (1874), as well as the North American Department of Agriculture (1862) [8, 9]. At that time in the United Kingdom and the United States the foremost leaders of pharmacovigilance were mainly chemists, including Charles M. Veterill appointed by President Abraham Lincoln. The main objective and goal of the established subinstitutes was to suppress the uncontrolled trade in medicines. The United States Food and Drug Administration demonstrated its efficacy in improving drug safety in 1962, when Francis O. Celsey, responsible for approving medicine licenses, did not allow thalidomide to enter the US market and was subsequently awarded by President John F. Kennedy for accident prevention.

Stage II. The stage of total institutional genesis

The second stage of the global development of pharmacovigilance has covered the period from 1949, when the emergence of subinstitutes of pharmacovigilance institutions in various countries of the world became widespread, and the world medical community began to take consolidating measures regarding drug safety through the decisions of the nongovernmental Council for International Organizations of Medical Sciences (1949) and the World Health Organization (WHO).

In 1953–1968 the United States of America, Australia, Canada, Czechoslovakia, Germany, the Netherlands, Ireland, New Zealand, Sweden, the United Kingdom began to collect reports on adverse drug reactions, using spontaneous message forms, including the British “Yellow Card”. However, the efforts of individual countries turned out to be insufficient, which became clear against the background of continuing mass tragedies associated with the use of medicines, including: chloramphenicol in the USA (1952); Stalidon in France (1954); thalidomide in 46 countries (1953–1961). The latter had the most destructive effect on the body of children around the world: up to 12,000 affected children had been born before this drug was banned. As a result, the term “thalidomide syndrome” has taken root in European judicial practice. As a result of the “thalidomide tragedy” in 1962, WHO recognized the severity of the problem of drug safety and over the next 4 years developed a number of Resolutions, including Resolution WHA 19.35 1966, aimed at the international monitoring of adverse drug reactions. The last one was a milestone in the end of the era when the institute of pharmacovigilance was actually postulated as an initiative and prerogative of leading industrialized countries, and meant a transition to globalization and worldwide monitoring of adverse drug reactions under the auspices of WHO.

Stage III. The stage of institutional and informational consolidation

The third stage of the global development of pharmacovigilance, covering the time from 1967 to the present

day, is accompanied by intensive institutional and informational consolidation of the pharmacovigilance system. The main subinstitutional innovation of this era was a pilot project of WHO for the international monitoring of adverse drug reactions, secured by the World Health Assembly Resolution WHA 20.51. In this project, in 1968, with the financial support of the United States, the Alexandria International Center for International Monitoring of Drug Safety was founded, which was later joined by such countries as Australia, Canada, Czechoslovakia, Germany, the Netherlands, Ireland, New Zealand, Sweden, and the United Kingdom and Northern Ireland with national drug monitoring centers. This is how the WHO Program for International Drug Monitoring (WHO) started its work. The results of the pilot project, completed by

1970, were so effective that the formation of a permanent consolidating pharmacovigilance institute based on a multicenter international system of Member States was established by the Resolution WHA 23.1. In 1978, the WHO Center for International Drug Monitoring moved to Sweden in Uppsala and became known as the International Center for International Drug Safety Monitoring. The international center in Uppsala has already united efforts of 156 countries (2017). The general database of adverse drug reactions (so called VigiBase), which receives information about adverse drug reactions from various countries of the world, amounted to 16727060 nonrecurring messages at the time of 8 April, 2018 [10]. All stages of the development of the world pharmacovigilance system are presented in Table 1.

Table 1 – Stages of global development and institutionalization of the pharmacovigilance system

Stage of development	Period	Events determining the development of the pharmacovigilance system
Stage I – The stage of local institutional genesis	1848–1906	Creation and development of the first subinstitutes of pharmacovigilance in the UK and the USA, incl. Food and Drug Administration.
Stage II – The stage of total institutional genesis	1949–1966	Creating subinstitutes of pharmacovigilance in various countries of the world. The development and adoption of a number of resolutions aimed at international monitoring of adverse reactions to drugs.
Stage III – The stage of institutional and informational consolidation	1967 – until now	Development of a WHO program for international drug monitoring. Establishment of a WHO Center for International Drug Monitoring.

Consequently, the aggregate approach to the analysis has proven its effectiveness, allowing us to identify the three stages of global development and the institutionalization of pharmacovigilance described above.

CONCLUSION. The results of the study allowed us to formulate the following conclusions:

1. The aggregate approach applied to the study of the historical genesis of the world pharmacovigilance system can consolidate the patterns of development of different criteria. In the undertaken study, the first criterion is the global level of the social and political subinstitutions of pharmacovigilance. The second criterion is the geographical distribution of such subinstitutions, as well as the degree of their information consolidation.

2. In the global genesis of the world pharmacovigilance system, which is divided into periods on the basis of a two-criterion (institutional and information-geographical) aggregative approach, three stages, different in duration and quality, are distinguished: the stages of local institutional genesis, total institutional genesis, and the stage of institutional and information consolidation.

3. The aggregate approach applied to the global genesis of the world pharmacovigilance system is an effective scientific and methodological technique that contributes to the development of a new level of generalization and systematization of knowledge about pharmacovigilance as a complex institution, conglomerating science and practical interstate activity.

Библиографический список

1. Бобрышов С.В. Сравнительный анализ подходов к периодизации развития педагогических теорий и концепций и образовательной практики // Известия ЮФУ. Технические науки. – 2006, №1 (56). – С. 48–57.
2. Крашенинников А.Е., Матвеев А.В. Фармаконадзор как эффективный инструмент совершенствования менеджмента качества фармацевтической деятельности: этапы развития и перспективы // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2017. – Т. 7, №4. – С. 43–47.
3. Усмонов А. Историческая наука и цивилизационный подход // Ученые записки Худжандского государственного университета им. академика Б. Гафурова. Гуманитарные науки. – 2012, №1(29). – С. 135–147.
4. Иволина О.И. К вопросу о периодизации истории Нового и Новейшего времени // Сибирский педагогический журнал. – 2013, №1. – С. 54–59.
5. Богопольский П.М., Кабанова С.А., Гольдфарб Ю.С. О критериях периодизации истории частных областей медицины // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. – 2015, №4. – С. 58–61.
6. Федеральный закон от 12.04.2010 №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». «Российская газета». 14 апреля 2010 г., №78.

7. The importance of pharmacovigilance. Safety Monitoring of medicinal products. United Kingdom: World Health Organization, 2002. – 52 p. – Режим доступа: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4893e/#Js4893e>. (дата обращения: 11.04.2018 г.).
8. Jakimo A.L. Navigating the U.S. Food and Drug Administration's Regulatory Science Initiative: An Imperative for Stem Cell Research and Regenerative medicine Advocates // *Stem Cell Dev.* – 2013. – V. 22 (Suppl). – P. 73–78. DOI: 10.1089/scd.2013.0386.
9. Watson K.D. Medical and Chemical Expertise in English Trials for Criminal Poisoning, 1750–1914 // *Med Hist.* – 2006. – V. 50, №3. – P. 373–390.
10. Adverse Drug Reactions Monitoring. The World Health Organization. Режим доступа: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/advdugreactions/en/. (дата обращения: 10.09.2018 г.).

References

1. Bobryshov SV. Sravnitel'nyj analiz podhodov k periodizacii razvitiya pedagogicheskikh teorij i koncepcij i obrazovatel'noj praktiki [Comparative analysis of approaches to the periodization of the development of pedagogical theories and concepts and educational practice] *News of South Federal University. Technical science.* 2006;1:48–57. Russian.
2. Krashenninnikov AE, Matveev AV. Farmakonadzor kak effektivnyj instrument sovershenstvovaniya menedzhmenta kachestva farmacevticheskoy deyatelnosti: etapy razvitiya i perspektivy [Pharmacovigilance as an effective tool for improving the quality management of pharmaceutical activities: stages of development and prospectives]. *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2017;7(4):43–47. Russian.
3. Usmonov A. Istoricheskaya nauka i civilizatsionnyj podhod [Historical Science and Civilizational Approach]. *Scientific notes of Khudzhand State University. Acad. B. Gafurov.* 2012;1(29):135–147. Russian.
4. Ivonina OI. K voprosu o periodizacii istorii Novogo i Novejshego vremeni [To the question of the periodization of the history of the New and Newest Times]. *Siberian Pedagogical Journal.* 2013;1:4–59. Russian.
5. Bogopolskii PM, Kabanova SA, Goldfarb YuS. O kriteriyah periodizacii istorii chastnykh oblastej mediciny [About criteria of periodization of history of particular areas of medicine]. *Problems of Social Hygiene, Public Health and History of Medicine.* 2015;4:58–61. Russian.
6. Federal'nyj zakon ot 12.04.2010 №61-FZ «Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv». [The Federal Law of 12 April 2010 №61-FL «On the circulation of medicinal products»]. *Russian newspaper*, 14 Apr 2010, No 78. Russian.
7. The importance of pharmacovigilance. Safety Monitoring of medicinal products. United Kingdom: World Health Organization, 2002. – 52 p. – Available at: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4893e/#Js4893e>. (accessed 11 April 2018).
8. Jakimo AL. Navigating the U.S. Food and Drug Administration's Regulatory Science Initiative: An Imperative for Stem Cell Research and Regenerative medicine Advocates. *Stem Cell Dev.* 2013;22(1):73–8. DOI: 10.1089/scd.2013.0386.
9. Watson KD. Medical and Chemical Expertise in English Trials for Criminal Poisoning, 1750–1914. *Med Hist.* 2006;50(3):373–90.
10. Adverse Drug Reactions Monitoring. The World Health Organization. Available at: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/advdugreactions/en/. (accessed 10 September 2018).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Автор

Крашенинников Анатолий Евгеньевич – кандидат фармацевтических наук, Генеральный директор АНО «Национальный научный центр фармаконадзора». Область научных интересов: система фармаконадзора, мониторинг безопасности лекарственных средств, анализ, оценка риска применения лекарственных средств, медицинских изделий и парфюмерной продукции. E-mail: anatoly.krashenninnikov@drugsafety.ru. ORCID: 0000-0002-7791-6071.

Author

Krashenninnikov Anatoly Evgenievich – PhD (Pharmacy), National Pharmacovigilance Research Center. Research interests: pharmacovigilance system, monitoring of drug safety, analysis, risk assessment of drugs, medical products and perfumes. E-mail: anatoly.krashenninnikov@drugsafety.ru; ORCID: 0000-0002-7791-6071.

Поступила в редакцию: 02.11.2018

Принята к печати: 10.12.2018

Received: 02.11.2018

Accepted for publication: 10.12.2018

