

2021 Том / Volume IX

№ 2

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

Case Reports

**Дискуссии, рецензии, юбилеи,
научные школы, история**

фармации и фармакологии

Discussions, Referee Reports,
Anniversaries, Schools
of Thought, History
of Pharmacy and
Pharmacology



Научно-практический журнал

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Периодичность 6 номеров в год

Том 9, Выпуск 2, 2021

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

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

Черников Максим Валентинович доктор медицинских наук, доцент, г. Пятигорск, 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: Мищенко Екатерина Сергеевна, г. Пятигорск, Россия

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

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

Учредитель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

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

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

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ 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. Цена свободная.

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), Scopus, Web of Science (ESCI), РИНЦ, eLibrary, ВИНТИ, РГБ, КиберЛенинка, Соционет, EMBASE, 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, 2021

© Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, 2021

© Авторы, 2021

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

Maxim V. Chernikov

PhD (Medicine), Associate Professor, Pyatigorsk, 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 N., PhD (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia**Proofreader:** Mischenko Ekaterina S., Pyatigorsk, Russia**Translator:** Davydenko Lubov G., PhD (Philology), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia**Technical editor:** Dotsenko Marina A., Pyatigorsk, Russia*Founder: Volgograd State Medical University. 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131**Editors office address: 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Russia, 357532**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. Price free*

Journal "Pharmacy & Pharmacology" is recommended International Committee Of Medical Journal Editors and included in Higher Attestation Commission, Scopus, Web of Science (ESCI), Russian citation database, eLibrary, ARISTI (All-Russian Institute of Scientific and Technical Information), RSL (Russian State Library), CyberLeninka, Socionet, EMBASE, 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.

© Volgograd State Medical University, 2021

© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2021

©Authors, 2021

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS**ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ / RESEARCH ARTICLE****Фармакогнозия, ботаника / Pharmacognosy, Botany**

- | | |
|--|---|
| <p><i>Н.А. Рябов, В.М. Рыжов, В.А. Куркин,
С.Д. Колпакова, А.В. Жестков, А.В. Лямин</i>
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНО-
СПИРТОВЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ЛИСТЬЕВ И ПОЧЕК
ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (<i>QUERCUS ROBUR</i> L.)104</p> | <p><i>N.A. Ryabov, V.M. Ryzhov, V.A. Kurkin,
S.D. Kolpakova, A.V. Zhestkov, A.V. Lyamin</i>
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WATER-
ETHANOLIC EXTRACTS FROM
<i>QUERCUS ROBUR</i> L. LEAVES AND BUDS104</p> |
|--|---|

Фармацевтическая и токсикологическая химия / Pharmaceutical and Toxicological Chemistry

- | | |
|--|---|
| <p><i>Е.А. Джайн (Корсакова), Д.В. Демченко,
А.А. Озеров, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров,
В.Ю. Балабаньян</i>
ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ
МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ 1-[2-(2-БЕНЗОИЛФЕНОКСИ)
ЭТИЛ]-6-МЕТИЛУРАЦИЛА.....114</p> | <p><i>E.A. Jain (Korsakova), D.V. Demchenko,
A.A. Ozerov, M.N. Makarova, V.G. Makarov,
V.Yu. Balabanyan</i>
CHARACTERISATION AND STUDY
OF 1-[2-(2-BENZOYLPHENOXY)
ETHYL]-6-METHYLURACIL MECHANISM OF ACTION.....114</p> |
|--|---|

Фармакология и клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology

- | | |
|---|---|
| <p><i>Е.А. Орлова, А.Р. Умерова, И.П. Дорфман,
М.А. Орлов, М.А. Абдуллаев</i>
ОЦЕНКА СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКОГО
БРЕМЕНИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ
БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ ЗА 5-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД –
РЕГИОНАЛЬНЫЙ АСПЕКТ130</p> | <p><i>E.A. Orlova, A.R. Umerova, I.P. Dorfman,
M.A. Orlov, M.A. Abdullaev</i>
ESTIMATION OF SOCIO-ECONOMIC
BURDEN OF CHRONIC OBSTRUCTIVE
PULMONARY DISEASE FOR A 5-YEAR PERIOD:
A REGIONAL ASPECT130</p> |
| <p><i>Е.А. Солёнова, С.И. Павлова</i>
ИЗОЛИКВИРИТИГЕНИН ВЛИЯЕТ НА ФУНКЦИИ
ФАГОЦИТОВ И ПОВЫШАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ
МЫШЕЙ ПРИ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ139</p> | <p><i>E.A. Solenova, S.I. Pavlova</i>
ISOLYQUIRITIGENIN AFFECTS PHAGOCYTES
FUNCTIONS AND INCREASES MICE SURVIVAL RATE
IN STAPHYLOCOCCAL INFECTION139</p> |
| <p><i>А.А. Спасов, Л.А. Смирнова, О.Ю. Гречко,
Н.В. Елисеева, Ю.В. Лифанова, А.И. Ращенко,
О.Н. Жуковская, А.С. Морковник, В.А. Анисимова</i>
ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО
КАППА-ОПИОИДНОГО АНАЛЬГЕТИКА –
СОЕДИНЕНИЯ RU-1205 ПРИ ОДНОКРАТНОМ
ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ149</p> | <p><i>A.A. Spasov, L.A. Smirnova, O.Yu. Grechko,
N.V. Eliseeva, Yu.V. Lifanova, A.I. Rashchenko,
O.N. Zhukovskaya, A.S. Morkovnik, V.A. Anisimova</i>
PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF A
NEW KAPPA-OPIOID ANALGESIC RU-1205
COMPOUND AT A SINGLE
PERORAL ADMINISTRATION149</p> |

Информационные технологии в фармации / Informational Technologies in Pharmacy

- | | |
|--|--|
| <p><i>Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин</i>
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ
ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ
АНТИРАДИКАЛЬНОЙ (НО•) АКТИВНОСТИ
РОДСТВЕННЫХ СТРУКТУР, СОДЕРЖАЩИХ
ЦИННАМОИЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ. IV. ВЗАИМОСВЯЗЬ
СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ МЕЖДУ ИНДЕКСАМИ
НЕНАСЫЩЕННОСТИ И ПРОИЗВОДНЫМИ ФЛАВОНА
С ФЛОРОГЛУЦИНОВЫМ КОЛЬЦОМ «А»161</p> | <p><i>E.T. Oganasyan, S.S. Shatokhin</i>
USING QUANTUM-CHEMICAL PARAMETERS
FOR PREDICTING ANTIRADICAL (HO•)
ACTIVITY OF RELATED STRUCTURES CONTAINING
A CINNAMON OIL FRAGMENT.
IV. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP
BETWEEN UNSATURATION INDICES
AND FLAVONE DERIVATIVES
WITH FLOROGLUCIN RING "A"161</p> |
|--|--|

УДК 615.322:615.076.7:615.017



АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНО-СПИРТОВЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ЛИСТЬЕВ И ПОЧЕК ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR* L.)

Н.А. Рябов, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, С.Д. Колпакова, А.В. Жестков, А.В. Лямин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Получено 25.12.2020

Принята к печати 20.03.2021

Проблема поиска новых противомикробных препаратов на основе лекарственного растительного сырья в современной фармацевтической практике является по-прежнему актуальной. Интерес представляют растительные объекты, обладающие антимикробным действием благодаря содержанию в них комплекса биологически активных веществ. Дуб черешчатый – *Quercus robur* L. является перспективным растительным объектом, лекарственное растительное сырье которого может быть использовано при разработке новых антимикробных препаратов.

Цель. Проведение скрининга антимикробной активности водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого.

Материалы и методы. Определение минимальной ингибирующей концентрации проводилось методом двойных серийных разведений в питательном бульоне Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США). В качестве тестовых культур были использованы штаммы микроорганизмов Американской коллекции типовых культур (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), а также *Candida albicans* (клинический штамм). Инкубацию проводили при температуре 35°C в течение 24 часов. Параллельно проводился опыт для постановки «отрицательного» контроля. Оценку результатов проводили визуально по наличию/отсутствию роста микроорганизмов в пробирках с соответствующими разведениями исследуемых образцов.

Результаты. В ходе проведенного исследования установлено, что водно-спиртовые извлечения листьев дуба черешчатого оказывают наибольший антимикробный эффект в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Водно-спиртовые извлечения почек дуба черешчатого проявляют выраженную антимикробную активность в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*.

Выявлено, что препарат настойка листьев дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5) обладает выраженным антимикробным эффектом на штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, а при большей кратности разведения на штаммы *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Препарат настойка почек дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5) обладает выраженным антимикробным эффектом в отношении штаммов микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans* при восьмикратном разведении. В отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa* антимикробная активность наблюдалась при 16 кратном разведении. Максимально выраженный антимикробный эффект был зафиксирован в отношении штамма *Candida albicans* при 32-кратном разведении.

В результате проведенного исследования можно сделать вывод о том, что для получения противомикробных препаратов – настойки листьев и почек дуба черешчатого, целесообразно использовать в качестве оптимального экстрагента спирт 70% в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5). При данных параметрах экстракции отмечается наибольший антимикробный эффект в отношении изучаемых штаммов микроорганизмов. Также спирт 70% обладает лучшей проникающей способностью в глубокие слои эпидермиса по сравнению с более высокими концентрациями.

Заключение. Полученные результаты скринингового анализа антимикробной активности будут использованы в качестве обоснования для внедрения антимикробных препаратов на основе листьев и почек дуба черешчатого в медицинскую и фармацевтическую практику.

Ключевые слова: Дуб черешчатый; *Quercus robur* L.; листья; почки; водно-спиртовые извлечения; настойка; минимальная ингибирующая концентрация; антимикробная активность

Список сокращений: ATCC – Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection); MRSA – Метициллин-резистентный золотистый стафилококк (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*); CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute; MRS-штаммы – Метициллин-резистентные стафилококки (Methicillin-resistant *Staphylococcus*); МИК – Минимальная ингибирующая концентрация; ГФ РФ – Государственная Фармакопея Российской Федерации; КОЕ/мл – Колониеобразующие единицы / мл; SMR-1547 – Индекс гербария Самарского государственного университета, кафедра экологии, ботаники и охраны природы, биологического факультета; МУК – Методические указания; Q. – *Quercus* L. (н-р, Q. *robur*)

Для цитирования: Н.А. Рябов, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, С.Д. Колпакова, А.В. Жестков, А.В. Лямин. Антимикробная активность водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):104-113. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-104-113

© Н.А. Рябов, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, С.Д. Колпакова, А.В. Жестков, А.В. Лямин, 2021

For citation: N.A. Ryabov, V.M. Ryzhov, V.A. Kurkin, S.D. Kolpakova, A.V. Zhestkov, A.V. Lyamin. Antimicrobial activity of water-ethanolic extractions from *Quercus Robur* L. leaves and buds. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(2):104-113. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-104-113

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WATER-ETHANOLIC EXTRACTS FROM *QUERCUS ROBUR* L. LEAVES AND BUDS

N.A. Ryabov, V.M. Ryzhov, V.A. Kurkin, S.D. Kolpakova, A.V. Zhestkov, A.V. Lyamin

Samara State Medical University,
89, Chapaevskaya Str., Samara, Russia, 443099

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Received 25 Dec 2020

Accepted 20 March 2021

The problem of finding new antimicrobial drugs based on medicinal plant raw materials in modern pharmaceutical practice, is still relevant. There are interesting plant objects that have an antimicrobial action due to the content of a complex of biologically active substances in them. *Quercus robur* L. is a promising plant object, medicinal plant raw materials of which can be used for the development of new antimicrobial drugs.

The aim of the study is screening of the antimicrobial activity of water-ethanolic extractions from *Quercus robur* L. leaves and buds.

Materials and methods. The determination of the minimum inhibitory concentration was carried out by the method of double serial dilutions in Mueller-Hinton nutrient broth (Bio-Rad, USA). As test cultures, strains of microorganisms of the American Type Culture Collection (ATCC) were used: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), as well as *Candida albicans* (a clinical strain). The incubation was carried out at the temperature of 35°C for 24 hours. Simultaneously, an experiment was carried out to establish a "negative" control. The results were assessed visually by the presence / absence of the growth of microorganisms in test tubes with the corresponding dilutions of the test samples.

Results. In the course of the study, it was found out that water-ethanolic extractions of *Quercus robur* L. leaves have the greatest antimicrobial effect against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The water-ethanolic extractions of *Quercus robur* L. buds exhibit a pronounced antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* strains.

It was revealed that the preparation of *Quercus robur* L. leaves tincture in the raw material:extractant ratio of 1:5 has a pronounced antimicrobial effect on the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and with a higher multiplicity of dilution – on the strains of *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The drug tincture of *Quercus robur* L. buds in the raw material:extractant ratio of 1:5 has a pronounced antimicrobial effect on the strains of microorganisms *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* in an eight-fold dilution. With respect to *P. aeruginosa* strains, antimicrobial activity was observed in 16-fold dilutions. The most pronounced antimicrobial effect was recorded against the *C. albicans* strain in a 32-fold dilution.

As a result of the study, it can be concluded that to obtain the antimicrobial drugs – tincture of *Quercus robur* L. leaves and buds – is advisable to use the optimal extractant – 70% alcohol in a raw material:extractant ratio of 1:5. With these parameters of extraction, the greatest antimicrobial effect is observed in relation to the studied strains of the microorganisms. 70% alcohol has also a better penetrating ability into the deep layers of the epidermis in comparison with higher concentrations.

Conclusion. The results of the screening analysis of the antimicrobial activity will be used as a justification for the introduction of antimicrobial drugs based on the leaves and buds of the *Quercus robur* L. in a medical and pharmaceutical practice.

Key words: English oak; *Quercus robur* L.; leaves; buds; water-ethanolic extractions; tincture; minimum inhibitory concentration; antimicrobial activity

List of abbreviations: ATCC – American Type Culture Collection; MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute; MRS strains – Methicillin-resistant *Staphylococcus*; MIC – Minimum inhibitory concentration; SP RF – State Pharmacopoeia of the Russian Federation; CFU / ml – Colony forming units / ml; SMR-1547 – Index Herbarium of the Samara State University, Department for Ecology, Botany and Nature Protection Faculty of Biology; G, MUK – "Guidelines", "Methodical instructions"; Q. – *Quercus* L. (eg, *Q. robur*). – English oak

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время получение новых антимикробных препаратов на основе растительного сырья является актуальной задачей современной фармации. Распространение антимикробной резистентности представляет собой серьезную опасность, которая заключается в снижении эффективности мероприятий по профилактике и лечению инфекционных заболеваний человека [1, 2].

В плане поиска новых противомикробных препаратов перспективным объектом является представитель

рода *Quercus* L., вид – дуб черешчатый (*Quercus robur* L.). В роде *Quercus* L. более 500 видов из умеренных и субтропических районов Северного полушария. В России в диком виде произрастают 19 видов, интродуцировано около 50 видов [3, 4]. Дуб является одной из важнейших лесообразующих пород Европы и европейской части России [3, 4]. Дуб черешчатый достаточно широко применяется в народной медицине в качестве средства при профилактике и лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, гинекологических заболеваний, а также при оториноларингологических

и дерматологических заболеваниях. Официальным классическим лекарственным средством, обладающим вяжущими и противовоспалительными свойствами, является отвар коры дуба черешчатого [5–7]. За последнее время было проведено большое количество исследований, посвященных изучению антимикробных свойств коры дуба, а также препаратов на ее основе [8–16]. Кора дуба черешчатого входит в состав многих комплексных препаратов, например, «Стоматофит», «Тонзилгон Н», «Дентос» и др., а также используется для получения экстрактов, используемых в медицинских и косметологических целях¹. В коре дуба помимо дубильных веществ содержатся тритерпены (фриделин, фриделинол, 3-фриделанол), флавоноиды, такие как кверцетин, кверцитрин, лейкоантоцианидин и др. [13, 17–19]. Флавоноиды как группа биологически активных соединений обладают рядом ценных фармакологических свойств, таких как противовоспалительное, диуретическое, желчегонное, спазмолитическое, противовирусное, антимикробное и др.² [18–20].

Ранее, в целях поиска новых антибактериальных средств, было проведено исследование вида *Quercus incana*, в ходе которого было выделено два вещества: 4-гидроксидекановая кислота и 4-гидрокси-3- (гидроксиметил)пентановая кислота. Выделенные соединения были протестированы на наличие противогрибковой активности против *Aspergillus niger* и *Aspergillus favus*. Антибактериальную активность выделенных соединений определяли методом диффузии в лунки агара. Соединение 4-гидроксидекановая кислота проявляло большую антимикробную активность против *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus luteus* (грамположительные). Полученные соединения проявляли антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus* с зоной подавления 16 мм и 13 мм. Соединение 4-гидрокси-3-(гидроксиметил)пентановая кислота было умеренно активным в отношении *Bacillus subtilis* и *Micrococcus luteus* с зоной подавления 5 мм и 9 мм. Оба соединения были неактивны в отношении *Escherichia coli* и *Shigella flexneri* [11].

Было проведено исследование по изучению профиля полифенолов в экстрактах, полученных из коры *Q. robur*, *Q. macrocarpa* и *Q. acutissima*, в результате которого была выявлена антиоксидантная, антибактериальная, противогрибковая и противоопухолевая активность. *Q. robur* проявлял значительную антимикробную активность против *Pseudomonas aeruginosa* по сравнению с экстрактами других видов [13].

Проводилось исследование по определению антимикробной активности метанольного экстракта коры *Quercus robur* (раствор 80% метанола в воде), который тестировали методом диффузии в агар на штам-

мы *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* и *Candida albicans* [14]. В результате исследования была определена возможность использования экстрактов коры дуба в качестве бактерицидного средства в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и бактериостатического средства в отношении *Enterobacter aerogenes* [14]. Липофильные экстракты проявляли активность против штаммов *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* и *Candida albicans* [14].

Помимо водных извлечений коры дуба черешчатого, интерес представляют водно-спиртовые извлечения из других видов растительного сырья данного растения, таких как листья и почки дуба. На данный момент проведено достаточное количество исследований по изучению листьев дуба черешчатого как российскими, так и зарубежными учеными. Их внимание было сфокусировано на изучении морфолого-анатомических особенностей, химического состава и антимикробных свойств [21–24]. Листья представителей рода *Quercus* являются перспективными объектами для получения лекарственных препаратов с антимикробными свойствами [21–24]. Изучение почек дуба черешчатого наряду с листьями, на наш взгляд, является также актуальным направлением, потому как почки некоторых растений способны проявлять антимикробную активность и обладают ценным химическим составом [25, 26].

Одним из серьезных факторов при успешном лечении инфекционных заболеваний является снижение устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам [9, 27]. Особый интерес заслуживают стафилококки или метициллин-резистентные (MRS-штаммы), которые являются причиной внутрибольничных и внебольничных инфекций. Среди MRS-штаммов чаще всего обнаруживается золотистый стафилококк (MRSA), штаммы которого устойчивы к многим представителям группы β -лактамов антибиотиков, включая такие как пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы др. [9, 27]. Не менее опасным штаммом является грамотрицательная бактерия *E. coli*, которая присутствует в кишечнике человека и может быть причиной различных инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы [27, 28]. Изучения антимикробных свойств водно-спиртовых извлечений и препаратов на основе листьев и почек дуба черешчатого позволит расширить спектр фармакологической активности *Q. robur* и оценить возможности использования данного объекта при создании препаратов, применяемых в антибактериальной терапии.

Для объективной оценки антимикробной активности изучаемого сырья необходимо проведение скринингового анализа водно-спиртовых извлечений и определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в отношении основных клинически значимых штаммов микроорганизмов.

¹ Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_6283.htm

² Assessment report on *Quercus robur* L., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus pubescens* Willd., cortex EMA/HMPC/3206/2009. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en>

ЦЕЛЬ. Скрининговое изучение антимикробной активности водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.).

Задачи исследования

Проведение скринингового анализа антимикробной активности водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.);

Определение оптимальной концентрации спирта этилового для создания препаратов на основе растительного сырья дуба черешчатого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись водно-спиртовые извлечения листьев и почек дуба черешчатого на различных концентрациях спирта этилового марки ХЧ (40%, 70%, 80%, 96%) (Спирт 96%, ООО «Гиппократ», Россия, г. Самара, серия: 360917) в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50). Также были получены препарат настойка листьев дуба черешчатого и настойка почек дуба черешчатого на 70% спирте в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5), полученные методом дробной перколяции. Необходимые концентрации спирта были получены путем разведения спирта 96%, по таблице №5 приложения к ГФ РФ XIV издания [7]. Для большинства флавоноидсодержащих растений оптимальным экстрагентом является спирт 70%, поскольку данная концентрация спирта этилового позволяет максимально экстрагировать имеющуюся в растении сумму флавоноидов и обладает лучшей проникающей способностью в глубокие слои эпидермиса по сравнению с более высокими концентрациями [7, 18, 19].

Анализируемые образцы сырья

Листья *Quercus robur* L. были заготовлены в период с мая по июль 2020 г. (Самарская обл., Похвистневский р-н, с. Первомайск, 2020 г.). Почки *Quercus robur* L. заготавливались в период с марта по апрель 2020 г. (Самарская обл., Похвистневский р-н, с. Первомайск, 2020 г.).

Видовая специфичность, анализируемых объектов подтверждалась при помощи определителей средней полосы России [3, 4]. Кроме определителей использовался метод сравнения с достоверно известными образцами гербарного фонда Самарского университета. Инвентарный номер основного гербарного образца SMR-1547 (Herbarium Department for Ecology, Botany and Nature Protection Faculty of Biology, Samara University, 2021)³.

Тестовые культуры

В качестве тестовых культур были использованы штаммы Американской коллекции типовых культур (American Type Cultures Collection – ATCC):

Staphylococcus aureus (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), а также *Candida albicans* (клинический штамм).

Методы исследования

Определение МИК проводили методом двойных серийных разведений в бульоне (пробирочный, макрометод) в соответствии с методиками, описанными в МУК 4.2.1890-04 [27, 29]. Метод двойных серийных разведений по сравнению с диффузионными методами позволяет качественно оценить наличие антимикробного эффекта путем визуальной оценки в сравнении со стандартом и определения минимальной ингибирующей концентрации изучаемого образца, которая обеспечивает замедление роста исследуемых штаммов микроорганизмов [27, 29]. В качестве питательной среды использовался питательный бульон Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США) [29].

Методика

Тестирование исследуемых образцов проводилось в объеме 1 мл каждого разведения образца водно-спиртового извлечения.

Приготовление рабочего раствора

Для определения чувствительности питательный бульон разливался по 0,5 мл в каждую пробирку. Помимо количества пробирок, необходимых для разведения образца, одна пробирка использовалась для постановки «отрицательного» контроля. Рабочий раствор тестируемого образца готовили из основного раствора с использованием жидкой питательной среды (питательный бульон Мюллера-Хинтона). Концентрация рабочего раствора рассчитывали исходя из необходимой максимальной концентрации в ряду серийных разведений, с учетом фактора разбавления препарата при последующей инокуляции [27].

Рабочий раствор в количестве 0,5 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносили в первую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона. Затем тщательно перемешивали и новым стерильным наконечником переносят 0,5 мл раствора тестируемого образца в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона. Процедуру повторяли до тех пор, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 0,5 мл бульона удаляли. Таким образом, получали ряд пробирок с растворами тестируемых образцов водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза. Одновременно готовили дополнительные ряды серийных разведений образцов для тестирования контрольных штаммов [27].

Приготовление инокулюма

Для инокуляции использовали стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 по стандарту

³ Herbarium Department for Ecology, Botany and Nature Protection Faculty of Biology, Samara University. SMR-1547. Available online: <http://sweetgum.nybg.org/science/vh/collection-index/collection-index-details/?irn=124749>

МакФарланда, разведенную в 100 раз на питательном бульоне, после чего концентрация микроорганизма в ней составит примерно 10^6 КОЕ/мл. По 0,5 мл инокуляма вносили в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения тестируемого образца, и в одну пробирку с 0,5 мл питательного бульона без образца («отрицательный» контроль). Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке достигала необходимой концентрации около 5×10^5 КОЕ/мл. Инокулом вносился в пробирки с разведениями образца не позднее 15–30 мин с момента его приготовления [27].

Пробирки закрывали стерильными ватно-марлевыми пробками и все пробирки с тестируемыми штаммами, кроме пробирки с «отрицательным» контролем, инкубировали при температуре 35°C в течение 20–24 ч. Пробирка с «отрицательным» контролем помещается в холодильник при 4°C, где хранится до учета результатов [27].

Оценка роста микроорганизмов

Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматриваются в проходящем свете. Рост культуры в присутствии тестируемого образца проводился при сравнении с пробиркой «отрицательного» контроля, содержащей исходный инокулом и хранившейся в холодильнике. МИК определялось по наименьшей концентрации тестируемого образца, которая подавляет видимый рост микроорганизма [27].

Оценка результатов эксперимента

Оценка результатов проводилась визуально по наличию/отсутствию роста микроорганизмов в пробирках с соответствующими разведениями исследуемых образцов [27]. Минимальной ингибирующей концентрацией являлась самая низкая концентрация изучаемого образца, которая полностью подавляла рост штамма микроорганизмов. При этом, согласно требованиям Методических указаний (МУК 4.2.1890-04)⁴ по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, а также рекомендациям Стандарта производительности для тестов на чувствительность к антимикробным препаратам (CLSI)⁵, наличие мутности, и обнаружение незначительного количества микроорганизмов (одна колония) не учитывались при регистрации результата эксперимента. Количество повторений каждого эксперимента было равным трем [27, 29].

⁴ Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические рекомендации. МУК 4.2.1890-04. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2004;6(4):306-359. Методические указания утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г. Онищенко, 4 марта 2004 г.

⁵ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе проведения скрининга антимикробной активности извлечений листьев и почек дуба черешчатого были получены следующие результаты.

При тестировании 40% водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого наблюдалась антимикробная активность в отношении штамма *P. aeruginosa* при четырехкратном разведении, а также в отношении микроорганизмов *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при восьмикратном разведении (табл. 1). При сравнении 40% водно-спиртового извлечения с «отрицательным» стандартом (минимальной подавляющей концентрацией для 40% водного спирта) отличий антимикробной активности между исследуемым образцом и образцом сравнения не наблюдалось (табл. 2). Что говорит об отсутствии вклада имеющегося в экстракте комплекса биологически активных соединений в фармакологический эффект при данной концентрации извлечения.

Для 70% водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого антимикробная активность была выраженной в отношении *P. aeruginosa* в восьмикратном разведении; в отношении *S. aureus* при разведении в 32 раза; для штамма *C. albicans* – при восьмикратном разведении. Подавление роста штамма *E. coli* наблюдалось при двукратном разведении (табл. 1).

Антимикробная активность 80% водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого была выраженной в отношении *E. coli* при разведении в 64 раза; в отношении *S. aureus*, *C. albicans* и *P. aeruginosa* при разведении в 16 раз (табл. 1). Для водно-спиртового извлечения листьев на 80% спирте наблюдается максимальная задержка роста микроорганизмов. При сравнении с «отрицательным» стандартом спирта этилового в концентрации 80% наблюдается значительное подавление роста микроорганизмов (табл. 1; табл. 2).

Антимикробная активность 96% водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого была выраженной в отношении всех штаммов при восьмикратном разведении; в отношении *S. aureus*, *C. albicans* и *E. coli* при разведении в 16 раз; в отношении *E. coli* наблюдалась наибольшая активность при 32 разовом разведении (табл. 1). Показатели «отрицательного» контроля для 96% концентрации спирта этилового были значительно меньше по сравнению с исследуемым образцом (табл. 2).

Анализ 40% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого дает меньший антимикробный эффект в сравнении с 40% водно-спиртовым извлечением листьев дуба черешчатого (табл. 1; табл. 2). В частности, извлечение почек в данной концентрации спирта этилового является выраженной в отношении штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при восьмикратном разведении; наряду с прочими штаммами при 32-кратном разведении наблюдалась более выраженная активность в отношении штамма *C. albicans* (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты тестирования извлечений
листьев и почек дуба черешчатого (*Q. robur* L.)

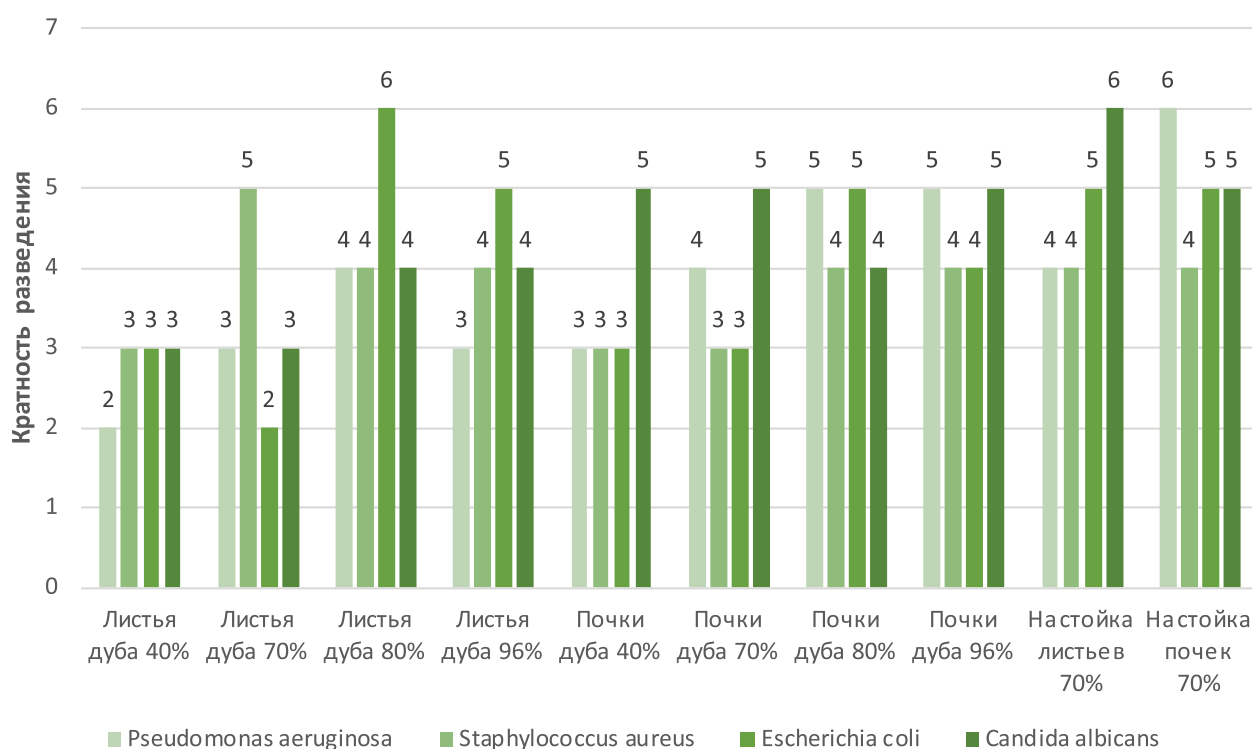
Объект/ Микроорганизм	Кратность разведения*						
	1	2	3	4	5	6	7
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Листья дуба 40%	–	–	+	+	+	+	+
Листья дуба 70%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Листья дуба 96%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 70%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 80%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 96%	–	–	–	–	–	+	+
Настойка листьев 70%	–	–	–	–	+	+	+
Настойка почек 70%	–	–	–	–	–	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>							
Листья дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 70%	–	–	–	–	–	+	+
Листья дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Листья дуба 96%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 70%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 96%	–	–	–	–	+	+	+
Настойка листьев 70%	–	–	–	–	+	+	+
Настойка почек 70%	–	–	–	–	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>							
Листья дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 70%	–	–	+	+	+	+	+
Листья дуба 80%	–	–	–	–	–	–	+
Листья дуба 96%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 70%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 80%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 96%	–	–	–	–	+	+	+
Настойка листьев 70%	–	–	–	–	–	+	+
Настойка почек 70%	–	–	–	–	–	+	+
<i>Candida albicans</i>							
Листья дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 70%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Листья дуба 96%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 40%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 70%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 96%	–	–	–	–	–	+	+
Настойка листьев 70%	–	–	–	–	–	–	+
Настойка почек 70%	–	–	–	–	–	+	+

Примечание: + наличие роста микроорганизма; – отсутствие роста микроорганизма

Таблица 2 – Минимальные подавляющие концентрации спирта этилового («отрицательный» контроль)

Объект/ Микроорганизм	Кратность разведения*						
	1	2	3	4	5	6	7
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Этиловый спирт 40%	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 70%	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 80%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 96%	–	–	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>							
Этиловый спирт 40%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 70%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 80%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 96%	–	–	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>							
Этиловый спирт 40%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 70%	–	–	–	–	+	+	+
Этиловый спирт 80%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 96%	–	–	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>							
Этиловый спирт 40%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 70%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 80%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 96%	–	–	–	+	+	+	+

Примечание: + наличие роста микроорганизма; – отсутствие роста микроорганизма.

Рисунок 1 – Сравнительная диаграмма антибактериальной активности спиртовых извлечений листьев и почек *Q. robur* L. (по оси абсцисс – порядковый номер разведения)

В ходе тестирования 70% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого отмечалась выраженная антимикробная активность в отношении штаммов микроорганизмов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при восьмикратном разведении. В отношении штаммов *P. aeruginosa* антимикробная активность наблюдалась при 16-кратном разведении. Максимально выраженный антимикробный эффект был зафиксирован в отношении штамма *C. albicans* при 32 кратном разведении (табл. 1).

Антимикробная активность 80% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого отмечалась в отношении штамма *E. coli* при разведении в 32 раза, а также в отношении штамма *S. aureus*, *C. albicans* и *P. aeruginosa* при разведении в 16 и 32 раз соответственно (табл. 1). При сравнении с «отрицательным» стандартом спирта этилового в концентрации 80% наблюдается значительное подавление роста микроорганизмов (табл. 1; табл. 2).

Исследование антимикробной активности 96% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого дало следующие результаты: заметно выраженная антимикробная активность в отношении всех штаммов при 16 кратном разведении; в отношении *P. aeruginosa* и *C. albicans* также наблюдалась активность при 32 кратном разведении (табл. 1).

В процессе проведения скринингового анализа водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого были определены условия получения лекарственной формы настойки. В качестве экстрагента для изготовления настойки на листьях дуба черешчатого и настойки на почках дуба черешчатого был выбран 70% спирт этиловый, поскольку данная концентрация является оптимальными экстрагентом для сырья, содержащего комплекс биологически активных веществ группы флавоноидов, обеспечивающих антимикробный эффект препарата⁶ [15, 20].

Тестируемый препарат настойка листьев дуба черешчатого на 70% спирте этиловом показал следующие результаты. Антимикробный эффект наблюдался в отношении всех указанных штаммов. В частности, при шестнадцатикратном разведении наблюдается антимикробная активность в отношении штамма *P. aeruginosa* и штамма *S. aureus*; при разведении в 32 раза – в отношении *E. coli* и при разведении в 64 раза – в отношении *C. albicans* (табл. 1).

В ходе тестирования препарата настойки почек дуба черешчатого на 70% спирте этиловом получены следующие результаты: антимикробный эффект наблюдался штамма *P. aeruginosa* при разведении в 64 раза; при шестнадцатикратном разведении наблюдается антимикробная активность в отношении штамма *S. aureus*; при разведении в 32 раза – в отношении *E. coli* и *C. albicans* (табл. 1).

Таким образом, проведено скрининговое исследование по изучению антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и листьев и почек дуба черешчатого, в результате чего в условиях *in vitro* обнаружено антимикробное действие на ряд патогенных штаммов микроорганизмов: *P. aeruginosa*; *S. aureus*; *E. coli*; *C. albicans*.

По результатам выполненной работы было установлено, что все изучаемые образцы водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого дают стабильный антимикробный эффект в отношении штаммов *S. aureus* и *C. albicans*.

Водно-спиртовое 80% извлечение из листьев и почек дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) и препараты настойки листьев и почек дуба черешчатого на 70% спирте этиловом в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5) являются наиболее эффективными объектами и дают максимальную задержку роста микроорганизмов при разведении в 32 и 64 раза.

Узконаправленное действие с максимальным антимикробным эффектом на *C. albicans* оказывает препарат настойка листьев дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5); на штаммы *S. aureus* – 70% водно-спиртовое извлечение в соотношении в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) (рис. 1). Водно-спиртовые извлечения почек дуба оказывают сходный стабильный максимальный антимикробный эффект в отношении *C. albicans*; для штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli* отмечается максимальный антимикробный эффект при концентрации экстрагента – 96% спирта этилового. Минимальная антимикробная активность отмечается для 70% водно-спиртового извлечения из листьев дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) на штаммы *E. coli*, а также для 40% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) на штаммы *P. aeruginosa* (рис. 1).

Выбор в пользу 70% концентрации спирта как экстрагента для получения настойки листьев и почек дуба сделан исходя из того, что для лекарственных форм при данных параметрах экстракции отмечается наибольший антимикробный эффект в отношении изучаемых штаммов микроорганизмов (рис. 1). Также, извлечения при данной концентрации спирта обладают лучшей проникающей способностью в глубокие слои эпидермиса по сравнению с более высокими и с более низкими концентрациями спирта⁷. Следует отметить, что листья имеют большую фито-массу в сравнении с почками, их сбор может осуществляться в больший временной промежуток, чем для почек, время сбора которых, как правило, выпадает на зимне-весенний период [7].

⁶ Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_6283.htm

⁷ Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_6283.htm

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все полученные в ходе исследования результаты могут служить основанием для создания новых антибактериальных препаратов на основе листьев и

почек дуба черешчатого, а также для внедрения препаратов настойки листьев и почек дуба черешчатого на 70% спирте в медицинскую и фармацевтическую практику.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают особую благодарность Корчикову Евгению Сергеевичу, доценту кафедры экологии, ботаники и охраны природы Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева за содействие в написании статьи и предоставление гербарных образцов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.А. Рябов – сбор данных, проведение эксперимента, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка черновика рукописи, анализ литературы, написание рукописи и окончательное утверждение ее для публикации; В.М. Рыжов – планирование исследования, участие в разработке концепции и дизайна исследования, сбор растительного материала для анализа; В.А. Куркин – окончательное утверждение для публикации рукописи, обработка полученных результатов, проверка критически важного интеллектуального содержания; С.Д. Колпакова – участие в проведении исследования, анализ литературы; А.В. Жестков – участие в описании и анализе полученных результатов, участие в написании рукописи и окончательном утверждении ее для публикации; А.В. Лямин – участие в написании рукописи, критический анализ исследования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Dasgupta A., Krasowski M.D. Chapter 10 – Therapeutic drug monitoring of antimicrobial, antifungal and antiviral agents, Therapeutic Drug Monitoring Data (Fourth Edition), Academic Press. – 2020. – P. 159–197. DOI: 10.1016/B978-0-12-815849-4.00010-4.
2. Andrade H.B., Shinotsuka C.R., da Silva I.R.F., Donini C.S., Yeh Li H., de Carvalho F.B., Americano do Brasil P.E.A., Bozza F.A., Miguel Japiassu A. Highly active antiretroviral therapy for critically ill HIV patients: A systematic review and meta-analysis // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, No.10. – e0186968. DOI: 10.1371/journal.pone.0186968.
3. Grozdova N.B., Nekrasov V.I., Globa-Mikhailenko D.A. Trees, shrubs and vines. M.: Lesn. industry, 1986. – P. 176–178.
4. Maevsky P.F. Flora of the middle zone of the European part of Russia. 11th ed. M.: Partnership of scientific publications KMK, 2014. P. 200–201.
5. British Pharmacopoeia 2009. British Pharmacopoeia Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations. Oak Bark. 2009; Vol. III. 7203 p.
6. European Pharmacopoeia – 8th Edition. «01/2008:1887 corrected 6.0». 2013. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://pharmeuropa.edqm.eu>
7. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>
8. Fatehi S., Mohammadi Sichani M., Tavakoli M. Evaluation of antimicrobial and Anti-quorum sensing activity of mazouj and ghalghaf galls extracts of oak against *Pseudomonas aeruginosa* // Qom Univ Med Sci J. – 2018. – Vol. 12, No.10. – P. 36–45. DOI: 10.29252/qums.12.10.36.
9. Pailhoriès H., Munir M.T., Aviat F., Federighi M., Belloncle C., Eveillard M. Oak in Hospitals, the Worst Enemy of *Staphylococcus aureus*? // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2017. – Vol. 38, No.3. – P. 382–384. DOI: 10.1017/ice.2016.304.
10. Smailagić A., Ristivojević P., Dimkić I., Pavlović T., Dabić Zagorac D., Veljović S., Fotirić Akšić M., Meland M., Natić M. Radical Scavenging and Antimicrobial Properties of Polyphenol Rich Waste Wood Extracts // Foods. – 2020. – Vol. 9, No.3. – P. 319. DOI: 10.3390/foods9030319.
11. Sarwar R, Farooq U, Naz S, Riaz N, Majid Bukhari S, Rauf A, Mabkhot Ya.N., Al-Showiman S.S. Isolation and Characterization of Two New Antimicrobial Acids from *Quercus incana* (Bluejack Oak) // Biomed Res Int. – 2018. – Vol. 2018. – 3798105. DOI: 10.1155/2018/3798105.
12. Smailagić A., Zagorac D.D., Veljović S., Sredojević M., Relić D., Fotirić M. A., Roglić G., Natić M. Release of wood extractable elements in experimental spirit model: Health risk assessment of the wood species generated in Balkan cooperation // Food Chemistry. – 2021. – Vol. 338. – 127804. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127804.
13. Elansary O. H., Szopa A., Kubica P., Ekiert H., Mattar A. M., Al-Yafrasi M.A., El-Ansary D.O., Zin El-Abidin T.K., Yessoufou K. Polyphenol Profile and Pharmaceutical Potential of *Quercus* spp // Bark Extracts. Plants. – 2019. – Vol. 8, No.11. – 486. DOI: 10.3390/plants8110486
14. Rao N. In vitro phytochemical screening, antioxidant & antimicrobial activity of the methanolic extract of *Quercus infectoria* L. – 2013. – Vol. 5. – P. 273–277.
15. Drózdź P., Pyrzyńska K. Assessment of polyphenol content and antioxidant activity of oak bark extracts // European Journal of Wood and Wood Products. – 2017. – Vol. 76. – P. 793–795. DOI: 10.1007/s00107-017-1280-x.
16. Sánchez-Burgosa J.A., Ramírez-Maresb M.V., Larrosac M.M., Gallegos-Infantea J.A., González-Laredoa R.F.,

- Medina-Torres L., Rocha-Guzmána N.E. Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Industrial Crops and Products*. – 2013. – Vol. 42. – P. 57–62. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.05.017
17. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 2: Actinidiaceae-Malvaceae, Euphorbiaceae-Haloragaceae. / А.Л. Буданцев. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – 774 с.
 18. Grotewold E. The Science of Flavonoids. 8th ed. New York: Springer. 2006. 274 p. DOI: 10.1007/978-0-387-28822-2.
 19. Bedi M.K., Shenefelt P.D. Herbal Therapy in Dermatology // *Archives of Dermatology*. – 2002. – Vol. 138, No.2. – P. 237–238. DOI: 10.1001/archderm.138.2.232.
 20. Cushnie T.P., Lamb A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2011. – Vol. 38. – P. 99–107. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014.
 21. Scalbert A., Haslam E. Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Quercus robur* // *Phytochemistry*. – 1987. – Vol. 26. – P. 3191–3195. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)82468-1.
 22. Benyagoub E., Nabbou N., Dine A. Antimicrobial Effect of *Quercus robur* L. Leaves Selective Extracts from the Mezi Mountain of Djenane Bourezg (West of Algeria) // *Current Bioactive Compounds*. – 2020. – Vol.16, No.8. – P. 1181–1190. DOI: 10.2174/1573407216666191226141609.
 23. Benyagoub E., Nabbou N., Boukhalkhel S., Dehini I. The In vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Quercus robur* L. Methanolic and Aqueous Leaves' Extracts, from the Algerian High Plateaus Against some Uropathogenic Microbial Strains // *Phytopathology*. – 2019. – Vol. 12. DOI: 10.29252/qums.12.10.36.
 24. Sánchez-Burgosa J.A., Ramírez-Maresb M.V., Larrosac M.M., Gallegos-Infantea J.A., González-Laredoa R.F., Medina-Torres L., Rocha-Guzmána N.E. Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Industrial Crops and Products*. – 2013. – Vol. 42. – P. 57–62. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.05.017
 25. Nassima B, Behidj-Benyounes N, Ksouri R. Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic compounds extracted from *Populus nigra* and *Populus alba* buds (Algeria) // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2019. – Vol. 55. – e18114. DOI: 10.1590/s2175-97902019000218114
 26. Isidorov V.A., Bagan R., Szczepaniak L., Swiecicka I. Chemical profile and antimicrobial activity of extractable compounds of *Betula litwinowii* (Betulaceae) buds // *Open Chemistry*. – 2015. – Vol. 13, No.1. – P. 123–127. DOI: 10.1515/chem-2015-0019
 27. The definition of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Guidelines. MUK 4.2.1890-04. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2004. – Vol. 6, No.4. – P. 306–359.
 28. Козлова И.В., Лекарева Л.И., Быкова А.П. Кандидоз желудочно-кишечного тракта // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2016. – Т. 3. – С. 40–46.
 29. Golus J., Sawicki R., Widelski J., Ginalska G. The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts // *J Appl Microbiol*. – 2016. – Vol. 121. – P. 1291–1299. DOI: 10.1111/jam.13253

АВТОРЫ

Рябов Николай Анатольевич – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1332-953X. E-mail: ryabov.nikolay.2014@mail.ru

Рыжов Виталий Михайлович – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8399-9328. E-mail: lavr_rvm@mail.ru

Куркин Владимир Александрович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7513-9352. E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru

Колпакова Светлана Дмитриевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9358-4436. E-mail: Sdkolpakova@mail.ru

Жестков Александр Викторович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-3960-830X. E-mail: avzhestkov2015@yandex.ru

Лямин Артем Викторович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5905-1895. E-mail: avlyamin@rambler.ru

УДК615.013: 543.42:543.57



ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ 1-[2-(2-БЕНЗОИЛФЕНОКСИ) ЭТИЛ]-6-МЕТИЛУРАЦИЛА

Е.А. Джайн (Корсакова)¹, Д.В. Демченко², А.А. Озеров³, М.Н. Макарова²,
В.Г. Макаров², В.Ю. Балабаньян¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

119991, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т, дом 27, корп. 1

² Закрытое акционерное общество «Санкт-Петербургский институт фармации»

188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район,

г.п. Кузьмолковский, ул. Заводская, дом 3, корп. 245

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

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

E-mail: ekaterina.korsa@gmail.com

Получено 30.01.2021

Принята к печати 10.04.2021

Цель – идентификация 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила с использованием различных методов анализа, а также исследование его механизма действия в отношении дикого типа и мутантных форм обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1.

Материалы и методы. Для характеристики структуры исследуемого вещества использовали рентгеноструктурный анализ, элементный анализ, термический анализ, а также УФ-, ИК- и ЯМР- спектроскопии. Изучение механизма действия соединения, как потенциального лекарственного средства, проводили путем оценки ингибирующей активности в отношении ОТ ВИЧ-1 дикого типа и ее мутантных форм, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса.

Результаты. Проведены исследования, подтверждающие структуру 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. УФ-спектр имеет выраженный максимум поглощения при измерении раствора субстанции в тетрагидрофуране в концентрации 0,10 мг/мл, в ИК спектре наблюдаются специфические полосы в области 4000–370 см⁻¹, что позволяет использовать УФ и ИК спектры для идентификации исследуемого вещества в субстанции. Также было установлено, что количество и взаимное расположение функциональных групп, интегральная интенсивность сигналов в спектре ¹H-ЯМР, а также строение углеродного скелета, соответствуют структуре 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Результаты изучения механизма действия показали, что исследуемое соединение является эффективным ингибитором ОТ ВИЧ-1 дикого типа с константой ингибирования 0,2 мМ, а также ингибитором фермента (мутация G190A) с константой ингибирования 8 мМ; фермента (мутация Y181C) с константой ингибирования 10 мМ, а также ингибитором ОТ (мутация L100I, K103N, V106A) и двойном мутанте K103N/Y181C с константой ингибирования более 20 мМ.

Заключение. В результате проведенных рентгеноструктурного, элементного, ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР анализов была подтверждена структура 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Показана возможность применения УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии, а также термических анализов для подтверждения подлинности при входном контроле качества 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Разработанные методы могут быть использованы в контроле качества и включены в проект НД на исследуемую субстанцию. Исследования механизма действия соединения в отношении ОТ ВИЧ-1 показали, что данное соединение относится к группе ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ-1.

Ключевые слова: 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил; идентификация; рентгеноструктурный анализ; термический анализ, элементный анализ; УФ-спектроскопия; ИК-спектроскопия; ЯМР-спектроскопия; механизм действия; обратная транскриптаза ВИЧ-1

Сокращения: ТГА – термогравиметрический анализ; ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия; ЯМР-спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ОТ – обратная транскриптаза; ННИОТ – ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы

Для цитирования: Е.А. Джайн (Корсакова), Д.В. Демченко, А.А. Озеров, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, В.Ю. Балабаньян. Характеризация и исследование механизма действия 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):114-129. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-114-129

© Е.А. Джайн (Корсакова), Д.В. Демченко, А.А. Озеров, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, В.Ю. Балабаньян, 2021

For citation: E.A. Jain (Korsakova), D.V. Demchenko, A.A. Ozerov, M.N. Makarova, V.G. Makarov, V.Yu. Balabanyan. Characterisation and study of 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil mechanism of action. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(2):114-129. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-114-129

CHARACTERISATION AND STUDY OF 1-[2-(2-BENZOYLPHENOXY) ETHYL] -6-METHYLURACIL MECHANISM OF ACTION

E.A. Jain (Korsakova)¹, D.V. Demchenko², A.A. Ozerov³, M.N. Makarova²,
V.G. Makarov², V.Yu. Balabanyan¹

¹ Moscow State University named after M.V. Lomonosov

Bldg. 1, 27, Lomonosov Ave., Moscow, Russia, 119991

² Closed joint-stock company "Saint Petersburg Institute of Pharmacy",

Bldg. 245, 3, Zavodskaya St., Vil. Kuzmolovsky, Vsevolozhsky district, Leningrad region, Russia, 188663

³ Volgograd State Medical University,

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: ekaterina.korsa@gmail.com

Received 30 Jan 2021

Accepted 10 Apr 2021

The aim of the study is to identify 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil using various methods of analysis, as well as to study its action mechanism against wild-type and mutant forms of HIV-1 reverse transcriptase (RT).

Materials and methods. To characterize the structure of the test substance, a few kinds of analysis (X-ray diffraction, elemental, thermal) as well as a few kinds of spectroscopy (UV, IR, and NMR) have been used. The study of the action mechanism of the compound as a potential drug was carried out by evaluating the inhibitory activity against HIV-1 RT wild-type and its mutant forms corresponding to drug-resistant viral strains.

Results. The studies have been carried out to confirm the structure of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. The UV spectrum has a pronounced absorption maximum when measuring a solution of the substance in tetrahydrofuran at the concentration of 0.10 mg/ml. In the IR spectrum, there are specific bands in the range of 4000-370 cm⁻¹. These factors make it possible to use UV and IR spectra to identify the test compound in the substance. It has also been established that the number and mutual arrangement of functional groups, the integrated intensity of signals in the ¹H-NMR spectrum, as well as the structure of the carbon skeleton, correspond to the structure of 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil. The results of studying the action mechanism showed that the test compound is an effective inhibitor of wild-type HIV-1 RT with an inhibition constant of 0.2 μM, as well as an enzyme inhibitor (mutation G190A) with an inhibition constant of 8 μM; enzyme (mutation Y181C) with an inhibition constant of 10 μM, as well as a reverse transcriptase (RT) inhibitor (mutation L100I, K103N, V106A) and a double mutant K103N / Y181C with an inhibition constant of more than 20 μM.

Conclusion. As a result of the performed X-ray structural, elemental, ¹H-NMR and ¹³C-NMR analyzes, the structure of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil has been confirmed. The possibility of using UV, IR and NMR spectroscopy, as well as thermal analyzes to confirm the authenticity during the verification of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, has been shown. The developed methods can be used in the quality control and included in the draft of practice guidelines for the investigated substance. The studies of the action mechanism of the compound of HIV-1 RT reverse transcriptase have shown that this compound belongs to the group of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) of HIV-1.

Keywords: 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil; identification; X-ray structural analysis; thermal analysis, elemental analysis; UV spectroscopy; IR spectroscopy; NMR spectroscopy; action mechanism; HIV-1 reverse transcriptase

Abbreviations: TGA – thermal gravimetric analysis; DSC – differential scanning calorimetry; IR spectroscopy – infrared spectroscopy; NMR spectroscopy – nuclear magnetic resonance spectroscopy; HIV – human immunodeficiency virus; RT – reverse transcriptase; NNRTIs – non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия ВИЧ-инфекции является самой актуальной и до сих пор не решенной проблемой мирового здравоохранения. Несмотря на то, что по данным Роспотребнадзора удалось снизить темпы прироста новых случаев ВИЧ-инфекции с 13,4% в 2012 году до 0,9% в 2017 году, эпидемиологическая ситуация остается тяжелой.¹ Так, в 2019 г. в Российской Федерации было выявлено, по предварительным данным,

94 668 новых случаев ВИЧ-инфицирования², а число лиц, живущих с ВИЧ, в мире достигало приблизительно 38,0 миллионов³.

ВИЧ-инфекция продолжает оставаться неизлечимым заболеванием. Опасность его объясняется уникальным воздействием вируса на организм чело-

¹ Противодействие ВИЧ и другим социально опасным заболеваниям: некоторые показатели за 6 лет, Правительство Российской Федерации, 11.04.2018 г. URL: <http://government.ru/info/32200/>

² Справка ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2019 г. (подготовлена в Федеральном научно-методическом центре по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/02/VICH-infektsiya-v-Rossiiskoj-Federatsii-na-31.12.2019.pdf>.

³ Информационный Бюллетень ВОЗ ВИЧ/СПИД, URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>

века: репродукция вируса в клетках иммунной системы не только делает вирус малоуязвимым для действия последней, но и способствует развитию других инфекционных заболеваний [1]. Как следствие, у ВИЧ-инфицированных часто развиваются бактериальные и вирусные заболевания, вызываемые оппортунистическими инфекциями – пневмонии, герпесвирусные, а также онкологические заболевания, поражения сердечно-сосудистой, желудочно-кишечной и нервной систем. Именно эти явления служат основной причиной смерти ВИЧ-инфицированных [2]. Современный подход к антиретровирусной терапии направлен на увеличение продолжительности и повышения качества жизни больных [3]. В настоящее время лучшим методом терапии ВИЧ-инфекции является высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ), которая подразумевает использование нескольких действующих веществ с разными механизмами действия одновременно: не менее одного препарата из группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) ВИЧ в сочетании с ненуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ и/или ингибиторами других классов [4]. Препараты ВААРТ неустанно улучшаются, а разработка новых фармакологических единиц набирает обороты по причине многообразия побочных эффектов и токсичности, а также развития резистентности штаммов к лекарственным средствам [5, 6].

ННИОТ – перспективная группа антиретровирусных препаратов, которые являются органическими соединениями различных классов со значительной долей ароматических гидрофобных радикалов [7]. Это неконкурентные ингибиторы фермента, взаимодействующие с аллостерическим центром обратной транскриптазы, влияющие на мобильность и гибкость центра полимеризации, что, в конечном итоге, приводит к снижению эффективности фермента [8-10]. Ингибирующее действие препаратов проявляется несколькими вариантами, например, связывание невирапина вызывает трансляцию положения гидрофобных остатков, и, как результат, третичная структура протеина обратной транскриптазы раздвигается [11]. Также оно проявляется за счет влияния на динамические процессы ОТ с нуклеиновой матрицей [12-14]. Существует два поколения препаратов ННИОТ. К первому классу относят невирапин, эфавиренц и делавердин, а ко второму – этравирин и рилпивириин [15, 16]. Однако, несмотря на медленное развитие резистентности к ННИОТ второго поколения, в практике уже встречаются мутантные штаммы ВИЧ, позволяющие вирусу противостоять действию этих препаратов [17].

В настоящее время подходы к разработке новых ННИОТ включают: повышение позиционной адаптивности и конформационной гибкости в кармане связывания лекарственного средства [18]; нацеливание на консервативные остатки в связывающем кармане [19, 20]; улучшение физико-химических свойств с по-

мощью пролекарств или введение солюбилизирующих групп [21].

В результате многолетних исследований, проведенных на кафедре фармацевтической и токсикологической химии, а также в НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в сотрудничестве с учеными Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта ФАНО, вирусологами США и Западной Европы (фармацевтическая компания ImQuestBioSciencesInc., США; Rega Institute for Medical Research, Бельгия), был открыт новый класс высокоактивных ненуклеозидных ингибиторов вирусной репродукции [22, 23].

Среди прочих соединений 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил (рисунок 1) показал высокую способностью подавлять репродукцию ВИЧ-1 *in vitro*. Соединение также подавляло репродукцию мутантных штаммов ВИЧ-1 и имело профиль резистентности, близкий к таковому эфавиренца [24, 25].

Полученные результаты доклинических исследований позволяют рассматривать предлагаемое соединение в качестве перспективного лекарственного кандидата, предназначенного для лечения ВИЧ-1 инфекции.

По мере развития фармации предъявляются все более высокие требования к обеспечению качества и безопасности лекарственных средств. В связи с этим возникает необходимость использования в фармацевтическом анализе методов исследования, позволяющих достигать максимальной специфичности и достоверности результатов [26]. Таким образом, в проекты нормативной документации на фармацевтические субстанции все шире вводятся требования использования УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии и термического анализа.

ЦЕЛЬ. Идентификация 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила с использованием рентгеноструктурного, термических и элементного анализов, УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопий, а также исследование его механизма действия в отношении дикого типа и мутантных форм обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись образцы фармацевтической субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил, предоставленные ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Изучаемая субстанция представляет собой кристаллический порошок, практически нерастворимый в воде и органических растворителях.

Рентгенодифракционное исследование

Рентгенодифракционное исследование соединения проводили на дифрактометре Bruker APEX II (Bruker, Германия). Структуры были расшифрованы прямым методом и уточнены методом наименьших квадратов (МНК) в анизотропном полноматричном приближении по величине структурного фактора

(F^2_{hkl}). Атомы водорода были рассчитаны геометрически и уточнены с наложением ограничений на длины связей C-H и их изотропные параметры смещений. Все расчеты проводили с использованием программ ShelXL, SHELXT и Olex-2^{4,5,6}.

Рентгенофазовое исследование

Для идентификации возможных полиморфов было проведено рентгенофазовое исследование. Исследования состава образца 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил методом порошковой рентгеновской дифракции выполняли на дифрактометре Bruker D8 Advance (Bruker, Германия), оборудованном никелевым β -фильтром и системой управляемых щелей для монохроматизации ($I[\text{CuK}\alpha] = 1.5418 \text{ \AA}$), и позиционно-чувствительным детектором LynxEye, в угловом диапазоне 4-60° с шагом 0,02° по углу. Определенное количество субстанции было размолото в ступке и нанесено на кремневую пластину в виде взвеси в гептане, и затем полученный образец был высушен. После получения дифракционных данных по результатам монокристалльного исследования была рассчитана теоретическая дифрактограмма и проведено ее сравнение с экспериментом. Зависимость фона от угла 2θ моделировалась с помощью серии полиномов Чебышева до пятого порядка. Для учета особенностей прибора использовали метод фундаментальных параметров, определенных заранее по образцу бориды лантана LaB_6 . Все расчеты проводили с помощью программы TOPAS⁷.

Термогравиметрический анализ и дифференциальная сканирующая калориметрия

Для определения термических свойств субстанции были применены методы термического анализа: термогравиметрический анализ (ТГА) и дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). ТГА исследуемого соединения проводили на приборе Derivatograph-C (MOM, Венгрия) при скорости нагревания 10°C/мин. Полученные данные графически фиксировали в виде кривых: термогравиметрических (ТГ), дифференциальных термогравиметрических (ДТГ) и дифференциально термических (ДТА). Кривая ТГ на дериватограмме показывает изменение массы образца в период исследования, а кривая ДТГ показывает скорость разложения и полезна для точной оценки

шагов разложения. ДТА отражает дифференцирование тепловых эффектов, содержит информацию об эндо- и экзотермических максимумах и используется для качественной оценки дериватограммы. Обработку экспериментальных данных ТГА выполняли с помощью программы Winder C. Исследования методом ДСК проводили на приборе DSC-822e (Меттлер-Толедо, Швейцария) в диапазоне температур от -145 до +260°C, при скорости нагревания 10°C/мин. Все расчеты проводили с помощью программы STAR^e.

Элементный анализ

Элементный анализ проводили на автоматическом CHN-анализаторе VarioMicrocube (Elementar, Германия). В качестве стандартного образца использовали ацетанилид (71,098% C; 6,71% H, 10,36% N). Газ-носитель – гелий, окислитель – кислород марки ОСЧ. Окислительную колонку заполняли оксидом меди, восстановительную – проволочной медью. Сожжение навесок стандартного образца и субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила, предварительно отобранных в оловянные капсулы и взвешенных на ультрамикровесах фирмы XP6 (MettlerToledo, Швейцария) с точностью до 0,001 мг, проводили при температуре 950°C. Восстановление продуктов сжигания на проволочной меди проводили при 550°C. Газообразные продукты деструкции разделяли на хроматографической колонке и детектировали в катарометре. Обсчет результатов определения проводился автоматически по программе, прилагаемой к прибору.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях

Регистрацию спектров в УФ-видимом диапазоне проводили на спектрометре Cary 4000 (Varian, США) путем измерения поглощения излучения в кювете с раствором субстанции в концентрации 0,1 мг/мл. Образец растворяли в мерной колбе в тетрагидрофуране (ТГФ, квалификации для спектроскопии, «Компонент-реактив»), а также в диметилсульфоксиде (ДМСО, квалификации для УФ-ИК-ВЭЖХ-ГПХ, Panreac). Измерения полученных растворов проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1,00 мм (Hellma). Данные обрабатывали в программном обеспечении спектрометра WinUV (Varian).

Спектрометрия в инфракрасной области

Экспериментальную работу проводили на ИК-Фурье спектрометре Vertex 70 (BrukerOptikGmbH, Германия). Образцы для записи спектров готовили методом прямого прессования с оптически чистым калия бромидом, измеряли спектры в режиме пошагового сканирования в диапазоне 4000–370 см⁻¹. Для регистрации спектра поглощения в ближней ИК-области применяли приставку диффузного отражения (Shimadzu, Япония). Все данные обрабатывали в управляющем программном обеспечении спектрометра OPUS (Bruker, Германия).

⁴ Dolomanov O.V., Bourhis L.J., Gildea R.J., Howard J.A.K., Puschmann H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program // J. Appl. Cryst. – 2009. – V. 42. – P. 339–341. DOI: 10.1107/S002188980804272

⁵ Sheldrick G.M. SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination. Acta Cryst. 2015. – V. A71. – P. 3–8. DOI: 10.1107/S2053273314026370

⁶ Sheldrick G.M. Crystal structure refinement with SHELXL // Acta Cryst. – 2015. – V. C71. – P. 3–8. DOI: 10.1107/S2053229614024218.

⁷ Bruker AXS: TOPAS V4: General profile and structure analysis software for powder diffraction data. – User's Manual, Bruker AXS, Karlsruhe, Germany, 2009. – 72 p.

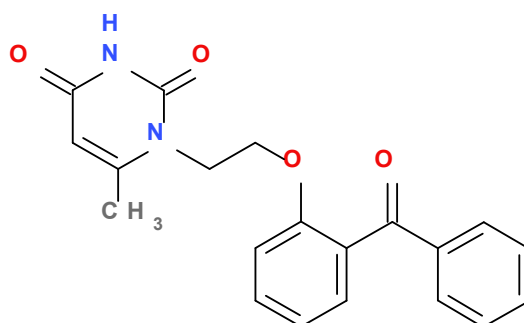


Рисунок 1 – Структурная формула 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

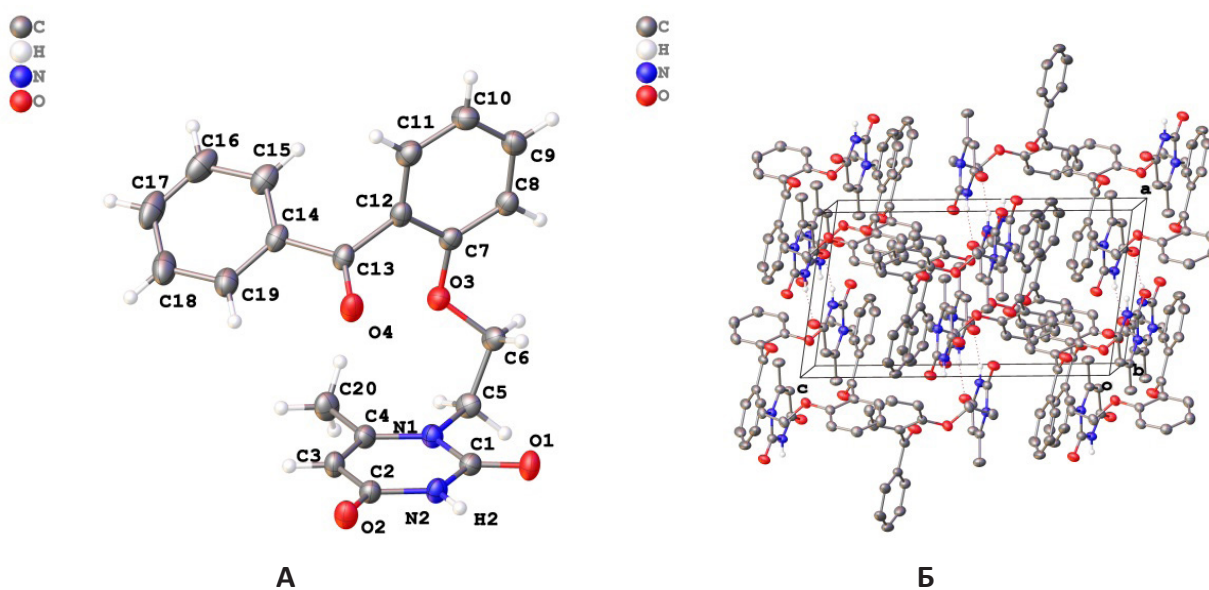


Рисунок 2 – Визуализация молекулы 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Примечание: (А) – Общий вид молекулы и (Б) – кристаллическая упаковка

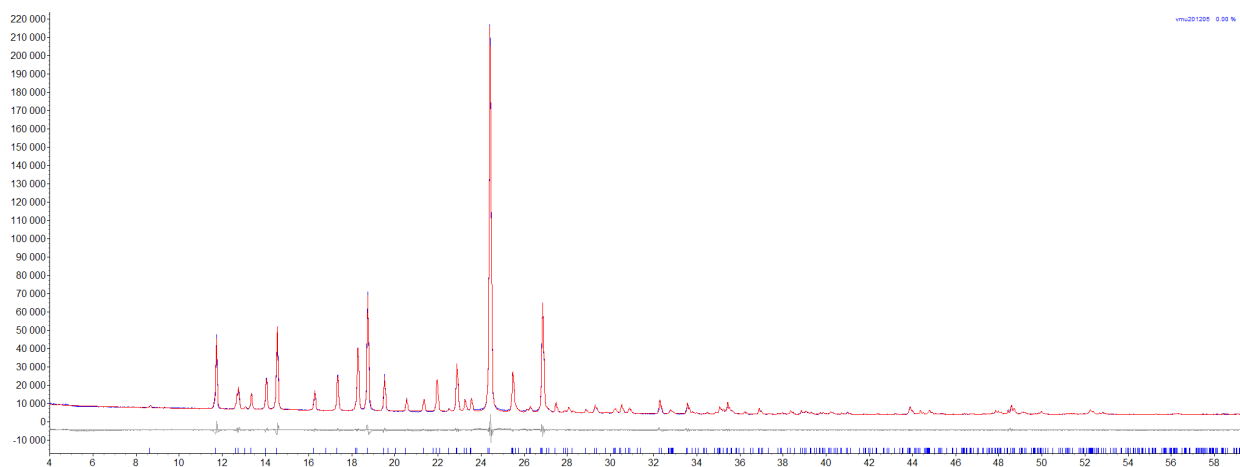
Рисунок 3 – Общий вид дифрактограммы 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила
(синяя линия – эксперимент, красная – расчет, серая – разностная кривая)

Таблица 1 – Основные кристаллографические данные и параметры уточнения структуры 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Брутто формула	$C_{20}H_{18}N_2O_4$
Молекулярная масса	350,36
Температура, К	120
Пространственная группа, Z	$P2_1/n$, 4
Параметры ячейки:	4
a, Å	8,1352(7)
b, Å	13,7868(11)
c, Å	15,0957(12)
α , °	90
β , °	98,443(2)
γ , °	90
Объем ячейки, V, Å ³	1674,8(2)
Плотность, $d_{\text{выч}}$, г·см ⁻³	1,390
Коэффициент поглощения, μ , см ⁻¹	0,98
Фактор структуры F(000)	736
Размер кристаллов, мм	0,25 × 0,17 × 0,14
Кристаллическая форма, цвет	Призмы, коричневый
$2\theta_{\text{max}}$, °	61,36
Число измеренных отражений	22276
Число независимых отражений	5160
Число отражений с $I > 2\sigma(I)$	3182
Количество уточняемых параметров [$I > 2\sigma(I)$]:	286
R_1	0,0511
wR_2	0,1258
GOF	1,000
Остаточная электронная плотность, $e \cdot \text{Å}^{-3}(r_{\text{min}}/r_{\text{max}})$	0,344/-0,212

Таблица 2 – Дифракционные максимумы образца 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Угол 2θ , °	Межплоскостное расстояние (d), Å	Относительная интенсивность	Угол 2θ , °	Межплоскостное расстояние (d), Å	Относительная интенсивность
4,706	18,7609	0,30%	35,156	2,55063	1,30%
8,676	10,18426	0,50%	35,439	2,53089	2,90%
11,735	7,53531	19,00%	36,223	2,47787	0,70%
12,765	6,92951	5,40%	36,892	2,43449	1,40%
13,074	6,76618	0,50%	37,367	2,4046	0,30%
13,358	6,62292	4,00%	37,799	2,37813	0,30%
14,048	6,29941	8,10%	37,967	2,368	0,50%
14,555	6,08082	21,20%	38,364	2,34439	1,00%
16,287	5,43779	5,20%	38,853	2,31603	1,00%
17,352	5,10653	9,30%	39,073	2,30348	0,90%
18,292	4,84624	16,30%	39,292	2,29113	0,50%
18,746	4,7297	30,70%	39,86	2,25981	0,40%
19,518	4,54444	9,50%	40,209	2,24098	0,70%
20,544	4,31971	3,60%	40,775	2,21116	0,20%
21,352	4,15813	3,10%	40,996	2,19974	0,60%
21,957	4,0448	8,10%	41,818	2,15838	0,10%
22,549	3,93992	0,50%	41,767	2,1609	0,10%
22,882	3,88337	12,00%	42,364	2,13184	0,30%
23,253	3,82218	3,00%	43,254	2,09001	0,10%
23,552	3,77445	3,10%	43,892	2,06109	1,90%
24,415	3,64283	100,00%	44,381	2,03952	1,00%
25,463	3,49533	10,20%	44,793	2,0217	1,10%
26,287	3,38752	1,30%	45,324	1,99923	0,20%
26,854	3,31735	27,00%	46,412	1,95488	0,30%

Угол 2q, °	Межплоскостное расстояние (d), Å	Относительная интенсивность	Угол 2q, °	Межплоскостное расстояние (d), Å	Относительная интенсивность
27,469	3,24438	2,30%	46,735	1,94213	0,10%
28,068	3,1765	1,30%	47,417	1,91577	0,10%
28,864	3,09073	1,00%	47,931	1,89643	0,40%
29,282	3,04751	2,10%	47,989	1,89426	0,80%
29,804	2,99533	0,20%	48,597	1,87199	2,10%
30,239	2,95321	1,20%	49,131	1,85285	0,50%
30,520	2,92669	2,40%	49,999	1,82271	0,70%
30,865	2,89478	1,50%	51,332	1,77848	0,30%
31,227	2,86196	0,10%	52,285	1,74826	0,90%
32,285	2,77059	3,60%	52,831	1,73149	0,50%
32,802	2,72812	1,10%	56,284	1,63318	0,30%
33,576	2,66693	2,60%	57,546	1,60032	0,10%
33,998	2,63483	0,40%	58,432	1,57815	0,10%
34,508	2,59705	0,50%	59,064	1,56277	0,20%
34,869	2,57093	0,40%			

Таблица 3 – Результаты элементного анализа 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Фармацевтическая субстанция	C, %(M±σ), n=2	H, %(M±σ), n=2	N, %(M±σ), n=2
1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	68,22±0,08	5,24±0,03	7,81±0,04
Теоретический расчет	68,60	5,11	8,00

Таблица 4 – Характеристические максимумы полос поглощения образца субстанции (в см⁻¹) в ближней и средней ИК области 8000–370 см⁻¹

Фармацевтическая субстанция	Максимумы поглощения, см ⁻¹
1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	4002,5; 3940,0; 3914,1; 3896,3; 3861,3; 3847,4; 3831,5; 3811,5; 3788,7; 3775,7; 3741,0; 3707,2; 3697,4; 3682,9; 3653,6; 3640,3; 3623,9; 3318,4; 3186,1; 3157,8; 3080,0; 3060,6; 3036,4; 3014,2; 2967,7; 2933,3; 2900,5; 2881,0; 2864,3; 2792,1; 2587,1; 2552,3; 2470,9; 2443,9; 2427,6; 2386,4; 2354,8; 2341,2; 2303,6; 2240,7; 2189,0; 2105,5; 2090,1; 2075,2; 2038,8; 2016,0; 1987,2; 1951,2; 1924,4; 1888,1; 1860,0; 1823,9; 1701,3; 1665,7; 1613,6; 1596,2; 1578,6; 1531,9; 1483,0; 1473,8; 1462,9; 1449,1; 1442,1; 1427,0; 1409,3; 1393,1; 1358,1; 1313,7; 1292,2; 1270,8; 1242,8; 1179,2; 1151,7; 1121,2; 1107,8; 1075,2; 1062,4; 1043,3; 1025,0; 996,0; 982,0; 971,9; 959,6; 944,6; 929,9; 894,2; 869,8; 852,2; 833,3; 807,7; 775,5; 766,4; 755,3; 731,4; 717,1; 704,2; 689,1; 634,1; 609,9; 567,6; 533,5; 509,0; 461,9; 435,9; 418,2; 376,7

Таблица 5 – Результаты анализа ЯМР ¹H, ¹³C спектров 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Фармацевтическая субстанция	Положение	Группа	Химический сдвиг, δ ¹ H, ppm	Химический сдвиг, δ ¹³ C, ppm
1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	1	Ar, α-CH	7,21 д	113,16 с
	2	Ar, β-CH	7,10 т	121,61 с
	3	Ar, β-CH	7,50 т	132,23 с
	4	Ar, α-CH	7,29 д	128,94 с
	5	Ar, ipso-C	–	155,71 с
	6	Ar, ipso-C	–	129,13 с
	7	C=O	–	196,05 с
	9	Ar, ipso-C	–	136,92 с
	10,14	Ar, α-CH	7,67 д	129,71 с
	11,13	Ar, β-CH	7,46 т	129,08 с
	12	Ar, γ-CH	7,60 т	134,07 с
	16	O-CH ₂	4,18 т	66,25 с
	17	N-CH ₂	3,85 т	43,47 с
	19	C=O	-	151,82 с
	20	NH	11,10 с	-
	21	C=O	-	162,76 с
	22	=CH	5,12 с	101,55 с
	23	=C	-	154,49 с
	26	CH ₃	1,82 с	19,88 с

Примечание: обозначения: т – триплет, с – синглет, д – дуплет, к – квартет

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Экспериментальную работу по определению ЯМР спектров исследуемого вещества проводили на ЯМР-спектрометре Bruker Avance-IIIHD 500 (Bruker, Германия). Навеску 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила, массой 20 мг, растворяли в 600 мкл дейтерированного диметилсульфоксида (DMSO- d_6). Полученный раствор без дальнейшей обработки "asis" помещали в ЯМР-спектрометр для регистрации 1H , ^{13}C , HС-NMQC и HС-NMBC спектров. Регистрацию спектров 1H -ЯМР проводили при рабочей частоте 500,13 МГц, ^{13}C при рабочей частоте 125,76 МГц. Для подтверждения строения углеродного скелета потенциального продукта регистрировали спектры ^{13}C в фазочувствительном варианте JMOD (CH₃, CH – сигналы с отрицательными фазами, CH₂, C – сигналы с положительными фазами), а также инверсные гетероядерные корреляции HС-NMQC (прямые взаимодействия C-H), HС-NMBC (дальние взаимодействия C-H). Отнесение в спектре ^{13}C -JMOD производили на основе анализа двумерных инверсных корреляций HС-NMQC и HС-NMBC. Для подтверждения строения углеродного скелета были зарегистрированы спектры ЯМР ^{13}C в фазочувствительном варианте JMOD (сигналы C, CH₂ направлены вверх, сигналы CH, CH₃ вниз), HС-NMQC, HС-NMBC.

Исследование механизма действия *in vitro*

Изучение механизма действия 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила проводили путем оценки ингибирующей активности в отношении ОТ ВИЧ-1 дикого типа и ее мутантных форм, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса, с использованием радиоактивно-меченных нуклеотидов. Для экспрессии гетеродимера дикого типа обратной транскриптазы ВИЧ-1 использовались клетки *E. coli* штамма M15[pRep4] (Qiagen, Германия), которые трансформировали плазмидой pBHRT-PROT. Для получения мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1 использовались клетки *E. coli* штамма Rosetta DE3 (Qiagen, Германия), трансформированные целыми плазмидами.

В ходе исследования ингибирующей активности 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в отношении мутантных форм ОТ ВИЧ-1 использовали панель мутантных форм ОТ ВИЧ-1 с аминокислотными заменами L100I, K103N, V106A, Y181C, G190A, так как они широко представлены у пациентов с устойчивостью к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ), приводят к резистентности посредством разных механизмов и являются принятыми при определении профиля резистентности новых анти-ВИЧ препаратов. Дополнительно была исследована ингибирующая активность 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в отношении двойного мутанта с двумя наиболее часто встречающимися заменами K103N и Y181C. В качестве по-

ложительного контроля ингибитора ОТ ВИЧ-1 была использована субстанция препарата Эфавиренз. Константу ингибирования для субстанции определяли по методу Диксона, то есть на основании зависимости обратной скорости ферментативной реакции в присутствии ингибитора от его концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общий вид молекулы и кристаллической упаковки показан на рисунке 2. Основные кристаллографические данные и параметры уточнения представлены в таблице 1.

Общий вид дифрактограммы показан на рисунке 3, основные характеристики дифракционных максимумов приведены в таблице 2.

Уточнение расходимости между экспериментальной и теоретическими данными показало, что образец соответствует одной кристаллической фазе 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Других кристаллических фаз не обнаружено.

Полученные данные термического анализа субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил приведены на рисунках 4–6.

Процесс потери массы начинается при температуре 25–50°C. Снижение массы в данном температурном интервале составляет порядка 1%, что связано с удалением остаточных растворителей или влаги в образце. В интервале температур 184–227°C потеря массы составляет порядка 3%, что связано с разрушением кристаллогидрата. После 300°C с субстанцией начинают происходить термические изменения, заканчивающиеся термоокислительной деструкцией. На ДТГ кривой пик с вершиной при 203°C соответствует температуре, при которой удаляется кристаллогидратная вода. На кривой ДТА эндотермический пик с вершиной при 230°C соответствует температуре плавления образца.

Установлено, что кристаллизация 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила наблюдается при температуре 191°C (рисунок 5). Температура плавления и теплота плавления при повторном нагревании несколько ниже, чем на первом, что связано с различными условиями формирования кристаллической фазы.

На термограмме фиксировали эндотермический пик с минимумом при 195°C. Он связан с удалением кристаллизационной воды. Температура плавления кристаллической фазы составила 227°C (рисунок 6).

Результаты элементного анализа представлены в таблице 3.

Исходя из полученных результатов, приведенных в таблице 3, можно заключить, что содержание определяемых элементов 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила соответствует теоретическому содержанию определяемых элементов, рассчитанных исходя из брутто-формулы C₂₀H₁₈N₂O₄.

Спектры 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в УФ-видимом диапазоне представлены на рисунках 7, 8.

Таблица 6 – Ингибиторная активность ННИОТ в отношении ОТ дикого (WT) и мутантных штаммов ВИЧ-1 *in vitro*

Обратная транскриптаза	Константа ингибирования (K_i , μM)	
	1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	Эфавиренз
Дикий тип	$0,23 \pm 0,04$	$0,011 \pm 0,002$
L100I	$>20^a$	$0,14 \pm 0,01$
K103N	$>20^a$	$0,52 \pm 0,1$
V106A	$>20^a$	$0,11 \pm 0,01$
Y181C	$12 \pm 2,4$	$0,053 \pm 0,006$
G190A	$8,3 \pm 0,4$	$0,091 \pm 0,008$
K103N/Y181C	$>20^a$	$0,52 \pm 0,08$

Примечание: ^aИсследуемое вещество, 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, ингибирует мутантные формы ОТ ВИЧ-1 L100I, K103N, V106A и двойной мутант K103N/Y181C в концентрации 20 мкМ с эффективностью 38%, 33%, 22% и 35% соответственно. Усиления ингибирования данных мутантных форм ОТ ВИЧ-1 при более высоких концентрациях 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила не наблюдается, что скорее всего связано с достижением предела растворимости соединения в реакционной смеси, содержащей 10% ДМСО

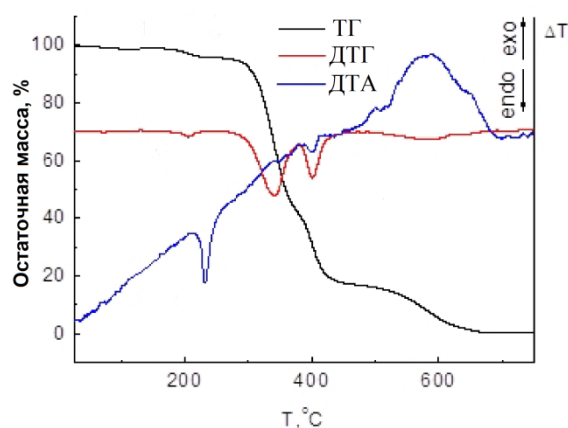


Рисунок 4 – Дериватограмма 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

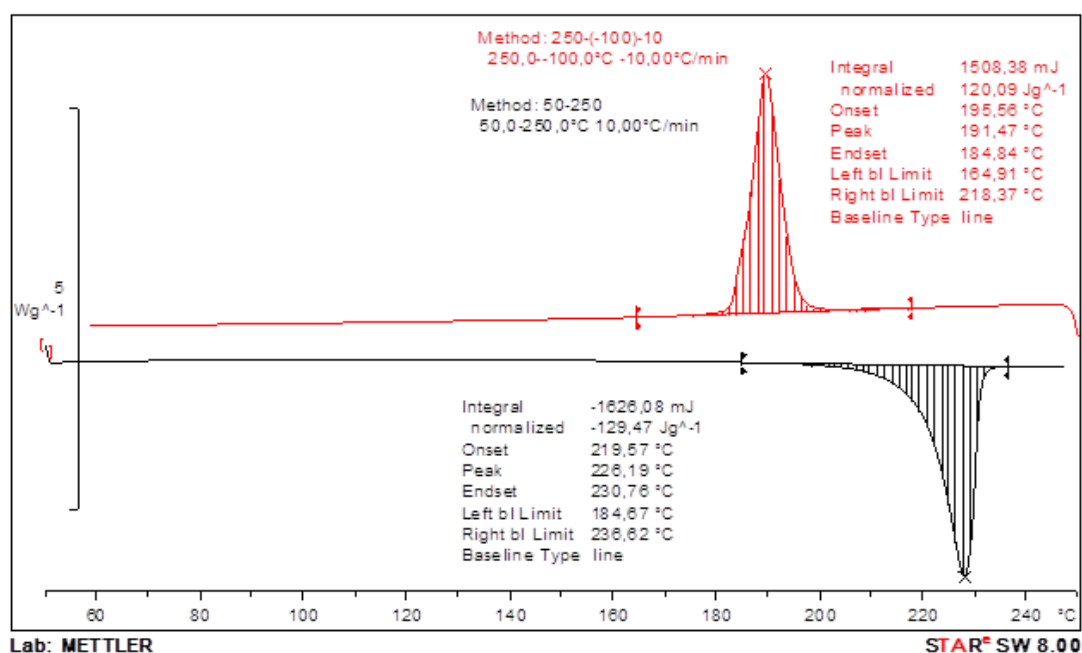


Рисунок 5 – Термограмма ДСК, полученная при сканировании 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

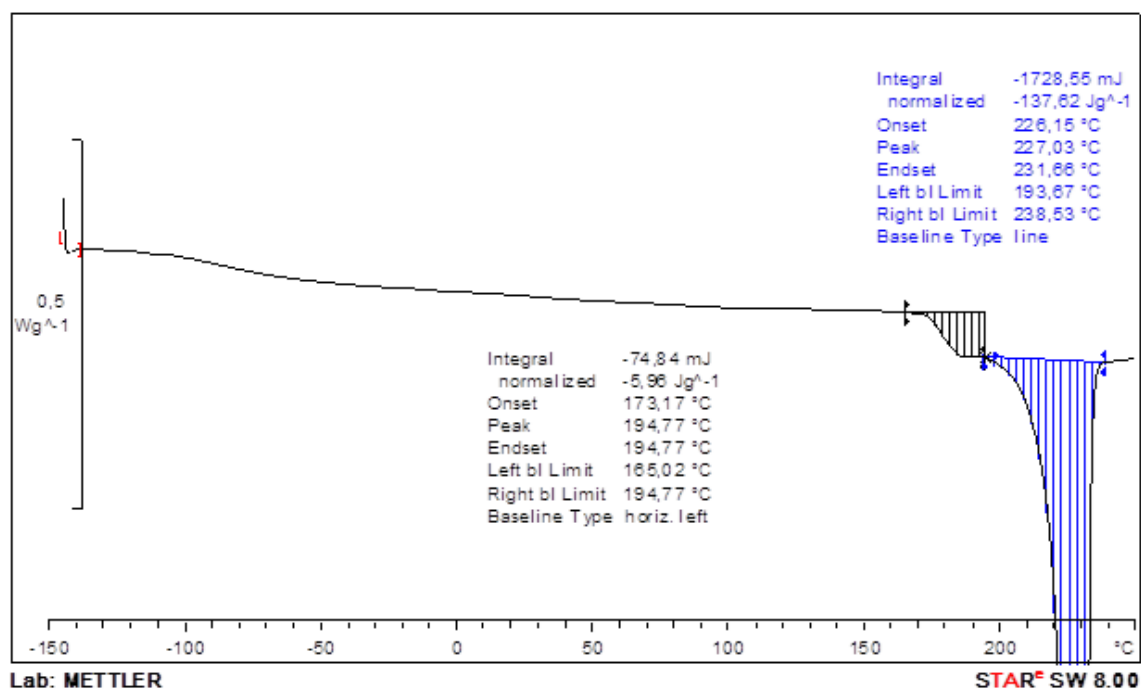


Рисунок 6 – Термограмма ДСК, полученная при сканировании
1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

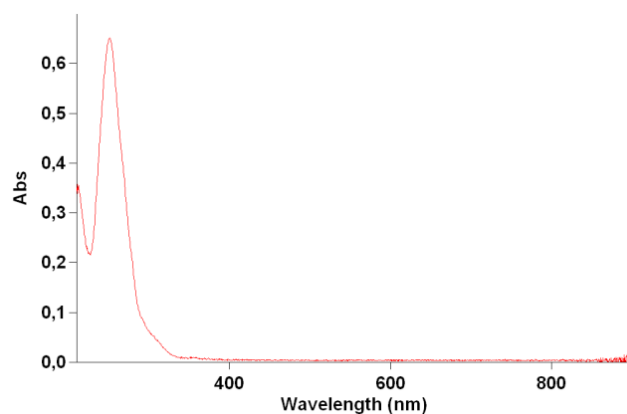


Рисунок 7 – Спектр поглощения в области 210–900 нм 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила
в тетрагидрофане с концентрацией 0,1 мг/мл в кювете с длиной оптического пути 1,00 мм

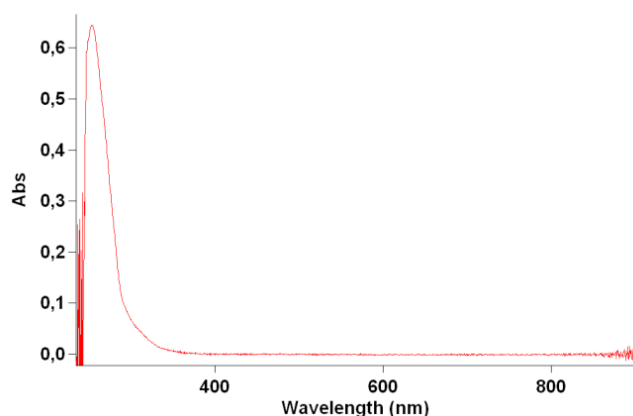


Рисунок 8 – Спектр поглощения в области 235–900 нм 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила
в диметилсульфоксиде с концентрацией 0,1 мг/мл в кювете с длиной оптического пути 1,00 мм

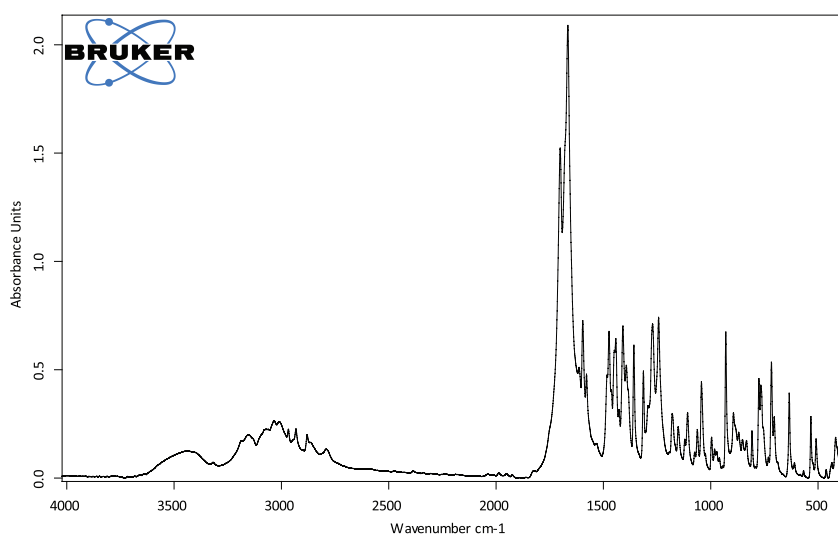


Рисунок 9 – ИК-спектр поглощения в области 4000–370 см⁻¹ 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в таблетках калия бромида

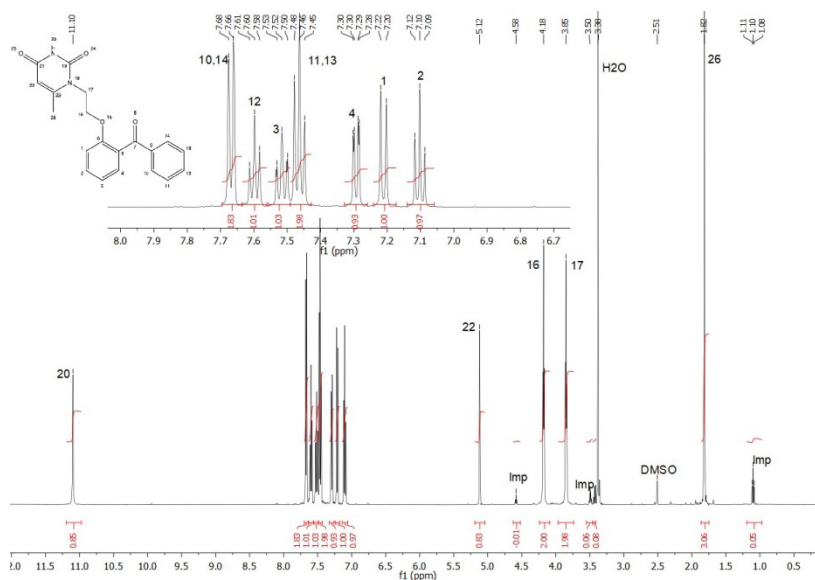


Рисунок 10 – ЯМР¹H спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

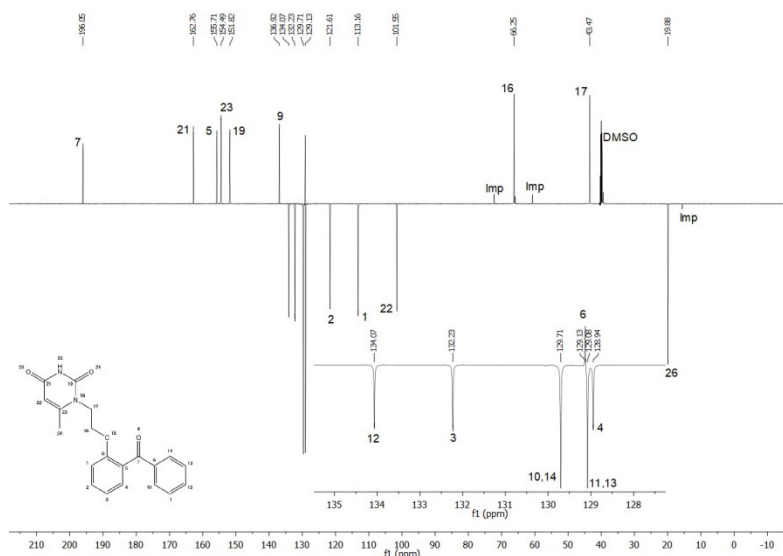


Рисунок 11 – ЯМР ¹³C JMOD спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

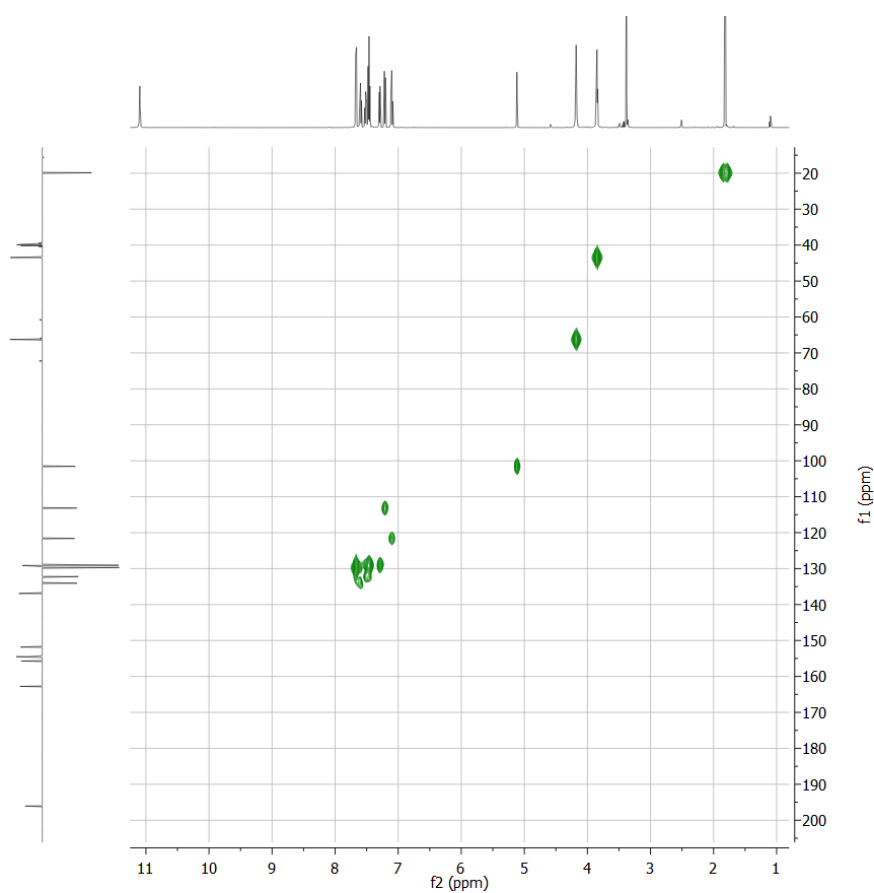


Рисунок 12 – ЯМР HS-NMQC спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

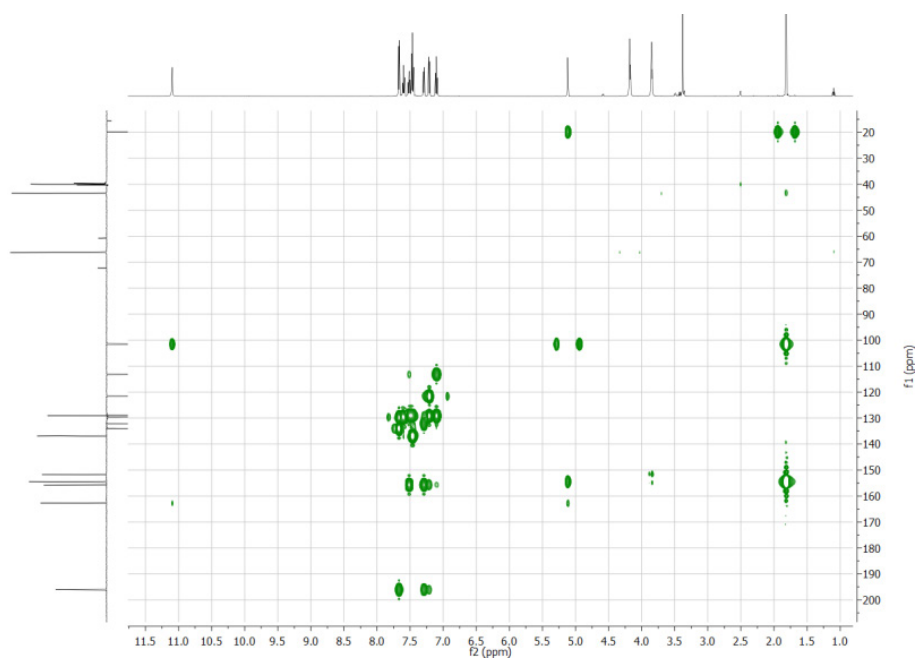


Рисунок 13 – ЯМР HS-NMBC спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

В спектрах виден максимум поглощения при 251,0 нм для раствора в ТГФ и 254,5 нм для раствора в ДМСО. При этом оптическая плотность для ДМСО возрастает гораздо быстрее, чем для ТГФ, поэтому в случае ТГФ возможно измерение от 210 нм. Для получения выраженного максимума поглощения субстанции в УФ-видимом диапазоне рекомендуются следующие условия измерения: раствор в тетрагидрофуране спектральной чистоты, концентрацией 0,10 мг/мл, измерение в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1,00 мм, регистрация спектра в диапазоне 210–900 нм, фон – чистый ТГФ.

На рисунке 9 приведен общий вид ИК-спектра поглощения образца в таблетках калия бромида.

В спектрах образца в ИК области наблюдается множество узких и характеристичных полос, которые сведены в таблицу 4. Кроме того, в спектре образца в KBr в районе 3400 см^{-1} присутствует широкая полоса, соответствующая влаге, поглощенной бромидом калия, поэтому она была исключена из рассмотрения.

Из-за сложности молекулы идентифицировать и однозначно отнести все сигналы к определенным функциональным группам не представляется возможным. Поэтому ИК-спектроскопия для данной молекулы может быть использована как дополнительная, наряду с ЯМР-спектроскопией.

Полученный спектр ЯМР ^1H анализируемого вещества представлен на рисунке 10.

Важнейшей характеристикой спектра ЯМР является химический сдвиг (δ), который зависит от структуры молекулы. Электронная плотность протонов в молекулах определяется характером химической связи и индукционными эффектами окружающих групп, вследствие чего экранирование протонов становится различным и их сигналы проявляются в разных областях спектра.

Произведено отнесение сигналов в спектре ^1H (рис. 10). Из спектра видно, что в образце присутствуют сигналы, относящиеся как к алифатическим фрагментам, так и к ароматическим кольцам. Также виден сигнал группы NH. В целом спектр основного продукта не противоречит предложенной структуре. Также в спектре ^1H в ароматической области присутствуют малоинтенсивные сигналы примесей в следовых количествах, которые из-за их низкого содержания невозможно идентифицировать.

Для подтверждения строения углеродного скелета были зарегистрированы спектры ЯМР ^{13}C в фазочувствительном варианте JMOD (сигналы C, CH_2 направлены вверх, сигналы CH, CH_3 вниз), HС-NMQC, HСНМВС. Эти спектры представлены на рисунках 11–13.

Произведено отнесение сигналов в спектре ^{13}C (рис. 11). Из спектра видно, что в образце присутствуют сигналы, относящиеся как к алифатическим фрагментам, так и к положениям в ароматических кольцах карбонильных групп. В целом, спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила не противоречит пред-

ложенной структуре. Также видны сигналы минорных примесей. Содержание их в образце находится ниже предела обнаружения спектроскопии ЯМР ^{13}C .

По результатам интерпретации инверсных двумерных корреляционных спектров HС-NMQC и HС-NMBC (рис. 12, 13) было сделано полное отнесение сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C , подтверждено строение углеродного скелета продукта. Из рисунков 12, 13 также видно, что распределение двумерных корреляционных сигналов не противоречит предложенной структуре предполагаемого продукта. Результаты отнесения полос к функциональным группам молекул исследуемого вещества представлены в таблице 5.

Установлено, что количество и взаимное расположение функциональных групп, интегральная интенсивность из сигналов в спектре ^1H соответствует структуре 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Строение углеродного скелета соответствует структуре исследуемого соединения.

Современные инструментальные методы анализа позволяют всецело охарактеризовать фармацевтическую субстанцию, что крайне необходимо для ее стандартизации, разработки методов контроля качества и последующего их включения в проекты нормативной документации [26]. В данной работе мы продемонстрировали результаты рентгеноструктурного, элементного, термогравиметрического, ДСК анализов, УФ-, ИК- и ЯМР- спектроскопии 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила – соединения, разрабатываемого в качестве лекарственного кандидата для лечения ВИЧ-инфекции.

Полученные данные подтверждают ожидаемое строение молекулы: визуализация молекулы рентгенодифракционным исследованием, рассчитанная элементным анализом брутто-формула $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$, взаимное расположение функциональных групп и строение углеродного скелета на ЯМР-спектре соответствует ожидаемой структуре соединения. Выявленные характерные пики УФ- и ИК-спектров указывают на наличие основных функциональных групп, свойственных 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацилу. Результаты рентгенофазового исследования свидетельствуют о наличии одной кристаллической фазы образца, что согласуется с данными термических методов анализа, установивших отсутствие полиморфов субстанции. В ходе ЯМР-анализа были обнаружены малоинтенсивные сигналы примесей в следовых количествах, однако их содержание оказалось крайне малым, что свидетельствует о надлежащем синтезе и высокой степени очистки субстанции.

Важнейшим этапом исследования стало изучение механизма действия 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в отношении ОТ ВИЧ-1.

Было показано, что 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил является эффективным ингибитором ОТ как дикого штамма ВИЧ-1, так и ряда ее мутантных форм (таблица 6). Активность объекта

испытаний зависит от мутаций в сайте связывания нуклеозидных ингибиторов ОТ, действующих по неконкурентному механизму.

Результаты, представленные в таблице 6, подтверждают, что объект исследования относится к группе нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ-1. Следует отметить, что эфавиренз ингибировал полимеразную активность ОТ в более низких концентрациях, чем 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, при равной противовирусной активности *in vitro*.

Высокая изменчивость ВИЧ приводит к многочисленным заменам аминокислот в ОТ, формирующим резистентность вируса к ННИОТ [27]. Согласно литературным данным [28], большинство выявленных мутаций локализовано в гидрофобном кармане, центре связывания ННИОТ ВИЧ, вблизи каталитического центра фермента. Среди пациентов с резистентностью к ННИОТ наиболее частыми являются мутации K103N (56,98%) и Y181C (24,95%). Мутации G190A, L100I, V106A встречаются реже (8,16%, 6,92% и 2,37% соответственно), но также сильно влияют на успех антиретровирусной терапии, так как приводят к потере ингибирующей активности невирапина более чем на 2 порядка [29]. Мутации L100I, K103N и Y181C являются характерными также для пациентов с резистентностью к эфавирензу и делавердину [30]. Известно, что мутации Y181C и V106A вызывали падение активности капревирина – потенциального ННИОТ второго поколения, снятого с клинических испытаний [31]. Для лерсивирин, ННИОТ, созданного на основе капревирина и прошедшего клиническую фазу IIb, удалось добиться устойчивости к этим мутациям, однако наблюдалось падение активности при наличии мутации L100I [32]. Умеренная потеря активности в отношении мутации V106A была характерна для соединения GW69564 [33], модификация структуры которого позволила создать другую молекулу (GW695634), дошедшую до III фазы клинических испытаний. Предложено несколько механизмов устойчивости ОТ к действию ННИОТ: мутации L100I и G190A стерически препятствуют размещению ННИОТ в гидрофобном кармане [34], мутация Y181C приводит к утрате взаимодействий с аминокислотными остатками внутри кармана [35], мутация K103N затрудняет проникновение ННИОТ в гидрофобный карман [36, 37].

В ходе работы была продемонстрирована способность 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила ингибировать не только ОТ ВИЧ-1 дикого типа, но и ее наиболее распространенные мутантные формы с аминокислотными заменами L100I, K103N, V106A, Y181C, G190A, широко представленными у пациентов с устойчивостью к ННИОТ и приводящими к резистентности посредством разных механизмов. Данные мутации часто изучаются при определении профиля резистентности новых антиретровирусных препаратов. Дополнительно была показана ингибирующая активность 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в отношении двойного мутанта с двумя наиболее часто встречающимися заменами K103N и Y181C, что крайне важно для разработки нового антиретровирусного препарата, нацеленного на преодоление резистентности вируса. Для подтверждения активности соединения к различным штаммам и клиническим изолятам инфекции требуется проведение исследований *in vitro* на культурах клеток, инфицированных ВИЧ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что УФ-спектр соединения имеет выраженный максимум поглощения при измерении раствора субстанции в тетрагидрофуране в концентрации 0,10 мг/мл, в ИК спектре наблюдаются специфические полосы в области 4000–370 см⁻¹, что позволяет использовать УФ и ИК спектры для идентификации исследуемого вещества в субстанции. В результате проведенных рентгеноструктурного, элементного, ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР анализов была подтверждена структура 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила.

Показана возможность применения УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии, а также термических анализов для подтверждения подлинности при входном контроле субстанции. Разработанные методы могут быть использованы в контроле качества и включены в проект НД на субстанцию 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил.

Исследования механизма действия исследуемого вещества в отношении ОТ ВИЧ-1 показали, что соединение относится к группе ННИОТ ВИЧ-1.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ГК №14.N08.11.0154 от 02 июня 2017 г., Уникальный идентификатор контракта RF----N0817X0148).

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Джайн (Корсакова) – методология исследований, интерпретация результатов, написание текста;
Д.В. Демченко – статистическая обработка результатов, написание текста;
А.А. Озеров, В.Ю. Балабаньян – работа над концепцией и дизайном исследований,
М.Н. Макарова, В.Г. Макаров – интерпретация и визуализация результатов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Chen B. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry // Trends Microbiol. – 2019. – Vol. 27, №10. – P. 878–891. DOI: 10.1016/j.tim.2019.06.002.
2. Gulick R.M., Flexner C. Long-Acting HIV Drugs for Treatment and Prevention // Annu Rev Med. – 2019. – Vol. 70. – P. 137–150. DOI: 10.1146/annurev-med-041217-013717.
3. Cooper V. Clatworthy J., Harding R., Whetham J; Emerge Consortium. Measuring quality of life among people living with HIV: a systematic review of reviews // Health Qual Life Outcomes. – 2017. – Vol. 15, No.1. – P. 220. DOI: 10.1186/s12955-017-0778-6.
4. Eggleston J.S., Nagalli S. Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). 2021. In: StatPearls [Электронный доступ] // Treasure Island (FL): StatPearls Publishing – 2021.
5. Dionne B. Key Principles of Antiretroviral Pharmacology // Infect Dis Clin North Am. – 2019. – Vol. 33, No.3. – P. 787–805. DOI: 10.1016/j.idc.2019.05.006.
6. Gupta R.K., Gregson J., Parkin N., Haile-Selassie H., Tanuri A., Andrade Forero L., Kaleebu P., Watera C., Aghokeng A., Mutenda N., Dzangere J., Hone S., Hang Z.Z., Garcia J., Garcia Z., Marchorro P., Beteta E., Giron A., Hamers R., Inzaule S., Frenkel L.M., Chung M.H., de Oliveira T., Pillay D., Naidoo K., Kharsany A., Kugathasan R., Cutino T., Hunt G., Avila Rios S., Doherty M., Jordan M.R., Bertagnolio S. HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis // Lancet Infect Dis. – 2018. – Vol. 18, No.3. – P. 346–355. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30702-8.
7. Wang Y., De Clercq E., Li G. Current and emerging non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) for HIV-1 treatment // Expert Opin Drug Metab Toxicol. – 2019. – Vol. 15, No.10. – P. 813–829. DOI: 10.1080/17425255.2019.1673367.
8. Das K., Martinez S.E., DeStefano J.J., Arnold E. Structure of HIV-1 RT/dsRNA initiation complex prior to nucleotide incorporation // Proc Natl Acad Sci USA. – 2019. – Vol. 116, No.15. – P. 7308–7313. DOI: 10.1073/pnas.1814170116.
9. Das K., Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance // Part 2. Curr Opin Virol. – 2013. – Vol. 3, No.2. – P. 119–28. DOI: 10.1016/j.coviro.2013.03.014.
10. Das K., Martinez S.E., Bauman J.D., Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism // Nat Struct Mol Biol. – 2012. – Vol. 19, No.2. – P. 253–259. DOI: 10.1038/nsmb.2223.
11. Liu S., Abbondanzieri E.A., Rausch J.W., Le Grice S.F., Zhuang X. Slide into action: dynamic shuttling of HIV reverse transcriptase on nucleic acid substrates // Science. – 2008. – Vol. 322, No.5904. – P. 1092–1097. DOI: 10.1126/science.1163108.
12. Schauer G.D., Huber K.D., Leuba S.H., Sluis-Cremer N. Mechanism of allosteric inhibition of HIV-1 reverse transcriptase revealed by single-molecule and ensemble fluorescence // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42, No.18. – P. 11687–11696. DOI: 10.1093/nar/gku819.
13. Wang J., Smerdon S.J., Jäger J., Kohlstaedt L.A., Rice P.A., Friedman J.M., Steitz T.A. Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer // Proc Natl Acad Sci USA. – 1994. – Vol. 91, No.15. – P. 7242–7246. DOI: 10.1073/pnas.91.15.7242.
14. De Corte BL. From 4,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazo[4,5-1-jk][1,4]benzodiazepin-2(1H)-one (TIBO) to etravirine (TMC125): fifteen years of research on non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase // J Med Chem. – 2005. – Vol. 48, No.6. – P. 1689–1696. DOI: 10.1021/jm040127p.
15. Schafer J.J., Short W.R. Rilpivirine, a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor for the management of HIV-1 infection: a systematic review // Antivir Ther. – 2012. – Vol. 17, No.8. – P. 1495–1502. DOI: 10.3851/IMP2254.
16. Hofstra L.M., Sauvageot N., Albert J., et al. Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe // Clin Infect Dis. – 2016. – Vol. 62, №5 – P. 655–663.
17. Tang M.W., Shafer R.W. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications // Drugs. – 2012. – Vol.72, No.9. P. e1-25. DOI: 10.2165/11633630-000000000-00000.
18. Brucoleri A. Positional adaptability in the design of mutation-resistant nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors: a supramolecular perspective. AIDS Res Hum Retroviruses. 2013 Jan;29(1):4–12. DOI: 10.1089/AID.2012.0141.
19. La Regina G., Coluccia A., Silvestri R. Looking for an active conformation of the future HIV type-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors // Antivir Chem Chemother. – 2010. – Vol. 20, No.6. – P. 213–37. DOI: 10.3851/IMP1607.
20. Huo Z., Zhang H., Kang D., Zhou Z., Wu G., Desta S., Zuo X., Ding X., Jing L., Daelemans D., De Clercq E., Pannecouque C., Zhan P., Liu X. Discovery of Novel Diarylpyrimidine Derivatives as Potent HIV-1 NNRTIs Targeting the “NNRTI Adjacent” Binding Site // ACS Med Chem Lett. – 2018. – Vol. 9, No.4. – P. 334–338. DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.7b00524.
21. Kang D., Wang Z., Zhang H., Wu G., Zhao T., Zhou Z., Huo Z., Huang B., Feng D., Ding X., Zhang J., Zuo X., Jing L., Luo W., Guma S., Daelemans D., Clercq E., Pannecouque C., Zhan P., Liu X. Further Exploring Solvent-Exposed Tolerant Regions of Allosteric Binding Pocket for Novel HIV-1 NNRTIs Discovery // ACS Med Chem Lett. – 2018. – Vol. 9, No.4. – P. 370–375. DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.8b00054.
22. Озеров А.А., Новиков М.С., Тимофеева Ю.А., Лобачев А.А., Луганченко А.И., Гейсман А.Н. Пиримидиновые нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 – история разработки и перспективы // Вестник ВолгГМУ. – 2012. – №3. – 10–17.
23. Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V., Ozerov A.A., Valuev-Elliston V.T., Temburnikar K., Gurskaya G.V., Kochetkov S.N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl] uracils as potent anti-HIV-1 agents // Bioorg Med Chem. – 2011. – Vol. 19, No.19. – P. 5794–5802. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.08.025.
24. Петров В.И., Новиков М.С., Луганченко А.И., Озеров А.А., Рогова Н.В. Кластерный подход к созданию биотехнологических лекарственных средств // Медицинская этика. – 2014. – №1. – С. 28–31.
25. Озеров А.А., Новиков М.С., Луганченко А.И., Хартман Т., Букхайт Р.У. Новые N-[2-(Бензоилфенокси)этил] производные нуклеиновых оснований – синтез и анти-ВИЧ-1 активность *in vitro* // Волгоградский научно-мед. журн. – 2012. – №4. – С. 15–18.
26. Siddiqui M.R., Al Othman Z.A., Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review //

- Arabian Journal of Chemistry. – 2017. – Vol. 10, No.2. – P. 1409–1421. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.04.016
27. Rai M.A., Pannek S., Fichtenbaum C.J. Emerging reverse transcriptase inhibitors for HIV-1 infection // *Expert Opin Emerg Drugs*. – 2018. – Vol. 23, No.2. – P. 149–157. DOI: 10.1080/14728214.2018.1474202.
 28. de Bethune, M.P. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009) // *Antiviral Res*. – 2010. – Vol. 85, No. 1. – P. 75–90. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.09.008.
 29. Maga G., Amacker M., Ruel N., Hübscher U., Spadari S. Resistance to nevirapine of HIV-1 reverse transcriptase mutants: loss of stabilizing interactions and thermodynamic or steric barriers are induced by different single amino acid substitutions. // *J Mol Biol*. – 1997. – Vol. 274, No. 5. – P. 738–747. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1427.
 30. Mackie N. Resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. In: Geretti AM, editor. *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice*. Изд-во London: Mediscript; 2006. Chapter 2.
 31. Sato A., Hammond J., Alexander T.N., Graham J.P., Binford S., Sugita K., Sugimoto H., Fujiwara T., Patick A.K. *In vitro* selection of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that confer resistance to capravirine, a novel nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor // *Antiviral Res*. – 2006. – Vol. 70, No.2. – P. 66–74. DOI: 10.1016/j.antiviral.2006.01.001.
 32. Corbau R., Mori J., Phillips C., Fishburn L., Martin A., Mowbray C., Panton W., Smith-Burchnell C., Thornberry A., Ringrose H., Knöchel T., Irving S., Westby M., Wood A., Perros M. Lersivirine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor with activity against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2010. – Vol. 54, No.10. – P. 4451–4463. DOI: 10.1128/AAC.01455-09.
 33. Chan J.H., Freeman G.A., Tidwell J.H., Romines K.R., Schaller L.T., Cowan J.R., Gonzales S.S., Lowell G.S., Andrews C.W. 3rd, Reynolds D.J., St. Clair M., Hazen R.J., Ferris R.G., Creech K.L., Roberts G.B., Short S.A., Weaver K., Koszalka G.W., Boone L.R. Novel benzophenones as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1 // *J Med Chem*. – 2004. – Vol. 47, No.5. – P. 1175–1182. DOI: 10.1021/jm030255y.
 34. Hsiou Y., Das K., Ding J., Clark A.D. Jr., Kleim J.P., Rösner M., Winkler I., Riess G., Hughes S.H., Arnold E. Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance // *J Mol Biol*. – 1998. – V. 284, No.2. – P. 313–323. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2171.
 35. Kertesz D.J., Brotherton-Pleiss C., Yang M., Wang Z., Lin X., Qiu Z., Hirschfeld D.R., Gleason S., Mirzadegan T., Dunten P.W., Harris S.F., Villaseñor A.G., Hang J.Q., Heilek G.M., Klumpp K. Discovery of piperidin-4-yl-aminopyrimidines as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. N-benzyl derivatives with broad potency against resistant mutant viruses // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2010. – Vol. 20, No.14. – P. 4215–4218. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.05.040.
 36. Hsiou Y., Ding J., Das K., Clark A.D. Jr., Boyer P.L., Lewi P., Janssen P.A., Kleim J.P., Rösner M., Hughes S.H., Arnold E. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance // *J Mol Biol*. – 2001. – Vol. 309, No. 2. – P. 437–445. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4648.
 37. Ren J., Nichols C.E., Chamberlain P.P., Weaver K.L., Short S.A., Chan J.H., Kleim J.P., Stammers D.K. Relationship of potency and resilience to drug resistant mutations for GW420867X revealed by crystal structures of inhibitor complexes for wild-type, Leu100Ile, Lys101Glu, and Tyr188Cys mutant HIV-1 reverse transcriptases // *J Med Chem*. – 2007. – Vol. 50, No.10. – P. 2301–2309. DOI: 10.1021/jm061117m.

АВТОРЫ

Джайн (Корсакова) Екатерина Александровна – аспирант кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. ORCID ID: 0000-0003-0283-8598. E-mail: ekaterina.korsa@gmail.com

Демченко Дмитрий Валентинович – кандидат фармацевтических наук, руководитель группы ГЛС ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации». ORCID ID: 0000-0003-3856-3936. E-mail: demchenko.dv@doclinika.ru

Озеров Александр Александрович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Мин-

здрава России. ORCID ID: 0000-0002-4721-0959. E-mail: prof_ozarov@yahoo.com

Макарова Марина Николаевна – доктор медицинских наук, заместитель ген. директора по науке ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации». ORCID ID: 0000-0003-3176-6386. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Макаров Валерий Геннадьевич – доктор медицинских наук, профессор, генеральный директор ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации». ORCID ID: 0000-0002-2447-7888. E-mail: makarov.vg@doclinika.ru

Балабаньян Вадим Юрьевич – доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии, факультет фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». ORCID ID: 0000-0002-5744-7060. E-mail: bal.pharm@mail.ru

УДК: 616.24-036.12-007.272-036.2(470.46):615.03.003.1



ОЦЕНКА СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКОГО БРЕМЕНИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ ЗА 5-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД – РЕГИОНАЛЬНЫЙ АСПЕКТ

Е.А. Орлова¹, А.Р. Умерова^{1,2}, И.П. Дорфман¹, М.А. Орлов¹, М.А. Абдуллаев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121

² Территориальный орган Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения по Астраханской области

414040, Россия, г. Астрахань, ул. Коммунистическая, 27

E-mail: eorlova56@mail.ru

Получено 19.02.2021

Принята к печати 19.04.2021

Цель. Оценка экономического ущерба от ХОБЛ, включая прямые медицинские и немедицинские затраты и не прямые затраты, связанные с преждевременной смертью лиц трудоспособного возраста.

Материалы и методы. Впервые проведена оценка экономического бремени ХОБЛ в Астраханской области (АО) с использованием клинично-экономического анализа «стоимость болезни». В исследовании учитывались прямые медицинские затраты на стационарное, амбулаторное лечение, скорую и неотложную медицинскую помощь, а также прямые немедицинские затраты, связанные с выплатами пособий по инвалидности. Непрямые затраты определялись как экономические потери от не произведенной продукции вследствие преждевременной смерти в экономически активном возрасте.

Результаты. Экономическое бремя ХОБЛ в АО за период с 2015 по 2019 гг. суммарно составило 757,11 млн рублей, что эквивалентно 0,03% валового регионального продукта за пятилетний период исследования. Прямые медицинские и немедицинские затраты суммарно составили 178,02 млн. рублей. В структуре прямых медицинских затрат расходы на стационарную, а также скорую и неотложную медицинскую помощь за период исследования увеличились на 92,5% и 45,5% соответственно. В то время как затраты на амбулаторную помощь уменьшились на 31,9%, прирост прямых немедицинских затрат, связанных с выплатами пособий по инвалидности, вырос на 5,1% к 2019 г. Непрямые потери составили 579,09 млн рублей.

Заключение. В структуре основного ущерба преобладают не прямые потери в экономике, связанные с преждевременной смертью населения экономически активного возраста. В структуре прямых медицинских затрат преобладали затраты на стационарную помощь. Данные исследования свидетельствуют о необходимости продолжения более углубленного анализа экономического бремени ХОБЛ, а также оптимизации лечения и профилактики развития обострений данного заболевания.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких; экономическое бремя; прямые медицинские затраты; прямые немедицинские затраты; не прямые затраты; Астраханская область

Список сокращений: АО – Астраханская область; БОД – болезни органов дыхания; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; ЕС – Европейский союз; ВН – временная нетрудоспособность; ТФОМС – Территориальный фонд обязательного медицинского страхования; СМП – скорая медицинская помощь, НМП – неотложная медицинская помощь; КСГ – клинично-статистические группы; ВРП – валовый региональный продукт; ПГПЖ – потерянные годы потенциальной жизни.

ESTIMATION OF SOCIO-ECONOMIC BURDEN OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE FOR A 5-YEAR PERIOD: A REGIONAL ASPECT

E.A. Orlova¹, A.R. Umerova^{1,2}, I.P. Dorfman¹, M.A. Orlov¹, M.A. Abdullaev¹

¹ Astrakhan State Medical University
121, Bakinskaya Str., Astrakhan, Russia, 414000

² Territorial body of Federal State Surveillance Service in Healthcare for Astrakhan Region
27, Kommunisticheskaya Str., Astrakhan, Russia 414040

E-mail: eorlova56@mail.ru

Received 19 Feb 2021

Accepted 19 Apr 2021

Для цитирования: Е.А. Орлова, А.Р. Умерова, И.П. Дорфман, М.А. Орлов, М.А. Абдуллаев. Оценка социально-экономического бремени хронической обструктивной болезни легких за 5-летний период – региональный аспект. *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):130-138. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-130-138

© Е.А. Орлова, А.Р. Умерова, И.П. Дорфман, М.А. Орлов, М.А. Абдуллаев, 2021

For citation: E.A. Orlova, A.R. Umerova, I.P. Dorfman, M.A. Orlov, M.A. Abdullaev. Estimation of socio-economic burden of chronic obstructive pulmonary disease for a 5-year period: a regional aspect. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(2):130-138. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-130-138

The aim of the study was to estimate the economic damage by COPD, including direct medical and non-medical costs and indirect costs associated with premature deaths of working-age individuals.

Materials and methods. First, estimation of the economic COPD burden in Astrakhan region (AR) was carried out using the clinical and economic analysis of the "cost of illness" (COI). Direct medical costs of inpatient, outpatient, ambulance and emergency medical care, as well as direct non-medical costs associated with the disability benefits payments, were taken into account. Indirect costs were defined as economic losses from undelivered products due to premature deaths of working-age individuals.

Results. From 2015 to 2019, the economic COPD burden in AR amounted to 757.11 million rubles in total, which is equivalent to 0.03% of the gross regional product covering a five-year period of the study. Direct medical and non-medical costs totaled 178.02 million rubles. In the structure of direct medical expenses, expenses for inpatient, as well as ambulance and emergency medical care during the study period, increased by 92.5% and 45.5%, respectively. While the costs for the outpatient care decreased by 31.9%, the increase in direct non-medical costs associated with the disability benefits payments, increased by 5.1% (2019). Indirect losses amounted to 579.09 million rubles.

Conclusion. The structure of the main damage is dominated by indirect losses in the economy associated with premature deaths of working-age individuals. In the structure of direct medical costs, inpatient care costs prevailed. These studies indicate the need to continue an advanced analysis of the economic burden of COPD, as well as to optimize the treatment and prevention of the exacerbations development of this disease.

Keywords: Chronic Obstructive Pulmonary Disease; economic burden; direct medical costs; direct non-medical costs; indirect costs; Astrakhan region

List of abbreviations: AR – Astrakhan region; RDs – respiratory diseases; COPD – Chronic Obstructive Pulmonary Disease; EU – European Union; TD – temporary disability; TCMIF – Territorial Compulsory Medical Insurance Fund; A – Ambulance; EMC – emergency medical care; DRG – Diagnosis-related group; GRP – gross regional product; YPLL – years of potential life lost

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является наиболее часто встречающимся хроническим заболеванием органов дыхания. В настоящее время зарегистрировано более 250 млн. человек во всем мире, страдающих этой патологией [1]. В последние десятилетия отмечается рост заболеваемости и смертности от ХОБЛ [2]. Если в странах Западной Европы распространенность ХОБЛ составляет 10–27% [3], то в России – 21,8% [4]. ХОБЛ является третьей причиной смерти в мире [5]. Высокая распространенность, сочетающаяся с инвалидизацией и смертностью, представляет ХОБЛ как глобальную медико-социальную и экономическую проблему [6, 7].

Изучение экономического ущерба, наносимого ХОБЛ, проводится во всем мире. Только в Соединенных Штатах Америки прямые затраты на госпитализацию при обострении ХОБЛ составляют 18 млрд долларов. [8]. В странах Европейского союза (ЕС) респираторные заболевания обременяют бюджеты здравоохранения на 47,3 млрд. евро. При общих расходах на здравоохранение в 800 млрд. евро (9% от валового внутреннего продукта), прямые расходы на респираторные заболевания составляют примерно 6% от общего бюджета здравоохранения этих стран [9]. Подобные исследования проводятся в Российской Федерации. Так в исследовании И.С. Крысанова [10] были изучены прямые затраты, составившие в 2007 году 54,6 млрд. рублей. К 2012 эти затраты увеличились до 61,6 млрд. рублей. По результатам исследования общественного фонда «Качество жизни», экономическое бремя ХОБЛ в 2013 году в Российской Федерации (РФ) оценивалось более чем в 24 млрд рублей, включая медицинские затраты, потери с временной нетрудоспособностью (ВН) и презенте-

измом¹. В 2016 году группа Российских исследователей во главе с А.В. Концевой просчитала экономический ущерб от болезней органов дыхания (БОД) и ХОБЛ в РФ за 2016 год, который составил 903,9 млрд. рублей для БОД и 170,3 млрд. рублей для ХОБЛ (18,8% от БОД и 0,2% от ВВП) [12].

В Астраханской области (АО) имеет место неутешительный прогноз роста госпитализаций, инвалидизаций и смертности по причине ХОБЛ, как и в РФ в целом, о чем свидетельствуют статистические данные по региону². Подсчет регионального экономического бремени ХОБЛ ранее не проводился, что делает настоящее исследование актуальным.

ЦЕЛЬ. Оценка экономического ущерба от ХОБЛ, включающая прямые медицинские и немедицинские затраты, а также непрямые потери в экономике, связанные с преждевременной смертью трудоспособного населения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Впервые в Астраханской области (АО) была проведена оценка экономического бремени заболевания ХОБЛ за период 2015–2019 гг. Исследование включало поэтапный расчет прямых затрат системы здравоохранения АО за исследуемый период, а также не прямых затрат в виде экономических потерь. В исследование были включены статистические данные по ХОБЛ (код МКБ – J44).

¹ Межрегиональный общественный благотворительный фонд «Качество жизни». Исследование «Социально-экономические потери от бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких в Российской Федерации». Доступно на: <http://www.qualityoflife.ru/en/node/117>

² Статистический ежегодник Астраханской области. 2020 г. Стат. сб. / Астрахань стат. – г. Астрахань. Доступно на: <https://astrastat.gks.ru/storage/mediabank/6TaD00de/Экономика Астраханской области – 2015–2019 гг.pdf>

С целью оценки влияния ХОБЛ на региональный бюджет применялся вид клинико-экономического анализа – анализ «стоимости болезни» (COI – cost of illness), который включает как прямые, так и непрямые (косвенные) затраты государства [10]. Анализ выполнялся по следующей формуле:

$$COI = DC + IC,$$

где COI – «Стоимость болезни»; DC (Direct costs) – прямые затраты; IC (Indirect costs) – непрямые затраты.

Для оценки экономического бремени ХОБЛ были проанализированы материалы, полученные из следующих ресурсов и баз данных:

1. Данные по заболеваемости ХОБЛ и БОД населения из АО ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Минздрава России за исследуемый период, включая абсолютное количество общих и новых выявленных случаев заболевания ХОБЛ³;

2. Данные по годовым формам статистической отчетности Территориального фонда обязательного медицинского страхования Астраханской области: «Сведения о деятельности подразделений медицинской организации, оказывающих медицинскую помощь в стационарных условиях» (количество госпитализаций, количество вызовов скорой медицинской помощи (СМП); неотложной медицинской помощи (НМП) (форма № 14)), «Сведения о числе заболеваний, зарегистрированных у пациентов, проживающих в районе обслуживания медицинской организации» (форма № 12), «Сведения о деятельности дневных стационаров медицинских организаций» (форма № 141)⁴;

3. Региональные экономические параметры валового регионального продукта (ВРП), а также статистические данные по количеству умерших по причине ХОБЛ по пятилетним возрастным группам за каждый исследуемый год были предоставлены Федеральной службой государственной статистики по Астраханской области и Республике Калмыкия⁵. Статистические данные запрашивались из ФКУ «ГБ МСЭ по Астраханской области» Минтруда России о количестве инвалидов по причине ХОБЛ по группам инвалидности за каждый год исследуемого периода.

При расчете прямых медицинских таких затрат, как затраты на амбулаторные обращения пациентов, СМП и лечение в стационарных условиях, использовались стоимостные показатели по тарифам Территориального фонда обязательного медицинского страхования (ТФОМС) для АО за исследуемый период. Экономический анализ прямых медицинских затрат

государства на оказание медицинской помощи по заболеванию ХОБЛ за пятилетний период в Астраханской области был основан на совокупности вышеуказанных расходов.

Прямые немедицинские затраты на выплаты по инвалидности рассчитывались с учетом количества инвалидов по ХОБЛ в каждой группе и расчетной величины пособия по инвалидности для каждой группы за каждый исследуемый год. Параметры, использованные для расчета прямых немедицинских затрат, связанных с инвалидизацией населения по причине ХОБЛ, представлены в таблице 1.

Непрямые затраты (Indirect costs), связанные с потерями в производстве ВРП по причине преждевременной смерти населения в трудоспособном возрасте рассчитывались с учетом коэффициента занятости населения. Порядок расчета соответствовал методологии, утвержденной согласно приказу от 10 апреля 2012 года № 192/323н/45н/113 Министерства экономического развития Российской Федерации, «Об утверждении Методологии расчета экономических потерь от смертности, заболеваемости и инвалидизации населения»⁶.

Основной формулой для расчета потерь от смертности населения была:

$$УВСГ_{x,s,d} = ЧУ_{x,s,d} \times \frac{ЧЗ_{x,s}}{ЧН_{x,s}} \times \frac{ВРП}{ЧЗ} \times 0,5,$$

где: $УВСГ_{x,s,d}$ – упущенная выгода в производстве ВРП (объем недопроизведенного ВРП) в результате смертности лиц в отчетном году в возрасте (x) пола (s) по причине смерти (d) в Российской Федерации в отчетном году; $ЧУ_{x,s,d}$ – число умерших в возрасте (x) пола (s) по причине смерти (d) в Астраханской области; $ЧЗ_{x,s}$ – численность занятых в возрасте (x) пола (s) в Астраханской области; $ЧН_{x,s}$ – численность населения в возрасте (x) пола (s) в Астраханской области; ВРП – валовой региональный продукт Астраханской области; ЧЗ – численность занятых в регионе; 0,5 – коэффициент, учитывающий распределение времени смертей в течение года.

Рассчитывались потерянные годы потенциальной жизни (ПГПЖ) по формуле:

$$ПГПЖ = (72 - B_{гр}) \times ЧУ_{Вгр},$$

где: ПГПЖ – потерянные годы потенциальной жизни; 72 – крайний предел возраста экономической активности; $B_{гр}$ – возрастная группа; $ЧУ_{Вгр}$ – число умерших в исследуемой возрастной группе.

Расчетная часть исследования проводилась с применением методов описательной статистики в программе MS Excel 10.0 (Microsoft, США).

³ ФГБУ «ЦНИИОИЗ» Минздрава России. Доступно на: <https://mednet.ru/miac/meditsinskaya-statistika>

⁴ Территориальный фонд обязательного медицинского страхования Астраханской области. Тарифы. Доступно на: <https://astfond.ru/oms/tarify/>.

⁵ Управление Федеральной службы государственной статистики по Астраханской области и Республике Калмыкия. Доступно на: <https://www.astrastat.gks.ru>.

⁶ Приказ Министерства экономического развития РФ, Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Минфина РФ и Федеральной службы государственной статистики от 10 апреля 2012 г. № 192/323н/45н/113 «Об утверждении Методологии расчета экономических потерь от смертности, заболеваемости и инвалидизации населения». Доступно на: <https://base.garant.ru/70170542/>.

Таблица 1 – Стоимостные показатели, использованные в анализе

Показатель	Значение				
Коэффициент относительной затратоемкости по КСГ для ХОБЛ	0,91				
Стоимость:	Стоимость, рублей				
	2015	2016	2017	2018	2019
1 госпитализации по ОМС	14933,72	15141,61	13524,03	15016,73	17725,39
1 обращения с профилактической целью	302,8	160,0	97,6	120,3	137,0
1 обращения по поводу заболевания	803,20	620,298	617,30	830,01	849,93
1 вызова неотложной помощи с учетом коэффициента КСГ	453,2	490	443,8	568,5	592,9
1 вызова СМП с учетом коэффициента КСГ	1724,5	1747,7	1819,5	2122,7	2248,92
1 случая лечения на дневном стационаре с учетом коэффициента КСГ	10056,18	8538,3	7 622,19	8253,27	11 627,83
Показатель	2015	2016	2017	2018	2019
ВРП млн. рублей	322303,0	346779,4	420961,1	553395,7	561695,9
ВРП на душу населения рублей	315996,9	340398,3	413440,6	544793,4	552965,3
Среднемесячная заработная плата, рублей	25499	27423,1	29599,2	33630,1	35791,5
Расчетная величина пособия по инвалидности с учетом коэффициента индексации, рублей	Группа	2015	2016	2017	2018
	I	16285,6	17934,3	24466,6	20270,7
	II	13193,2	14613,3	20915,9	16062,6
	III	10777,1	12070,8	18318,3	13489,6

Таблица 2 – Заболеваемость ХОБЛ и БОД за 5 лет в АО (2015–2019 гг.)

Показатель	2015	2016	2017	2018	2019
Число лиц с БОД	289876	316565	300636	313889	310706
Число лиц с ХОБЛ	2869	2788	2721	2913	3180
Заболеваемость ХОБЛ, впервые выявленные случаи	445	226	266	310	496
Доля ХОБЛ в БОД, %	0,99	0,88	0,91	0,93	1,02

Таблица 3 – Прямые медицинские затраты в АО, связанные с ХОБЛ за период 2015–2019 гг.

Стационарная помощь больным ХОБЛ за 5 лет (2015–2019 гг.)					
Показатель	2015	2016	2017	2018	2019
Количество госпитализаций	1121	1365	1699	1671	1818
Количество койко-дней, всего	10089	12285	16141	15039	16362
Средняя длительность лечения, койко-дней	9,0	9,0	9,5	9,0	9,0
Затраты на госпитализацию, млн. рублей	16,74	20,67	22,97	25,09	32,22
Амбулаторная помощь больным ХОБЛ за 5 лет (2015–2019 гг.)					
Количество посещений с профилактическими и иными целями	2656	2419	2554	2596	3333
Количество обращений по поводу заболеваний	2737	2445	2163	1965	1595
Количество госпитализаций в дневной стационар	165	185	174	144	117
Затраты на амбулаторную помощь, млн. рублей	4,66	3,48	2,91	3,13	3,17
Скорая медицинская помощь (СМП+НМП) больным ХОБЛ за 5 лет (2015–2019 гг.)					
Количество вызовов скорой медицинской помощи	1844	2013	1830	1994	2031
Количество случаев неотложной медицинской помощи	554	951	868	844	722
Затраты на скорую медицинскую и неотложную помощь, млн. рублей	3,43	3,98	3,71	4,71	4,99
Суммарный итог прямых медицинских затрат					
Прямые медицинские затраты на ХОБЛ, млн. рублей	24,83	28,14	29,60	32,94	40,39
Доля затрат на стационарную помощь, %	67,4	73,5	77,6	76,2	79,8
Доля затрат на амбулаторную помощь, %	18,8	12,4	9,8	9,5	7,8
Доля затрат на скорую медицинскую и неотложную помощь, %	13,8	14,1	12,5	14,3	12,4

Таблица 4 – Количество инвалидов по причине ХОБЛ и прямые немедицинские затраты за 5 лет (2015–2019 гг.) в АО

Группа инвалидности	Количество инвалидов ХОБЛ				
	2015	2016	2017	2018	2019
I	0	0	0	2	0
II	5	5	5	11	10
III	27	15	19	14	14
Всего	32	20	24	27	24
Количество инвалидов по причине БОД	201	153	142	130	142
Доля инвалидов по причине ХОБЛ в БОД, %	15,9	13	16,9	20,7	16,9
Затраты на пособия по инвалидности, млн. рублей	4,28	3,05	5,43	4,87	4,48

Таблица 5 – Структура смертности по причине БОД и ХОБЛ за 2015–2019 гг. в АО

Годы		2015	2016	2017	2018	2019
Умершие от всех болезней	м	6418	6340	5838	5893	5780
	ж	6119	5889	5782	5841	5646
Всего		12537	12229	11620	11734	11426
Умершие по причине БОД	м	291	271	253	273	291
	ж	139	114	116	144	123
Всего		430	385	369	417	414
Умершие по причине ХОБЛ	м	48	46	43	52	58
	ж	10	10	11	11	15
Всего		58	56	54	63	73
Доля умерших от ХОБЛ в БОД, %		13,5	14,5	14,6	15,1	17,6
Относительный показатель смертности среди больных ХОБЛ, %		2,0	2,0	2,0	2,2	2,3

Таблица 6 – Возрастная структура смертности от ХОБЛ и ПГПЖ за 2015–2019 гг. по АО

Годы	Возраст		до 69 лет		с 70 лет		ПГПЖ
	n	%	n	%	n	%	
2015	35	60%	23	40%			500
2016	42	75%	14	25%			556
2017	24	44%	30	56%			274
2018	32	51%	31	49%			321
2019	37	51%	36	49%			396
Среднее	34,0 ±6,7	56%±12%	26,8±8,5	44%±12%			409,4±118,4

Таблица 7 – Экономическое бремя ХОБЛ в АО за период 2015–2019 гг.

Тип затрат	2015	2016	2017	2018	2019	За 5 лет
Прямые затраты на ХОБЛ, млн. рублей	29,12	31,19	35,03	37,81	44,87	178,02
Непрямые затраты в связи с преждевременной смертью по причине ХОБЛ, млн. рублей	102,63	124,94	82,63	118,65	150,24	579,09
Всего потерь и затрат по причине ХОБЛ, млн. рублей	131,75	156,12	117,66	156,46	195,11	757,11
Доля в ВРП, %	0,04	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенный анализ показал рост заболеваемости БОД с 2015 года к 2019 на 7,2%. Также увеличилось количество пациентов ХОБЛ в исследуемый период на 10,8%. Наибольшую долю ХОБЛ в БОД составляла в 2019 году – 1,02% (табл. 2).

За пятилетний период отмечался прирост госпитализаций пациентов с ХОБЛ на 62,2%, с наибольшим

его значением в 1818 случаев в 2019 году. Количество койко-дней, проведенных пациентами с ХОБЛ в круглосуточном стационаре за анализируемый период, при относительно одинаковой средней длительности лечения каждого пациента, также увеличилось на 62,2%. Фактические затраты на стационарную помощь больным ХОБЛ за исследуемый период выросли на 92,5% (табл. 3).

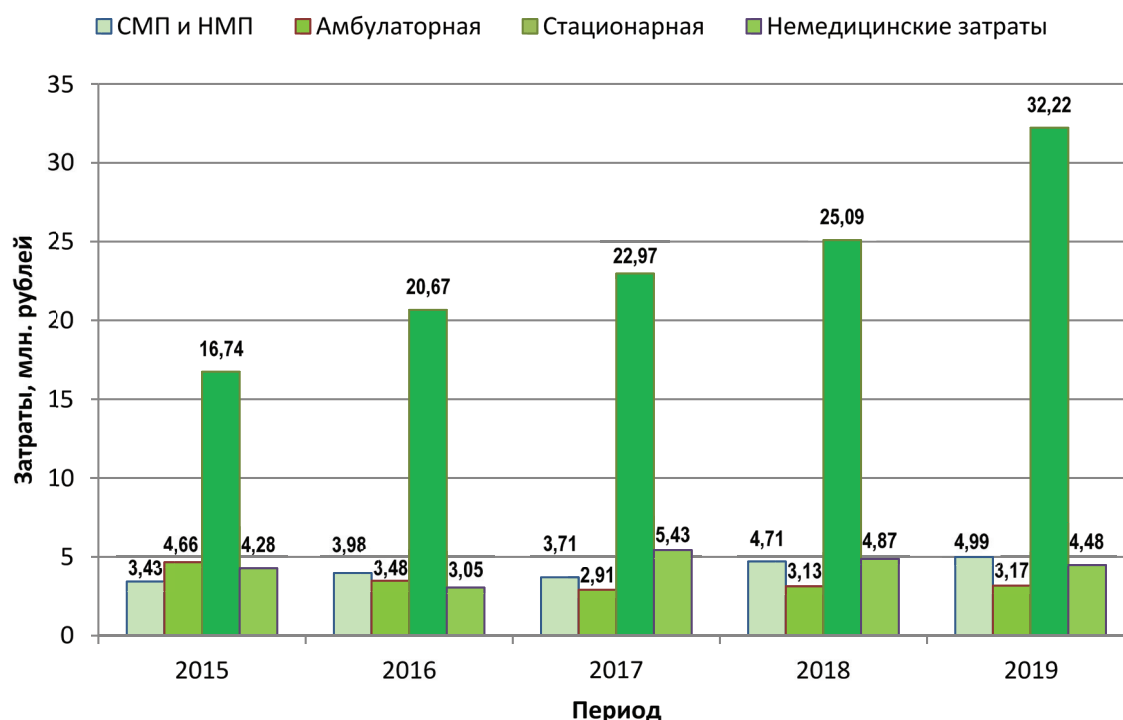


Рисунок 1 – Структура прямых затрат на ХОБЛ за пятилетний период (2015–2019 гг.) в Астраханской области

Экономическое бремя ХОБЛ в АО за период 2015–2019 гг.

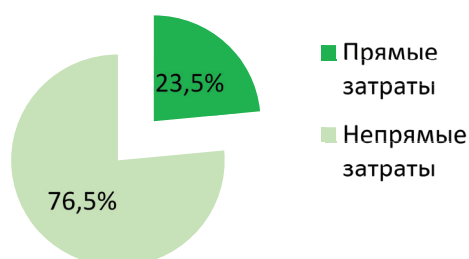


Рисунок 2 – Структура экономического бремени ХОБЛ в Астраханской области за период 2015–2019 гг.

В расчете прямых медицинских затрат государства на амбулаторную помощь больным ХОБЛ учитывались следующие показатели: количество посещений пациентов с профилактическими и иными целями; количество обращений по поводу заболевания; количество госпитализаций в дневной стационар. За исследуемый период для показателя «количества посещений с профилактическими целями» отмечался прирост на 25,5%, в то время как «обращения по поводу заболеваний» и «количество госпитализаций в дневной стационар» снизились на 41,7% и 29% соответственно. В этой связи прямые медицинские затраты на амбулаторную помощь больным

ХОБЛ за исследуемый период снизились на 31,9%, составив в 2019 году 3,17 млн. рублей (табл. 3).

За исследуемый период отмечается рост количества вызовов СМП и оказания НМП больным ХОБЛ на 10,1% и 30,3% соответственно. Это способствовало увеличению затрат на СМП и НМП за период 2015–2019 гг. на 45,5%, и в денежном эквиваленте составило 4,99 млн. рублей за 2019 год (табл. 3).

Прямые медицинские затраты на лечение больных ХОБЛ увеличились за пятилетний период на 62,7% и в 2019 году составили 40,39 млн. рублей. Анализируя структуру прямых медицинских затрат, связанных с ХОБЛ в АО за исследуемый период (табл. 3), можно отметить, что наибольшая доля затрат на стационарную помощь пациентам с ХОБЛ пришлось на 2019 год (79,8% от прямых медицинских затрат), доля затрат на амбулаторную помощь преобладала в 2015 году (18,8% от прямых медицинских затрат), а доля затрат на СМП и НМП была наибольшей в 2018 году (14,3% от прямых медицинских затрат).

В расчете прямых немедицинских затрат учитывались затраты на пособия по инвалидности за каждый исследуемый год. В таблице 4 представлено количество инвалидов по причине ХОБЛ и БОД по группам инвалидности. Количество инвалидов по причине ХОБЛ в период 2015–2019 гг. уменьшилось с 32 человек до 24, количество инвалидов по причине БОД также уменьшилось с 201 человека до 142, однако доля инвалидов по причине ХОБЛ в БОД за данный период выросла на 1%. При анализе прямых

немедицинских затрат, связанных с выплатой пособий по инвалидности, отмечается прирост на 5,1% к 2019 году, в тоже время наибольший показатель затрат приходится на 2017 год, который в денежном эквиваленте составляет 5,43 млн рублей.

Структура прямых затрат на ХОБЛ в АО за исследуемый период представлена на рисунке 1. Как видно, основную долю прямых затрат составляли затраты на стационарную помощь.

Непрямые потери в экономике, были проанализированы на основе преждевременной смерти лиц экономически активного возраста. Как видно из таблицы 5, за период 2015–2019 гг. всего по причине ХОБЛ умерло 304 человека (217 мужчин и 87 женщин). Отмечается прирост абсолютного количества смертей по причине ХОБЛ, составивший 25,9% за пятилетний период наблюдения. Также следует отметить рост доли смертей по причине ХОБЛ от количества смертей по причине БОД, который за пятилетний период с 13,5% увеличился до 17,6%. При этом относительный показатель смертности среди больных ХОБЛ оставался относительно стабильным, в связи с увеличением количества случаев ХОБЛ, и в среднем составил $2,1 \pm 0,13\%$.

Вследствие ХОБЛ за весь исследуемый период было потеряно 2047 лет ПГПЖ в экономически активном возрасте. В частности, наибольшее количество лет (500 лет) ПГПЖ было потеряно в 2015 году, а наименьшее (274 лет) в 2017 году. Данный факт связан с тем, что в 2015 г. 60% пациентов умерло в экономически активном возрасте (до 69 лет), а в 2017 г. их количество уменьшилось до 44% и больные ХОБЛ стали умирать в более позднем возрасте (табл. 6).

Суммарный объем потерь и затрат за пятилетний период наблюдения составил 757,1 млн. рублей, что эквивалентно 0,03% от ВРП Астраханской области. В структуре основного ущерба от ХОБЛ преобладают непрямые потери в экономике, связанные с преждевременной смертью лиц трудоспособного возраста, которые в экономическом эквиваленте за пятилетний период наблюдения составили 579,09 млн. рублей (76,5% от всех потерь и затрат). Общее количество прямых затрат за исследуемый период составило 178,02 млн. рублей (23,5% от всех потерь и затрат) (табл. 7; Рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

ХОБЛ является причиной колоссальных затрат в системе здравоохранения государств всего мира. По данным исследований из различных стран, преобладающую долю затрат на ХОБЛ занимают прямые затраты государства, связанные с госпитализацией пациентов в период обострений [12–15]. Эти затраты увеличиваются с ростом тяжести обострений ХОБЛ, требующих оказания неотложной помощи, более длительного пребывания в стационарах или отделениях интенсивной терапии [16]. Недавние исследования экономических затрат в азиатских странах подтвердили, что эти результаты являются универсальными. Однако бремя

хронических заболеваний, таких как ХОБЛ, представляет собой особую проблему в странах с низким уровнем дохода, где ресурсы здравоохранения традиционно направлены на эпизодическую борьбу с острыми заболеваниями, особенно инфекционными, и не приспособлены для лечения хронических заболеваний [14]. Тенденция увеличения затрат в зависимости от степени тяжести ХОБЛ была отмечена в исследованиях ученых Италии [17] и Великобритании [18]. В США регулярно проводятся экономические исследования по определению бремени ХОБЛ. В исследовании 2010 года прямые затраты на ХОБЛ составили 32 млрд. долларов, а непрямые – 20,4 млрд. долларов [19]. Другое исследование, включавшее в себя оценку общих затрат на ХОБЛ в 2010 г. и прогнозируемых медицинских расходов до 2020 г., показало, что экономический ущерб от ХОБЛ, составил 36 млрд. долларов в год. Из них прямые медицинские затраты, связанные с ХОБЛ и ее последствиями, были оценены в 32,1 миллиарда долларов, а расходы, связанные с потерей 16,4 млн. рабочих дней составили 3,9 миллиарда долларов [20]. В Великобритании ущерб от ХОБЛ составил 1,9 млрд. фунтов стерлингов [21]. Однако в исследовании 2016 года, проведенного в 12 странах (США, Великобритания, Германия, Италия и др.), было показано, что непрямые затраты в несколько раз превышали прямые, что отражает скрытый характер экономического бремени, связанного со снижением производительности труда [22]. Потери производительности труда из-за прогулов на работе и преждевременного выхода на пенсию являются ключевыми факторами более высоких косвенных затрат [23]. Определение непрямых затрат, связанных с ХОБЛ, может быть сложной задачей [24], но очевидно, что их учет будет способствовать выявлению истинного социально-экономического бремени ХОБЛ.

В исследовании Концевой А.В. с соавторами [11], также показано преобладание непрямых потерь, связанных со смертью пациентов ХОБЛ в трудоспособном возрасте. Подобные результаты были получены в настоящем исследовании бремени ХОБЛ по Астраханскому региону за 5-летний период, в котором непрямые затраты значительно превышали прямые (Рис. 2).

В структуре прямых медицинских затрат отмечается рост затрат на стационарную помощь, СМП и НМП с одновременным уменьшением затрат на амбулаторную помощь, связанных со снижением обращений по поводу заболевания и госпитализациями в дневной стационар. Это свидетельствует о росте частоты и тяжести течения обострений ХОБЛ, что косвенно приводит к большим затратам на лечение этих обострений в госпитальных условиях. Снижение же затрат на амбулаторную помощь требует ее оптимизации, так как она экономически менее затратна чем стационарная помощь и, поэтому обоснованным является возможное увеличение инвестиций ресурсов здравоохранения в лечение и профилактику данного заболевания.

Ограничения настоящего исследования

В исследование не были включены затраты на медикаментозную помощь на амбулаторном этапе лечения. При расчете непрямых затрат не учитывались затраты, связанные с ВН и первичным выходом на инвалидность по причине ХОБЛ. Согласно методологии расчета экономических потерь, по причине преждевременной смерти, расчет проводился с учетом количества умерших по возрасту (одногодичные группы) и полу. Однако, в связи с предоставлением статистических данных по пятилетним возрастным группам, было принято решение проводить расчет экономических потерь по верхнему пределу пятилетней возрастной группы (Пример: группа 45–49 – использовано 49 лет), что вероятно занижает результат общих экономических потерь.

В связи с наличием информации о количестве трудоспособного населения по возрастным группам и полу только за 2018 и 2019 гг., при расчете непрямых затрат для предыдущих годов были использованы средние значения 2018 и 2019 гг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые была проведена оценка влияния экономического бремени ХОБЛ на региональный бюджет Астраханской области за период 2015–2019 гг. Экономически ущерб от ХОБЛ в АО за данный период составил 757,11 млн. рублей, что эквивалентно 0,03% от ВРП за исследуемый период. В

структуре ущерба преобладают потери, связанные с преждевременной смертью лиц трудоспособного возраста, составившие 579,09 млн. рублей. Прямые затраты (медицинские и немедицинские) суммарно составили 178,02 млн. рублей. В структуре прямых медицинских затрат преобладают затраты на стационарную помощь.

Беря во внимание факт наличия неучтенных расходов связанных с ВН, первичным выходом на инвалидность и др. факторов, являющихся ограничением данного исследования, актуальным представляется проведение дальнейшего анализа экономического бремени ХОБЛ, который будет способствовать наиболее полной оценке затрат на это заболевание. Также очень важно руководителям регионального здравоохранения уделить внимание разработке и развитию мер, направленных на профилактику возникновения и снижения обострений ХОБЛ. Для этого необходимо увеличить инвестиции на лечение, совершенствовать возможности амбулаторного звена. Поддерживающая медикаментозная терапия ХОБЛ на амбулаторном этапе позволит «контролировать» течение болезни, уменьшая число госпитализаций – самого затратного варианта лечения. Кроме того, необходимо стимулировать охват пневмококковой вакцинацией этой категории хронических больных, что будет способствовать снижению обострений и существенно уменьшит затраты на госпитализацию.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Орлова — сбор материала, написание текста, редактирование;

А.Р. Умерова — написание текста и редактирование; И.П. Дорфман — сбор материала и редактирование;

М.А. Орлов — написание текста и редактирование; М.А. Абдуллаев — написание текста и составление библиографического списка. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Iheanacho I., Zhang S., King D., Rizzo M., Ismail A.S. Economic Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): A Systematic Literature Review // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* — 2020. — Vol. 15. — P. 439–460. DOI: 10.2147/COPD.S234942.
2. Кузьмичев Б.Ю., Воронина Л.П., Тарасочкина Д.С., Полунина О.С., Прокофьева Т.В., Липницкая Е.А., Полунина Е.А. Гипергомоцистеинемия как фактор риска осложненного течения инфаркта миокарда на фоне хронической обструктивной болезни легких // *Астраханский медицинский журнал.* — 2019. — Т. 14, № 3. — С. 79–87. DOI: 10.17021/2019.14.3.79.87.
3. Blanco I., Diego I., Bueno P., Fernández E., Casas-Maldonado F., Esquinas C., Soriano J.B., Miravitlles M. Geographical distribution of COPD prevalence in Europe, estimated by an inverse distance weighting interpolation technique // *International journal of chronic obstructive pulmonary disease.* — 2017. — Vol. 13. — P. 57–67. DOI: 10.2147/COPD.S150853.
4. Chuchalin A.G., Khaltaev N., Antonov N.S., Galkin D.V., Manakov L.G., Antonini P., Murphy M., Solodovnikov A.G., Bousquet J., Pereira M.H., Demko I.V. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation // *International journal of chronic obstructive pulmonary disease.* — 2014. — Vol. 9. — P. 963–974. DOI: 10.2147/COPD.S67283.
5. ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения). 10 ведущих причин смерти в мире. 2019. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
6. Li X., Zhou Y., Chen S., Zheng J., Zhong N., Ran P. Early intervention with tiotropium in Chinese patients with GOLD stages I–II chronic obstructive pulmonary disease

- (Tie-COPD) study protocol for a multicentre, double-blinded, randomised, controlled trial // *Br. Med. J. Open.* – 2014. – Vol. 4, No.2. – e003991. DOI: 10.1136/bmjopen-2013-003991.
7. Srivastava K., Thakur D., Sharma S., Puneekar Y.S. Systematic review of humanistic and economic burden of symptomatic chronic obstructive pulmonary disease // *Pharmaco Economics.* – 2015. – Vol. 33, No.5. – P. 467–488. DOI: 10.1007/s40273-015-0252-4.
 8. Mannino D.M., Higuchi K., Yu T.C., Zhou H., Li Y., Tian H., Suh K. Economic burden of chronic obstructive pulmonary disease by presence of comorbidities // *Chest.* – 2015. – Vol. 148. – P. 138–50. DOI: 10.1378/chest.14-2434.
 9. European Respiratory Society. Lung health in Europe: a better understanding of lung disease and respiratory care in Europe facts & figures. 2014. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ersnet.org/>.
 10. Крысанов И.С. Анализ стоимости хронической обструктивной болезни лёгких в Российской Федерации // *Качественная клиническая практика.* – 2014. – № 2. – С. 51–57.
 11. Концевая А.В., Муканеева Д.К., Баланова Ю.А., Худяков М.Б., Драпкина О.М. Экономический ущерб от болезней органов дыхания и хронической обструктивной болезни легких в Российской Федерации в 2016 году // *Пульмонология.* – 2019. – Т. 29, №2. – С. 159–166. DOI: 10.18093/0869-0189-2019-29-2-159-166.
 12. Ehteshami-Afshar S., FitzGerald J.M., Doyle-Waters M.M., Sadatsafavi M. The global economic burden of asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2016. – Vol. 20, No.1. – P. 11–23. DOI: 10.5588/ijtld.15.0472.
 13. Anees Ur. Rehman, Ahmad Hassali M.A., Muhammad S.A., Shah S., Abbas S., Hyder Ali I.A.B., Salman A. The economic burden of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the USA, Europe, and Asia: results from a systematic review of the literature // *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* – 2020. – Vol. 20, No.6. – P. 661–672. DOI: 10.1080/14737167.2020.1678385.
 14. Stafyla E., Geitona M., Kerenidi T., Economou A., Daniil Z., Gourgoulakis K.I. The annual direct costs of stable COPD in Greece // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2018. – Vol. 13. – P. 309–315. DOI: 10.2147/COPD.S148051.
 15. Viegi G., Maio S., Fasola S., Baldacci S. Global Burden of Chronic Respiratory Diseases // *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* – 2020. – Vol. 33, No.4. – P. 171–177. DOI: 10.1089/jamp.2019.1576.
 16. Dhamane A.D., Witt E.A., Su J. Associations between COPD severity and work productivity, health-related quality of life, and health care resource use: a cross-sectional analysis of national survey data // *J Occup Environ Med.* – 2016. – Vol. 58, No.6. – P. 191–197. DOI: 10.1097/JOM.0000000000000735.
 17. Vitacca M., Bianchi L., Bazzia A., Clini E.M. Advanced COPD patients under home mechanical ventilation and/or long term oxygen therapy: italian healthcare costs // *Monaldi Arch Chest Dis.* – 2011. – Vol. 75, No.4. – P. 207–214. DOI: 10.4081/monaldi.2011.208.
 18. Puneekar Y.S., Wurst K., Shukla A. Resource use and costs up to two years post diagnosis among newly diagnosed COPD patients in the UK primary care setting: a retrospective cohort study // *COPD.* – 2015. – Vol. 12, No.3. – P. 267–275. DOI: 10.3109/15412555.2014.933953
 19. Guarascio A.J., Ray S.M., Finch C.K., Self T.H. The clinical and economic burden of chronic obstructive pulmonary disease in the USA. *Clinicoecon // Outcomes Res.* – 2013. – Vol. 5. – P. 235–245. DOI: 10.2147/CEOR.S34321.
 20. Ford E.S., Murphy L.B., Khavjou O., Giles W.H., Holt J.B., Croft J.B. Total and state-specific medical and absenteeism costs of COPD among adults aged ≥ 18 years in the United States for 2010 and projections through 2020 // *Chest.* – 2015. – Vol. 147, No.1. – P. 31–45. DOI: 10.1378/chest.14-0972.
 21. Trueman D., Woodcock F., Hancock E. Estimating the economic burden of respiratory illness in the UK. *British Lung Foundation.* 2017. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.blf.org.uk/policy/economic-burden>.
 22. Foo J., Landis S.H., Maskell J., Oh Y.M., Van Der Molen T., Han M.K., Puneekar Y. Continuing to Confront COPD International Patient Survey: economic impact of COPD in 12 countries // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, No.4. – e0152618. DOI: 10.1371/journal.pone.0152618.
 23. Wacker M.E., Jörres R.A., Schulz H., Heinrich J., Karrasch S., Karch A., Koch A., Peters A., Leidl R., Vogelmeier C., Holle R.; COSYCONET-Consortium. Direct and indirect costs of COPD and its comorbidities: Results from the German COSYCONET study // *Respir Med.* – 2016. – Vol. 111. – P. 39–46. DOI: 10.1016/j.rmed.2015.12.001.
 24. Patel J.G., Nagar S.P., Dalal A.A. Indirect costs in chronic obstructive pulmonary disease: a review of the economic burden on employers and individuals in the United States // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2014. – Vol. 9. – P. 289–300. DOI: 10.2147/COPD.S57157.

АВТОРЫ

Орлова Екатерина Алексеевна – кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой фармакологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-7169-3586. E-mail: eorlova56@mail.ru

Умерова Аделя Равильевна – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой клинической фармакологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России; руководитель территориального органа Росздравнадзора по Астраханской области. ORCID ID: 0000-0002-3129-2443. E-mail: adelya_umerova@mail.ru

Дорфман Инна Петровна – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры клинической фар-

макологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-1561-0592. E-mail: inna1977@inbox.ru

Орлов Михаил Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской реабилитации, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8995-6572. E-mail: orlovdoc56@gmail.com

Абдуллаев Мусалитдин Абсаламович – аспирант кафедры фармакологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-7374-2660. E-mail: abdullaev-musalitdin@mail.ru

УДК 615.281.9



ИЗОЛИКВИРИТИГЕНИН ВЛИЯЕТ НА ФУНКЦИИ ФАГОЦИТОВ И ПОВЫШАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ ПРИ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Е.А. Солёнова, С.И. Павлова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»
428015, Россия, Чувашская Республика, г. Чебоксары, пр-т. Московский, д. 15

E-mail: elensoul@mail.ru

Получено 27.02.2021

Принята к печати 20.04.2021

В данной статье представлены результаты изучения влияния изоликивиритигенина на выживаемость животных в модели стафилококковой инфекции и функции фагоцитов человека и животных.

Цель. Изучить влияние предварительного введения изоликивиритигенина на выживаемость животных на фоне стафилококковой инфекции, а также на функции фагоцитов мышей и человека.

Материалы и методы. Для оценки выживаемости мышей линии Balb/C использовали модель инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923, с построением кривых Каплан-Мейера. Влияние на функции фагоцитов изучали, оценивая пептон-индуцированную миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей Balb/C, поглотительную активность фагоцитов (нейтрофилов и моноцитов) крови человека, а также продукцию ими активных форм кислорода с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Установлено, что предварительное трехкратное внутрибрюшинное введение изоликивиритигенина (30 мг/кг) увеличивает выживаемость мышей Balb/C при стафилококковой инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923. При этом изоликивиритигенин дозозависимо активизирует продукцию активных форм кислорода нейтрофилами и моноцитами крови человека, статистически значимо не подавляя фагоцитарную активность моноцитов и нейтрофилов в отношении флюоресцеинизотиоцианат-меченого *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923, а также пептон-индуцированную миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей.

Заключение. Таким образом, предварительное введение изоликивиритигенина повышает выживаемость мышей при стафилококковой инфекции и увеличивает продукцию активных форм кислорода фагоцитами. Полученные данные могут стать основой для дальнейшего исследования антибактериальных и иммуностроительных эффектов изоликивиритигенина с целью изыскания новых лекарственных средств для лечения стафилококковой инфекции.

Ключевые слова: изоликивиритигенин; *Staphylococcus aureus*; врожденный иммунитет; фагоцитоз; кислородный взрыв; миграция фагоцитов

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДГР 123 – дигидрородамин 123; ДМСО – диметилсульфоксид; ИЛГ – изоликивиритигенин; КОЕ – колониеобразующие единицы; Кона – конканавалин А; НАДФН-оксидаза – никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидаза; НЛ – нейтрофильные ловушки; ФИТЦ – флюоресцеинизотиоцианат; ФМА – форбол-12-миристинат-13-ацетат; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид; OD – оптическая плотность.

ISOLYQUIRITIGENIN AFFECTS PHAGOCYTES FUNCTIONS AND INCREASES MICE SURVIVAL RATE IN STAPHYLOCOCCAL INFECTION

E.A. Solenova, S.I. Pavlova

Chuvash State University n. a. I.N. Ulyanov
15, Moskovsky Ave., Cheboksary, Chuvash Republic, Russia, 428015

E-mail: elensoul@mail.ru

Received 27 Feb 2021

Accepted 20 Apr 2021

Для цитирования: Е.А. Солёнова, С.И. Павлова. Изоликивиритигенин влияет на функции фагоцитов и повышает выживаемость мышей при стафилококковой инфекции. *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):139-148. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-139-148

© Е.А. Солёнова, С.И. Павлова, 2021

For citation: E.A. Solenova, S.I. Pavlova. Isolyquiritigenin affects phagocytes functions and increases mice survival rate in staphylococcal infection. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(2):139-148. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-139-148

The results of studying the effect of isoliquiritigenin on animal survival in the model of staphylococcal infection and the function of human and animal phagocytes are presented in this article.

The aim of the investigation was to study the effect of an isoliquiritigenin preliminary administration on the survival of animals against the background of staphylococcal infection, as well as on the function of phagocytes in mice and humans.

Materials and methods. To assess the survival of Balb/C mice, a model of infection caused by *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923 with the construction of Kaplan-Meier curves, was used. The effect on the phagocytes functions was studied by assessing the peptone-induced migration of phagocytes into the abdominal cavity of Balb/C mice, the absorption activity of phagocytes (neutrophils and monocytes) of human blood, as well as their production of reactive oxygen intermediates (ROIs) using a flow cytometry.

Results. It was found out that a preliminary triple intraperitoneal administration of isoliquiritigenin (30 mg/kg) increases the survival rate of Balb/C mice in staphylococcal infection caused by *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923. At the same time, isoliquiritigenin dose-dependently activates the production of reactive oxygen intermediates by human neutrophils and monocytes without statistically significantly suppressing a phagocytic activity of monocytes and neutrophils against fluorescein isothiocyanate-labeled *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923, as well as peptone-induced migration of phagocytes into the abdominal cavity of mice.

Conclusion. Thus, a preliminary administration of isoliquiritigenin increases the survival rate of mice with staphylococcal infection and increases the production of reactive oxygen intermediates by phagocytes. The data obtained, can become the basis for further research of antibacterial and immunotropic effects of isoliquiritigenin in order to find new drugs for the treatment of staphylococcal infection.

Keywords: isoliquiritigenin; *Staphylococcus aureus*; innate immunity; phagocytosis; oxidative burst; phagocyte migration

List of abbreviations: ROI(s) – reactive oxygen intermediate(s); DHR 123 – dihydrorhodamine 123; DMSO – dimethylsulfoxide; ISL – isoliquiritigenin; CFUs – colony-forming units; ConA – concanavalin A; NADP-oxidase – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; NTs – neutrophil traps; FITC – fluorescein isothiocyanate; PMA – phorbolmyristate acetate; phorbol-12 myristate-13-acetate; MTT – 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; OD – optical density

ВВЕДЕНИЕ

Распознавание и элиминация микробных патогенов макроорганизмом происходит за счет активации врожденного и адаптивного звеньев иммунитета. Врожденный иммунитет предупреждает внедрение микробов в ткани и способен удалить их до включения механизмов приобретенного иммунитета. Врожденные иммунные реакции на патоген практически моментальные и основаны преимущественно на реакциях воспаления и фагоцитоза, тогда как адаптивный иммунный ответ включается лишь через несколько дней (оптимально – 7–14 дней), так как требует пролиферации и дифференцировки лимфоцитов.

Значительная бактериальная нагрузка в модели острой бактериальной инфекции вызывает летальный исход лабораторных животных в течение первых дней наблюдения. Такая модель инфекции позволяет оценить не только антибактериальные эффекты исследуемых соединений, но и его влияние на функции эффекторов врожденного иммунитета [1], среди которых фагоциты играют важнейшую роль.

Полифенольные соединения высших растений (флавоноиды) обладают широким спектром биологической активности, в том числе антимикробными и иммуномодулирующими эффектами [2]. Так, например, парентеральное введение флавоноидов корня солодки повышает резистентность мышей к острой стафилококковой инфекции в таких дозах, которые значимо не влияли на функции эффекторов врожденного иммунитета [3], но предотвращали активацию и пролиферативный ответ лимфоцитов [4]. Из корней солодки выделены десятки различных флавоноидов, одним из основных является изоликвиригенин (ИЛГ). ИЛГ в различных концентрациях проявляет ан-

тибактериальные свойства, влияет на пролиферацию лимфоцитов и секрецию ими цитокинов на ранних этапах иммунного ответа при стафилококковой инфекции у мышей [2].

ЦЕЛЬ. Изучение влияния ИЛГ на функцию человеческих и мышиных фагоцитов, а также его эффективности в модели стафилококковой инфекции у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестируемый агент

В качестве тестируемого вещества использовали ИЛГ (чистота 98%, Xi'An YiyangBio-Tech Co., Китай). В экспериментах использовали раствор ИЛГ в диметилсульфоксиде (ДМСО, Panreac, Испания) так, чтобы *in vitro* конечная концентрация растворителя в опытных образцах не превышала 1%. Учитывая, что МПК ИЛГ в отношении *S. aureus* J49 ATCC 25923 64 мкг/мл [5], для экспериментов *in vitro* использовали ИЛГ в диапазоне концентраций 16–128 мкг/мл. В серии экспериментов *in vivo* маточный раствор ИЛГ в ДМСО разводили в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4, PanEcoLLC, Россия), вводили внутривентрально в объеме 0,5 мл в виде истинного раствора с концентрацией ДМСО не более 5%. Учитывая низкую токсичность и биодоступность ИЛГ [2], в экспериментах *in vivo* ИЛГ вводили внутривентрально в суммарной дозе 30 мг/кг. Контрольным образцам/группам вместо ИЛГ вводили соответствующие объемы/концентрации растворителя.

Бактериальный штамм и условия его культивирования

Культивирование штамма *S. aureus* J49 ATCC 25923 (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицин-

ского применения» Минздрава России (г. Москва, Россия)) осуществляли в бульоне Мюллера-Хинтона (MediCaplus LLS, Россия) при 37°C в стеклянных аэрируемых флаконах. Для экспериментов *in vitro* и *in vivo* из ночной бактериальной культуры, находящейся в средней log-фазе, готовили разведения для культивирования и внутрибрюшинного введения животным. Для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) измеряли оптическую плотность (OD) бактериальной суспензии при 630 нм в микропланшетном фотометре (ImmunoChem 2100, США) с использованием стандарта МакФарланда, исходя из соотношения: 1 оптическая единица OD₆₃₀ = 8,5×10⁸ КОЕ/мл.

Экспериментальные животные

Мыши Balb/C (самцы, 20–22 г, 6–8 недель) были получены от научно-производственного предприятия «Питомник лабораторных животных» Института биологии Российской академии наук (г. Пущино, Россия). Уход за животными и обращение с ними осуществляли в соответствии с принципами ARRIVE [6]. Животные содержались при свободном доступе к воде и пище. Для экспериментов мыши случайным образом распределялись на группы по 8 особей. Выведение из эксперимента осуществляли без наркоза путем декапитации или цервикальной дислокации. При выполнении экспериментов были соблюдены положения Хельсинкской декларации (Бразилия, 2013 г.), протокол данных экспериментов был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» (протокол № 20-04 от 17.04.2020 г.).

Получение крови здоровых добровольцев

Для определения поглотительной активности фагоцитов крови человека и продукции ими активных форм кислорода в день эксперимента производили забор крови в гепаринизированные пробирки у здоровых добровольцев (60 человек) в возрасте 18–25 лет после получения добровольного информированного согласия. Протокол данных экспериментов был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» (протокол № 20-04 от 17.04.2020 г.).

Получение флюоресцеинизотиоцианат-меченого *S. aureus*

Для инактивации *S. aureus* J49 ATCC 25923 осуществляли экспозицию ночной бактериальной культуры на водяной бане при 95°C в течение 30–40 минут, затем центрифугировали (1000 g, 25 мин.) [7]. Убитые осажденные бактерии однократно отмывали карбонатно-бикарбонатным буфером (0,1 М, pH 9,5) и готовили клеточную суспензию с концентрацией бактерий 2×10⁸ микробных тел на 1 мл. К инактивированной бактериальной суспензии добавляли флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), растворенный в ДМСО, из расчета 0,05 мг на 10⁸ бактерий с последующей инкубацией в течение 1 ч. при комнатной темпе-

ратуре без доступа света. Затем инактивированные бактериальные клетки трехкратно отмывали фосфатно-солевым буфером центрифугированием (1000 g, 10 мин.) и готовили разведение взвеси ФИТЦ-меченых бактерий до концентрации 5×10⁸ микробных тел на 1 мл. Аликвоты хранили при температуре –70°C.

Модель инфекции *S. aureus* у мышей

Суспензию *S. aureus* в фосфатно-солевом буфере вводили внутрибрюшинно 10⁹ КОЕ/мышь. День заражения считали нулевым днем эксперимента. Выживание мышей оценивали каждые 6 ч. в первый день; со второго дня и в последующие 20 дней эксперимента – ежедневно. Экспериментальным животным перед заражением вводили ИЛГ (общая доза 30 мг/кг, трехкратно через 4 ч., внутрибрюшинно). В качестве референта животным контрольной группы вводили соответствующие объемы и концентрации растворителя.

Оценка хемотаксиса фагоцитов

Для оценки миграции фагоцитов в брюшную полость руководствовались методикой, предложенной Miyazaki [8]. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы, которые получали: группа 1 (отрицательный контроль) – стерильный фосфатно-солевой буфер трехкратно (0,5 мл, внутрибрюшинно); группа 2 – стерильный раствор пептона в фосфатно-солевом буфере (3% – 3 мл, внутрибрюшинно); группа 3 – трехкратно растворитель (5% – 0,5 мл, внутрибрюшинно), затем – стерильный раствор пептона в фосфатно-солевом буфере (3% – 3 мл, внутрибрюшинно); группа 4 – ИЛГ (внутрибрюшинно, трехкратно), затем стерильный раствор пептона в фосфатно-солевом буфере (3% – 3 мл, внутрибрюшинно). Спустя 24 ч. и 72 ч. животных выводили из эксперимента и внутрибрюшинно вводили по 20 мл фосфатно-солевого-буфера. Полученные после пальпаторного массирования брюшка промывные воды отбирали в пластиковые пробирки для последующего центрифугирования. Осажденные клетки подсчитывали в камере Горяева. После рассчитывали индекс стимуляции как отношение количества клеток в группах, получавших пептон, к числу клеток в группе отрицательного контроля.

Оценка поглотительной активности фагоцитов

Оценку поглотительной активности фагоцитов осуществляли с использованием проточной цитометрии [7]. Для этого к образцам гепаринизированной крови человека добавляли ИЛГ в концентрациях 16–128 мкг/мл. Экспериментальные образцы культивировали 30 минут (t=37°C, ф=100%, CO₂ = 5%). Затем к образцам добавляли ФИТЦ-меченый *S. aureus* и продолжали инкубацию также в течение 30 минут (t=37°C, ф=100%, CO₂=5%). По истечении времени инкубации для лизиса эритроцитов добавляли лизирующий раствор (Backman Coulter, USA) и

инкубировали 10 минут. Образцы анализировали на проточном цитометре Cytomics FC500 (Backman Coulter, USA) и рассчитывали фагоцитарный индекс (количество фагоцитов, поглотивших ФИТЦ-меченные бактерии, к общему числу фагоцитов), а также интенсивность флуоресценции.

Оценка продукции активных форм кислорода фагоцитами

Оценку продукции активных форм кислорода фагоцитами осуществляли с использованием проточной цитометрии [7]. Для постановки теста форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА)-индуцированного «кислородного взрыва» к образцам гепаринизированной крови человека, предварительно инкубированной с ИЛГ в концентрациях 16–128 мкг/мл 30 минут (условия инкубации: $t=37^{\circ}\text{C}$; $\text{ф}=100\%$; $\text{CO}_2=5\%$), добавляли ФМА (0,1 мкг/мл, образцы с активированными фагоцитами) или 0,2% ЭДТА (контрольные, не стимулированные образцы фагоцитов <1% ДМСО) и инкубировали 10 минут. После инкубации к образцам добавляли флуорогенный субстрат дигидрородамин 123 (ДГР 123) и инкубировали еще в течение 10 минут. Лизированные образцы крови анализировали на проточном цитометре Cytomics FC500 (Backman Coulter, USA) определяли процент активированных нейтрофилов и моноцитов, а также показатели спонтанной и стимулированной интенсивности флуоресценции.

Статистический анализ

Все эксперименты были выполнены не менее, чем в трех повторениях. Полученные данные были статистически обработаны с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 8.4.0. Для оценки динамики гибели мышей строили кривые Каплан-Мейера. Полученные результаты подчинялись закону нормального распределения, обрабатывались методами вариационной статистики и представлялись в виде среднего арифметического значения (M) $\pm$ стандартной ошибки среднего (SEM). Достоверность различий между группами в экспериментах определяли по критерию Стьюдента, проводя парное сравнение. Различия считались достоверными при $p<0,05$, где p – уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние ИЛГ на выживаемость мышей Balb/C при заражении *S. Aureus* J49 ATCC 25923

Установлено, что при заражении 10^9 КОЕ/мышь в обеих экспериментальных группах на второй день эксперимента отмечалось начало гибели животных. В контрольной группе смертность нарастала более динамично, и к 4-му дню выживаемость составила лишь $17,0\pm 7,6\%$ (рис. 1). В группе, получавшей предварительные инъекции ИЛГ в дозе 30 мг/кг, выживаемость была достоверно выше и на 7-й день эксперимента составила $67,0\pm 16,5\%$ ($p<0,05$).

Влияние ИЛГ на пептон-индуцированную миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей

Миграцию фагоцитов в брюшную полость оценивали, рассчитывая индекс стимуляции – количество клеток, стимулированных внутрибрюшинной инъекцией пептона, относительно фосфатно-солевого буфера. Индексы стимуляции у мышей, получавших ИЛГ, и контрольных животных, стимулированных пептоном, достоверно не отличались друг от друга (рис. 2). Так, через 24 ч. индекс стимуляции в контрольной группе составлял $2,4\pm 0,1$ против $2,0\pm 0,1$ группы, получавшей ИЛГ; через 72 ч. значения индекса стимуляции характеризовались значениями $1,6\pm 0,1$ (контрольная группа) по сравнению с $1,8\pm 0,1$ (группа, получавшая ИЛГ).

Влияние ИЛГ на поглотительную активность фагоцитов крови человека

Изучение влияния ИЛГ на поглотительную активность фагоцитов проводилось цитофлуориметрическим методом. Было показано, что предварительная обработка фагоцитов ИЛГ *in vitro* не приводит к достоверному изменению процента фагоцитирующих нейтрофилов и моноцитов по сравнению с контролем (табл. 1). В контрольных образцах фагоцитарный индекс у нейтрофилов составил $93,9\pm 6,0\%$, а у моноцитов – $73,9\pm 14,1\%$. В концентрации ИЛГ 128 мкг/мл наблюдалась недостоверная тенденция к снижению фагоцитарного индекса нейтрофилов ($92,5\pm 5,5\%$) и моноцитов ($64,1\pm 13,7\%$). Однако при оценке интенсивности флуоресценции показано, что в сравнении с контролем в образцах с добавлением ИЛГ происходит увеличение доли флуоресцирующих нейтрофилов ($184,8\pm 44,8$ Ед против $145,5\pm 41,1$ Ед) и моноцитов ($58,5\pm 17,2$ Ед против $64,1\pm 18,1$ Ед).

Влияние ИЛГ на продукцию АФК фагоцитами крови человека

Было оценено влияние ИЛГ на продукцию АФК фагоцитами без их активации ФМА (табл. 2). При этом в отсутствии ИЛГ доля флуоресцирующих нейтрофилов ($3,9\pm 1,8\%$) и моноцитов ($3,0\pm 2,0\%$) была очень низкой. По сравнению с контрольными показателями добавление ИЛГ дозозависимо увеличивало долю флуоресцирующих нейтрофилов в концентрациях 128 мкг/мл ($100,0\pm 0,1\%$; $p<0,05$), 64 мкг/мл ($99,6\pm 0,5\%$; $p<0,05$), 16 мкг/мл ($34,7\pm 8,9\%$; $p<0,05$), а в концентрациях 128 мкг/мл ($86,2\pm 11,7\%$; $p<0,05$), 64 мкг/мл ($47,2\pm 18,7\%$; $p<0,05$) – процент флуоресцирующих моноцитов (рис. 3). В то же время интенсивность флуоресценции нейтрофилов достоверно отличалась от показателей контроля ($2,5\pm 0,3$ Ед) в присутствии ИЛГ 128 мкг/мл ($6,6\pm 1,6$ Ед; $p<0,05$), 64 мкг/мл ($3,8\pm 0,2$ Ед; $p<0,05$), а моноцитов – при 128 мкг/мл ($3,0\pm 0,15$ Ед; $p<0,05$).

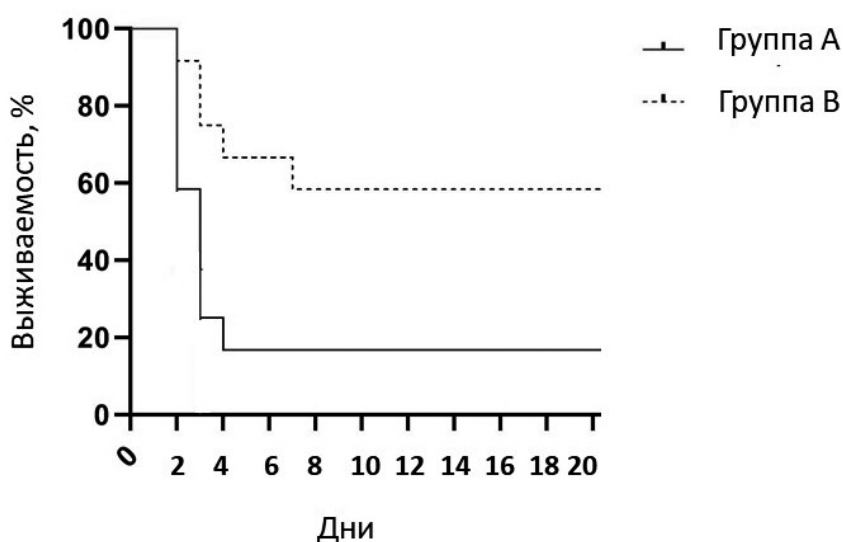


Рисунок 1 – Выживаемость мышей Balb/C, зараженных *S. aureus* J49 ATCC 25923
Примечание: группа А – контроль, 10^9 КОЕ/мышь; группа В – предварительное введение ИЛГ (30 мг/кг), 10^9 КОЕ/мышь

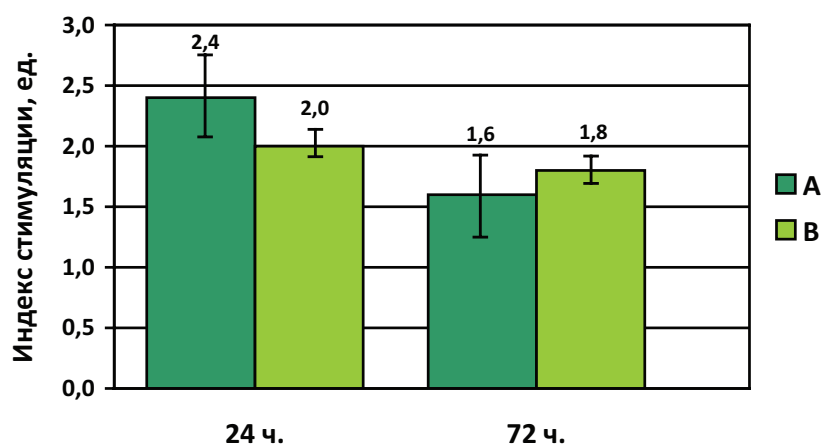


Рисунок 2 – Влияние ИЛГ на миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей Balb/C
Примечание: А – контроль; В – ИЛГ

Таблица 1 – Влияние ИЛГ на показатели фагоцитарного индекса (%) и интенсивности флуоресценции (ЕД) нейтрофилов и моноцитов крови человека

Фагоциты		Контроль	128 мкг/мл	64 мкг/мл	16 мкг/мл
Нейтрофилы	%	93,9±6,0	92,5±5,5	92,1±7,6	95,6±2,4
	Ед.	145,5±41,1	184,8±44,8 *	129,1±55,6	118,1±40,5
Моноциты	%	73,9±14,1	64,1±13,7	71,4±11,2	71,4±11,4
	Ед.	64,1±18,1	58,5±17,2 *	51,4±21,9	45,4±15,4

Примечание: * – достоверные изменения при $p < 0,05$

Таблица 2 – Влияние ИЛГ на продукцию АФК нейтрофилами и макрофагами/моноцитами крови человека

		Контроль		ИЛГ		
				128 мкг/мл	64 мкг/мл	16 мкг/мл
Нейтрофилы	Активация ФМА	%	93,3±14,9	100,0±0,1	99,9±0,1	99,5±0,4
		Ед	11,3±3,7	15,8±3,0 *	14,8±4,2 *	14,1±5,2
	Без активации ФМА	%	3,9±1,8	100,0±0,1 *	99,6±0,5 *	34,7±8,9 *
		Ед	2,5±0,3	6,6±1,6 *	3,8±0,2 *	2,1±0,2
Моноциты	Активация ФМА	%	44,5±27,2	97,8±1,8 *	88,1±7,8 *	62,7±17,7
		Ед	3,4±0,7	6,0±1,3 *	4,6±1,1*	4,0±1,0
	Без активации ФМА	%	3,0±2,0	86,2±11,7 *	47,2±18,7 *	4,6±2,4
		Ед	2,3±0,5	3,0±0,15 *	2,3±0,2	2,4±0,7

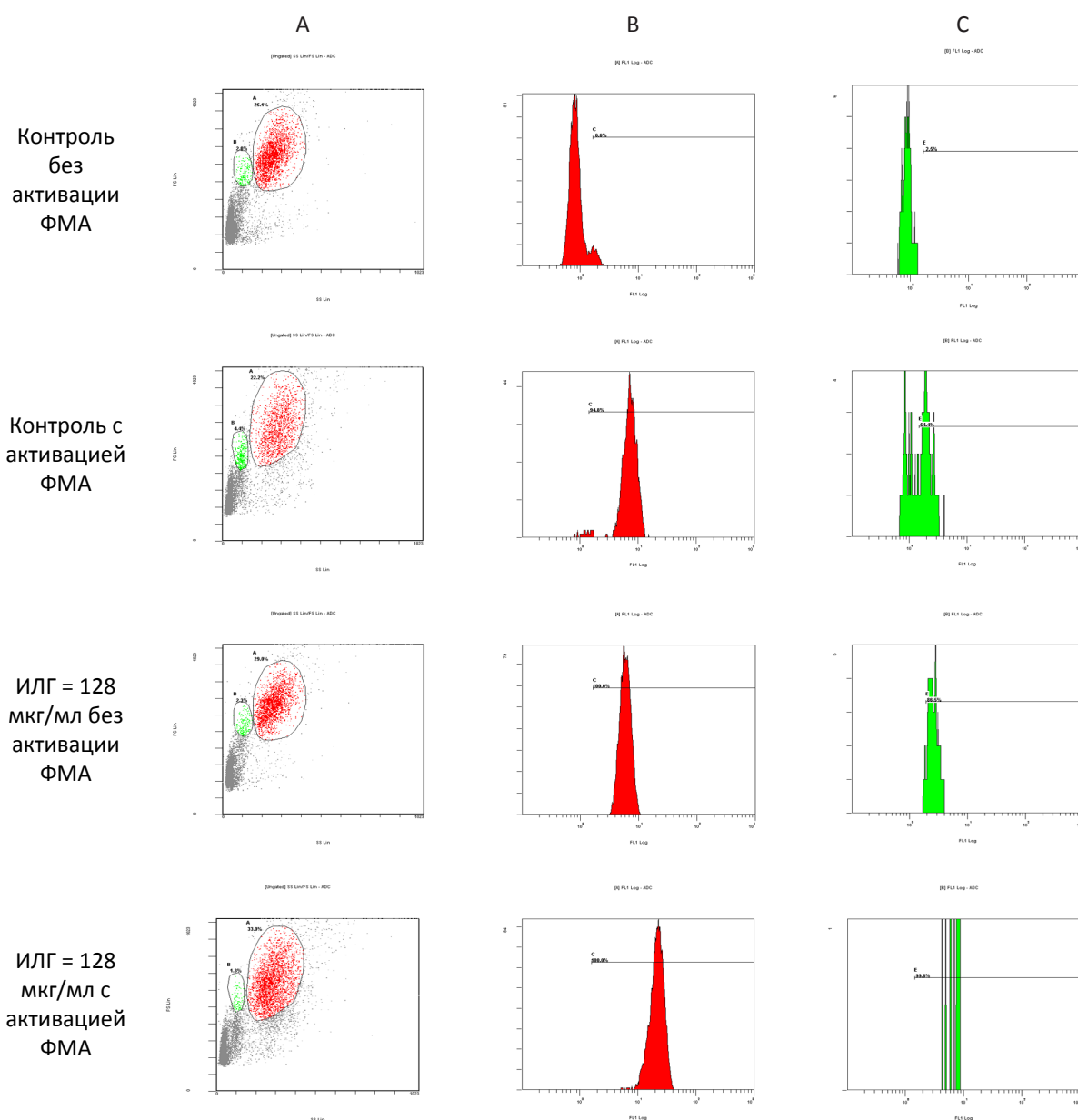
Примечание: Ед – единицы интенсивности флуоресценции; * – достоверные изменения при $p < 0,05$ 

Рисунок 3 – Распределение клеток крови по боковому светорассеянию (А) и гистограммы флуоресценции, соответствующие гейтам нейтрофилов (красный) и макрофагов/моноцитов (зеленый) (В, С)

Также было изучено влияние ИЛГ на способность человеческих фагоцитов продуцировать АФК в ответ на активатор протеинкиназы С – ФМА. В контрольных образцах количество нейтрофилов, продуцировавших АФК, составило $93,3 \pm 14,9\%$, моноцитов – $44,5 \pm 27,2\%$ (табл. 2). В присутствии ИЛГ в концентрациях 128 мкг/мл, 64 мкг/мл и 16 мкг/мл наблюдалась незначимая тенденция к дозозависимому увеличению доли флуоресцирующих нейтрофилов: $100,0 \pm 0,1\%$ ($p=0,07$), $99,9 \pm 0,1\%$ ($p=0,07$) и $99,5 \pm 0,4\%$ ($p=0,08$) соответственно (рис. 2). По сравнению с контрольными образцами ($11,3 \pm 3,7$ Ед) в присутствии ИЛГ в концентрациях 128 мкг/мл ($15,8 \pm 3,0$ Ед, $p<0,05$) и 64 мкг/мл ($14,8 \pm 4,2$ Ед, $p<0,05$) отмечено достоверное увеличение интенсивности флуоресценции, а в концентрации 16 мкг/мл – наблюдалась лишь тенденция к таковому ($14,1 \pm 5,2$ Ед, $p=0,09$). При оценке функций моноцитов в присутствии ИЛГ в концентрациях 128 мкг/мл ($97,8 \pm 1,8\%$, $p<0,05$), 64 мкг/мл ($88,1 \pm 7,8\%$, $p<0,05$) наблюдалась дозозависимое значимое увеличение количества флуоресцирующих клеток по сравнению с контрольными значениями ($44,5 \pm 27,2$ Ед). Данные по повышению доли флуоресцирующих моноцитов при экспозиции с ИЛГ в концентрациях 64–128 мкг/мл были сопоставимы с дозозависимым увеличением степени их флуоресценции (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено изучению влияния ИЛГ на некоторые механизмы врожденного иммунитета (функции фагоцитов) как возможных факторов, влияющих на выживаемость в ранние сроки бактериальной инфекции. Парентеральное введение ИЛГ до заражения мышей повышало выживаемость экспериментальных животных в модели стафилококкового сепсиса и септического шока, когда на фоне выраженной бактериальной нагрузки $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мышь животные погибали в первые 24–48 ч [5]. В настоящем эксперименте, при инфицирующей дозе 10^9 КОЕ/мышь, динамика гибели отличалась (животные погибали позже), но предварительное внутрибрюшинное введение ИЛГ также было эффективным и увеличивало продолжительность жизни мышей линии Balb/C.

В экспериментах установлено, что ИЛГ обладает антибактериальной активностью [5]. Однако антибактериальная активность проявляется при достаточно больших концентрациях (64 мкг/мл), вероятность достижения и поддержания которой в биологических жидкостях/очагах инфекции в условиях *in vivo* низкая, тем более что ИЛГ имеет довольно короткий период полувыведения [9, 10]. Учитывая эти особенности, в настоящей работе был сделан акцент на изучение влияния ИЛГ на функции фагоцитов.

Фагоциты представляют собой эффекторные клетки врожденного иммунитета, осуществляющие

первую линию защиты при инвазии инфекционных патогенов. Основными этапами фагоцитарных реакций являются хемотаксис, поглощение, киллинг и переваривание инфекционного патогена. Влияние на хемотаксис было изучено в модели, индуцированной пептоном, миграции фагоцитов в брюшную полость мышей [8]. Выявлено, что ИЛГ не оказывает подавляющего влияния на миграцию фагоцитов как через 24 ч. (хемотаксис преимущественно нейтрофилов), так и через 72 ч. (хемотаксис преимущественно макрофагов).

Поглощение фагоцитами инфекционного агента реализуется за счет таких механизмов, как: сближение фагоцита и патогена; установление контакта; подготовка к погружению; обволакивание патогена; замыкание мембраны; поглощение объекта. Данные этапы суммарно оценивались с применением цитометрического метода и ФИТЦ-меченых бактерий. В качестве бактериального агента для фагоцитоза использовали коллекционный штамм *S. aureus* J49 ATCC 25923. В исследуемом диапазоне концентраций (16–128 мкг/мл) ИЛГ не снижал долю нейтрофилов и моноцитов, способных поглощать бактериальные клетки. Однако интенсивность флуоресценции моноцитов при экспозиции с некоторыми концентрациями ИЛГ имела тенденцию к снижению. Но данный факт не является значимым, так как в больших концентрациях ИЛГ способен реализовывать прямую антибактериальную активность.

Таким образом, внутрибрюшинное введение ИЛГ в суммарной дозе 30 мг/кг значимо не влияет на хемотаксис нейтрофилов и макрофагов в ответ на стандартный активатор миграции пептон у мышей Balb/C, а также в диапазоне концентраций 16–128 мкг/мл не ингибирует поглотительную функцию нейтрофилов и моноцитов крови человека в отношении штамма *S. aureus* J49 ATCC 25923. Следует отметить, что в указанных концентрациях ИЛГ выражено ингибирует пролиферацию митоген-активированных Т-лимфоцитов [5], что свидетельствует о том, что ИЛГ проявляет селективные супрессивные свойства в отношении эффекторов адаптивного иммунитета, не затрагивая основные врожденные иммунные реакции фагоцитов.

Киллинг и переваривание фагоцитами бактериальных патогенов происходят за счет кислородного (продукция АФК) и азотного метаболизма. АФК – группа высокореактивных кислородсодержащих химических веществ, связанных не только с патологическими (хроническое воспаление, патологическая пролиферация клеток) [11], но и с физиологическими процессами (выживание, рост, пролиферация и дифференциация клеток, иммунный ответ) [12]. В частности, важным звеном в реализации врожденных иммунных реакций является запуск массивной продукции АФК («кислородный взрыв») в фагоцитах. Иницирует начало «кислородного взрыва»

никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидаза (НАДФН-оксидаза) (в фагоцитах основной изоформой является НАДФН-оксидаза 2 типа) [13], активация которой может происходить в сигнальном каскаде, связанном с протеинкиназой C, форболовыми эфирами (например, ФМА) [14]. В связи с этим влияние ИЛГ на переваривающую способность фагоцитов оценивали по продукции АФК нейтрофилами и моноцитами с применением флуорогенного субстрата ДГР 123, который взаимодействует с АФК с образованием флуорохрома родамина 123. Интенсивность «кислородного взрыва» оценивалась при помощи проточной цитометрии. В ходе экспериментов установлено, что добавление ИЛГ (16–128 мкг/мл) даже к не активированным ФМА клеткам дозозависимо увеличивало долю флуоресцирующих нейтрофилов и моноцитов, а также интенсивность флуоресценции по сравнению с контрольными пробами, что свидетельствует о накоплении АФК в фагоцитах. Добавление ИЛГ к ФМА-активированным фагоцитам также увеличивало продукцию АФК в сравнении с ФМА-активацией без экспозиции с ИЛГ. При этом наблюдались суммационные эффекты по показателю интенсивности флуоресценции. Так, сумма интенсивности флуоресценции ФМА-активированных нейтрофилов ($11,3 \pm 3,7$ Ед) и нейтрофилов, не активированных ФМА, но инкубированных с ИЛГ (128 мкг/мл) ($6,6 \pm 1,6$ Ед), сопоставима со значениями интенсивности флуоресценции ФМА-активированных нейтрофилов, инкубированных с ИЛГ в дозе 128 мкг/мл ($15,8 \pm 3,0$ Ед). Аналогичная суммация эффекта выявлена в образцах моноцитов.

С другой стороны, флавоноиды хорошо известны как антиоксиданты, которые могут снижать продукцию АФК фагоцитами. Так, например, ресвератрол подавляет активность НАДФН-оксидазы, миелопероксидазы и, как следствие, образование хлорноватистой кислоты [15]. АФК участвуют в реализации одного из механизмов врожденного иммунного ответа – формировании «нейтрофильных ловушек» (НЛ) [16]. Активированные бактериями (*S. aureus* и *E. coli*) либо химическими веществами (ФМА) нейтрофилы производят АФК и образуют нейтрофильные внеклеточные конгломераты, которые направлены на сдерживание бактериального диссеминирования из очага инфекции [17]. Однако имеются данные, что чрезмерная активация

НЛ ухудшает микроциркуляцию в очаге воспаления [18, 19]. Продemonстрировано, что флавоноиды (эпикатехин, катехин-гидрат и тригидрат рутина, а также лютеолин, кемпферол) подавляют образование АФК-зависимых НЛ [20, 21], а ресвератрол улучшает функции легких во время острых инфекций дыхательных путей или хронических воспалительных заболеваний легких [22].

В некоторых биологических системах, а также в больших концентрациях природные полифенолы могут демонстрировать прооксидантные свойства [23–26]. Так, ИЛГ повышает продукцию АФК в различных опухолевых клетках [27], что рассматривают как один из его противоопухолевых механизмов. По-видимому, аналогичные механизмы продукции АФК при участии флавоноидов возможны в нейтрофилах и моноцитах, что продемонстрировано в настоящем исследовании в образцах с ИЛГ. Возможно, что это имеет значение в реализации антистафилококковых эффектов флавоноидных соединений. Однако, следует учитывать и возможность необратимого повреждения митохондрий, гибели макрофагов, вызванных увеличением выработки АФК и диссеминации поглощенных бактерий при незавершенном фагоцитозе, что продемонстрировано при исследовании ресвератрола в отношении микобактерий [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что предварительное внутрибрюшинное введение ИЛГ в дозе 30 мг/кг самцам мышей Balb/C достоверно увеличивает выживаемость животных в модели инфекционного процесса, вызванного *S. aureus* J 49 ATCC 25923, не ингибирует хемотаксис нейтрофилов и макрофагов у мышей Balb/C. Также выявлено, что ИЛГ в концентрациях 16–128 мкг/мл статистически значимо не влияет на поглощение моноцитами и нейтрофилами периферической крови человека *S. aureus* J49 ATCC 25923, но дозозависимо увеличивает количество фагоцитов, продуцирующих АФК, а также интенсивность «кислородного взрыва» активированных нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека. Таким образом, эти эффекты вкпе могут рассматриваться как один из возможных механизмов выживаемости мышей в ранние сроки развития стафилококковой инфекции у мышей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность профессору Сидоренко С.В. (ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России) за научные консультации настоящего исследования.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90085.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Солёнова – выполнение экспериментальных работ, статистическая обработка результатов, обработка результатов исследования, написание текста статьи; С.И. Павлова – разработка концепции и дизайна исследования, руководство проведением экспериментальных работ, обработка результатов исследования, редактирование текста статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response // *Nature*. – 2007. – Vol. 449, No. 7164. – P. 819–826. DOI: 10.1038/nature06246.
- Солёнова Е.А., Павлова С.И. Антибактериальные и иммуномодулирующие эффекты флавоноидов // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2020. – Т. 83, №10. – С. 33–39. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-10-33-39
- Павлова С.И., Албегова Д.З., Кягова А.А., Козлов И.Г. Механизмы иммуносупрессивной активности флавоноидов корня солодки при контактной чувствительности у мышей: угнетение функций Т-лимфоцитов-эффекторов опосредуется неэффекторными клетками // *Медицинская иммунология*. – 2010. – Т. 12, № 6. – С. 503–510. DOI: 10.15789/1563-0625-2010-6-503-510.
- Павлова С.И., Албегова Д.З., Дмитриева Н.В., Дибирова Г.О., Козлов И.Г. Флавоноиды корня солодки влияют на функции активированных Т-лимфоцитов мыши и человека // *Российский иммунологический журнал*. – 2011. – Т. 5, № 14. – С. 62–68.
- Солёнова Е.А., Павлова С.И. Антибактериальные и иммуностропные свойства изоликиритигенина при генерализованной стафилококковой инфекции у мышей // *Фармация и фармакология*. – 2020. – Vol. 8, No.3. – P. 78–85. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-3-78-85.
- Percie du Sert N., Hurst V., Ahluwalia A., Alam S., Avey M.T., Baker M., Browne W.J., Clark A., Cuthill I.C., Dirnagl U., Emerson M., Garner P., Holgate S.T., Howells D.W., Karp N.A., Lazic S.E., Lidster K., MacCallum C.J., Macleod M., Pearl E.J., Petersen O., Rawle F., Peynolds P., Rooney K., Sena E.S., Silberberg S.D., Steckler T., Wurbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research // *PLoS Biol*. 2020. – Vol. 18, No.7. – e3000410. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000410.
- Lehmann A. K., Sornes S., Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry // *J Immunol Methods*. – 2000. – Vol. 243, No.1–2. – P. 229–242. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00237-4.
- Miyazaki S., Ishikawa F., Fujikawa T., Nagata S., Yamaguchi K. Intraperitoneal Injection of Lipopolysaccharide Induces Dynamic Migration of Gr-1^{high} Polymorphonuclear Neutrophils in the Murine Abdominal Cavity // *Clinical Diagn Lab Immunol*. – 2004. – Vol. 11, No.3. – P. 452–457. DOI: 10.1128/CDLI.11.3.452-457.2004.
- Qiao H., Zhang X., Wang T., Liang L., Chang W., Xia H. Pharmacokinetics, biodistribution and bioavailability of isoliquiritigenin after intravenous and oral administration // *Comparative Study Pharm Biol*. – 2014. – Vol. 52, No.2. – P. 228–236. DOI: 10.3109/13880209.2013.832334.
- Han Y.J., Kang B., Yang E.-J., Choi M.-K., I.-S. Song . Simultaneous Determination and Pharmacokinetic Characterization of Glycyrrhizin, Isoliquiritigenin, Liquiritigenin, and Licochalcone in Rat Plasma Following Oral Administration of Glycyrrhizae Radix Extract // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, No.9. – P. 1816. DOI: 10.3390/molecules24091816.
- Yang Y., Bazhin A.V., Werner J., Karakhanova S. Reactive oxygen species in the immune system // *Int Rev Immunol*. – 2013. – Vol. 32, No.3. – P. 249–270. DOI: 10.3109/08830185.2012.755176.
- Preiser J.-C. Oxidative stress // *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. – 2012. – Vol. 36, No.2. – P. 147–154. DOI: 10.1177/0148607111434963.
- Segal A.W. How neutrophils kill microbes // *Annu Rev Immunol*. – 2005. – Vol. 23. – P. 197–223. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.
- Tauber A.I., Brettler D.B., Kennington E.A., Blumberg P. M. Relation of Human Neutrophil Phorbol Ester Receptor Occupancy and NADPH-Oxidase Activity // *Blood*. – 1982. – Vol. 60, No.2. – P. 333–339.
- Winterbourn C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species // *Nat Chem Biol*. – 2008. – Vol. 4, No.5. – P. 278–286. DOI: 10.1038/nchembio.85.
- Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M.A., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview // *Front Immunol*. – 2017. – Vol. 8, No.81. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00081.
- Vong L., Lorentz R.J., Assa A., Glogauer M., Sherman P.M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps // *J Immunol*. – 2014. – Vol. 192. – P. 1870–1877. DOI: 10.4049/jimmunol.1302286.
- Fadini G.P., Menegazzo L., Rigato M., Scattolini V., Poncina N., Bruttocao A., Ciciliot S., Mammano F., Ciubotaru C.D., Brocco E., Marescotti M.C., Cappellari R., Arrighi G., Million R., Vigili de Kreutzenberg S., Albiero M., Avogaro A. NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans // *Diabetes*. – 2016. – Vol. 65. – P. 1061–1071. DOI: 10.2337/db15-0863.
- Beiter K., Wartha F., Albiger B., Normark S., Zychlinsky A., Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps // *Curr Biol*. – 2006. – Vol. 16. – P. 401–407. DOI: 10.1016/j.cub.2006.01.056.
- Kirchner T., Hermann E., Möller S., Klinger M., Solbach W., Laskay T., Behnen M. Flavonoids and 5-aminosalicylic acid inhibit the formation of neutrophil extracellular traps // *Mediators Inflamm*. – 2013. – Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/710239.
- Yang S.-C., Chen P.-J., Chang S.-H., Weng Y.-T., Chang F.-R., Chang K.-Y., Chen C.-Y., Kao T.-I., Hwang T.-L. Luteolin attenuates neutrophilic oxidative stress and inflammatory arthritis by inhibiting Raf1 activity // *Biochem Pharmacol*. – 2018. – Vol. 154. – P. 384–396. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.06.003.
- Vargas J.E., Souto A.A., Pitrez P.M.C., Stein R.T., Porto B.N. Modulatory potential of resveratrol during lung inflammatory disease // *Med Hypotheses*. – 2016. – Vol. 96. – P. 61–65. DOI: 10.1016/j.mehy.2016.09.023.
- de la Lastra C.A., Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications // *Biochemical Society Transactions*. 2007. Vol. 35, Pt 5. – P. 1156–1560. DOI: 10.1042/BST0351156.

24. Galati G., Sabzevari O., Wilson J.X., O'Brien P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics // *Toxicology*. – 2002. – Vol. 177, No.1. – P. 91–104. DOI: 10.1016/s0300-483x(02)00198-1.
25. Madrigal-Perez L.A., Ramos-Gomez M. Resveratrol Inhibition of Cellular Respiration: New Paradigm for an Old Mechanism // *Int J Mol Sci*. – 2016. – Vol. 17, No.3. – P. 368. DOI: 10.3390/ijms17030368.
26. Eghbaliferiz S., Iranshahi M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals // *Phytother Res*. – 2016. – Vol. 30, No.9. – P. 1379–1391. DOI: 10.1002/ptr.5643.
27. Yuan X., Zhang B., Chen N., Chen X.-Y., Liu L.-L., Zheng Q.-S., Wang Z.P. Isoliquiritigenin treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in HeLa cells // *Asian Nat Prod Res*. – 2012. Vol. 14, No.8. – P. 789–798. DOI: 10.1080/10286020.2012.694873.
28. Calabrese E.J., Mattson M.P., Calabrese V. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance // *Hum Exp Toxicol*. – 2010. – Vol. 29, No.12. – P. 980–1015. DOI: 10.1177/0960327110383625.

АВТОРЫ

Солёнова Елена Александровна – младший научный сотрудник, старший преподаватель кафедры фармакологии, клинической фармакологии и биохимии, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». ORCID ID: 0000-0001-6104-0864. E-mail: elensoul@mail.ru

Павлова Светлана Ивановна – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и биохимии, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». ORCID ID: 0000-0001-9976-7866. E-mail: flavonoid@yandex.ru

УДК 615.212.7: 543.544.5.068.7



ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО КАППА-ОПИОИДНОГО АНАЛЬГЕТИКА – СОЕДИНЕНИЯ RU-1205 ПРИ ОДНОКРАТНОМ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

А.А. Спасов¹, Л.А. Смирнова^{1,3}, О.Ю. Гречко¹, Н.В. Елисеева¹, Ю.В. Лифанова¹,
А.И. Ращенко¹, О.Н. Жуковская², А.С. Морковник², В.А. Анисимова²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

² Научно-исследовательский институт физической и органической химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет» 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/2

³ Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский медицинский научный центр» 400131, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

E-mail: j_semenova_pharm@mail.ru

Получено 21.01.2021

Принята к печати 24.04.2021

Цель. Исследование фармакокинетических свойств соединения RU-1205, с ранее выявленным каппа-агонистическим и анальгетическим действием, при однократном пероральном введении, а также сопоставление взаимосвязи между его фармакокинетическими и обезболивающими свойствами.

Материалы и методы. Фармакокинетические параметры RU-1205 после перорального введения в дозе 50 мг/кг исследовали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с определением концентрации соединения по предварительно построенному калибровочному графику. Рассчитывали показатели площади под фармакокинетической кривой, клиренса, периода полувыведения, время пребывания в организме молекулы препарата, общего (кажущегося) объема распределения, а также показатель абсолютной биодоступности. Изучали тканевое распределение и экскрецию RU-1205. Осуществляли прогноз возможных метаболитов соединения RU-1205 с помощью программы «PALLAS 3.00». Исследование анальгетической активности проводили на модели центральной соматогенной боли при электрическом раздражении с оценкой динамики амплитуды напряжения соответствующей реакции «отдергивания хвоста».

Результаты. Изучаемое соединение быстро адсорбируется из желудочно-кишечного тракта с достижением максимальной концентрации к концу первого часа исследования и определяется в плазме в течение 12 часов. Период полувыведения составляет 17,7 ч. Абсолютная биодоступность при пероральном пути – 37,3%. Установлено, что соединение выводится за 3–4 дня. Основной путь выведения внепочечный. Биотрансформация вещества вероятно протекает в основном с образованием окисленных форм исходной молекулы по реакциям первой фазы метаболической трансформации. Анальгетическое действие продолжительное: начинается через 15 минут и сохраняется в течении 12 часов с выходом на плато к 8 часу.

Заключение. Исследуемое вещество подвергается длительному процессу элиминации при пероральном введении, имеет наибольшую тропность к органам элиминации и подвергается активным процессам биотрансформации в организме животных, в результате которых, возможно, образуются активные продукты метаболизма с анальгетической активностью.

Ключевые слова: каппа-агонисты; опиоидные анальгетики; бензимидазолы; фармакокинетика; пероральный путь; биодоступность; экскреция; тканевое распределение

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; AUC – площадь под фармакокинетической кривой; KeI – константа элиминации; Cl – клиренс; T_{1/2} – продолжительность периода полувыведения; MRT – среднее время пребывания в организме молекулы; Vd – общий (кажущийся) объем распределения; fT – тканевая доступность; ACN – ацетонитрил; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа.

Для цитирования: А.А. Спасов, Л.А. Смирнова, О.Ю. Гречко, Н.В. Елисеева, Ю.В. Лифанова, А.И. Ращенко, О.Н. Жуковская, А.С. Морковник, В.А. Анисимова. Фармакокинетические свойства нового каппа-опиоидного анальгетика – соединения RU-1205 при однократном пероральном введении. *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):149-160. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-149-160

© А.А. Спасов, Л.А. Смирнова, О.Ю. Гречко, Н.В. Елисеева, Ю.В. Лифанова, А.И. Ращенко, О.Н. Жуковская, А.С. Морковник, В.А. Анисимова, 2021

For citation: A.A. Spasov, L.A. Smirnova, O. Yu. Grechko, N.V. Eliseeva, Yu.V. Lifanova, A.I. Rashchenko, O.N. Zhukovskaya, A.S. Morkovnik, V.A. Anisimova. Pharmacokinetic properties of a new kappa-opioid analgesic RU-1205 compound at a single peroral administration. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(2):149-160. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-149-160

PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF A NEW KAPPA-OPIOID ANALGESIC RU-1205 COMPOUND AT A SINGLE PERORAL ADMINISTRATION

A.A. Spasov¹, L.A. Smirnova^{1,3}, O.Yu. Grechko¹, N.V. Eliseeva¹, Yu.V. Lifanova¹,
A.I. Rashchenko¹, O.N. Zhukovskaya², A.S. Morkovnik², V.A. Anisimova²

¹ Volgograd State Medical University

1, Pavshikh Bortsov Square, Volgograd, Russia 400131

² Scientific Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University
Bldg. 2, 194, Stachki Ave., Rostov-on-Don, Russia, 344090

³ Volgograd Medical Research Center;

1, Pavshikh Bortsov Square, Volgograd, Russia, 400131

E-mail: j_semenova_pharm@mail.ru

Received 21 Jan 2021

Accepted 24 Apr 2021

The aim of the study is the investigation of the pharmacokinetic properties of the RU-1205 compound, with previously identified kappa-agonistic and analgesic effects, at a single oral administration, as well as comparison of the relationship between its pharmacokinetic and analgesic properties.

Materials and methods. Pharmacokinetic parameters of RU-1205 after the oral administration at the dose of 50 mg/kg were investigated using the method of High Performance Liquid Chromatography with determination of the concentration of the compound according to the previously constructed calibration schedule. The indices of the area under the pharmacokinetic curve, clearance, half-life, residence time of the drug molecule in the body, a total (apparent) volume of distribution, as well as the indicator of absolute bioavailability, were calculated. The tissue distribution and excretion of RU-1205 were studied. Potential metabolites of RU-1205 were predicted using the PALLAS 3.00 program. The study of the analgesic activity was carried out on a model of central somatogenic pain with electrical stimulation, with the dynamics assessment of the voltage amplitude of the corresponding reaction of the «tail-flick» reflex.

Results. The compound under study is rapidly adsorbed from the gastrointestinal tract, reaching a maximum concentration by the end of the first hour of the study, and is determined in plasma within 12 hours. Its half-life is 17.7 hours. The absolute oral bioavailability is 37.3%. It was found out that the compound is withdrawn within 3–4 days. The main route of excretion is extrarenal. Biotransformation of a substance probably proceeds mainly with the formation of oxidized forms of the initial molecule by reactions of the first phase of metabolic transformation. The analgesic effect is long-lasting: it starts after 15 minutes and lasts for 12 hours with flattening of the curve by the 8th hour.

Conclusion. When administered orally, the test substance undergoes a long process of elimination, has the greatest tropism for the elimination organs and undergoes active biotransformation processes in the body of animals. As a result of it, active metabolic products with an analgesic activity are, possibly, formed.

Keywords: kappa agonists; opioid analgesics; benzimidazoles; pharmacokinetics; peroral route; bioavailability; excretion; tissue distribution

List of abbreviations: HPLC – High Performance Liquid Chromatography; RCF – relative centrifugal field; AUC – area under the curve; Kel – elimination constant; Cl – clearance; T_{1/2} – half-life of a drug; MRT – mean residence time; V_d – Volume of distribution; AVD – apparent volume of distribution; TA – tissue availability; ACN – acetonitrile; GIT – gastrointestinal tract; MAPK – mitogen-activated protein kinase

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении многих десятилетий опиоидные анальгетики продолжают оставаться основой фармакотерапии сильных болевых синдромов. Однако глобальный опиоидный кризис требует смены устоявшейся общепринятой практики клинического использования опиоидов с необходимостью замены части традиционно используемых наркотических анальгетиков, обладающих узким терапевтическим индексом, выраженным наркотическим потенциалом, а также неоптимальной фармакокинетикой [1,2]. Неселективные агонисты опиоидных рецепторов (например, морфин), особенно в инъекционных лекарственных

формах, имеют достаточно высокий риск немедицинского использования в связи с выраженным наркотическим потенциалом (за счет активации преимущественно μ -опиоидных рецепторов). Это существенно затрудняет их нормативную доступность, осложняет работу медицинского персонала за счет сложных правил учета наркотических анальгетиков, повышения степени контроля в соответствии с Постановлением Правительства РФ № 681 от 30 июня 1998 года (ред. от 03.12.2020), и тем самым значительно лимитирует их клиническое применение, не обеспечивая в полной мере потребность пациентов в разрешенных для использования сильнодействующих анальгетиках [3].

Для решения проблемы наркогенности опиоидных обезболивающих средств предложено несколько направлений, одним из которых является поиск и разработка новых опиоидных анальгетиков с более безопасным профилем рецепторной активности, обусловленным избирательностью действия препарата на различные подтипы опиоидных рецепторов, что позволит обеспечить повышение эффективности проводимой анальгезии совместно с минимизацией побочных эффектов [4, 5]. Парциальные агонисты и смешанные агонисты-антагонисты различных субпопуляций опиоидных рецепторов (бупренорфин, буторфанол, налбуфин), разрабатываемые с целью повышения селективности рецепторного профиля, нашли лишь ограниченное применение в клинической практике, поскольку сохранили ряд негативных свойств традиционных опиатов, в частности наркогенность [6].

Изучение обезболивающих свойств RU-1205 на экспериментальных ноцицептивных моделях показало, что исследуемое соединение по анальгетической активности превосходит морфин и буторфанол [7] и, в отличие от препаратов сравнения, не вызывает угнетения дыхания и не обладает фармакологическими свойствами, которые можно расценить как специфические предикторы способности вещества формировать физическую зависимость, вызывать аверсию или аддикцию [8, 9]. Согласно современной концепции терапии выраженной хронической боли, неинвазивные лекарственные формы опиоидных анальгетиков признаны наиболее эффективными и безопасными препаратами, обеспечивающими наилучшее качество жизни пациентов (кроме заключительных стадий заболевания). Одним из важных преимуществ тестируемого вещества является его эффективность при различных способах введения, в том числе и при пероральном приеме. Это открывает перспективы создания на его основе эффективной пероральной таблетированной лекарственной формы, в отличие от буторфанола, который подвергается интенсивному метаболизму в печени и используется в медицинской практике только в виде раствора для инъекций [10].

Одной из необходимых стадий доклинических исследований, на этапе создания новых оригинальных лекарственных средств препаратов, является изучение фармакокинетических параметров разрабатываемого соединения. Данные параметры позволяют решить целый спектр прикладных вопросов, таких как изучение степени всасывания и скорости адсорбции, биотрансформации, проницаемости лекарственных веществ через тканевые барьеры и распределения между кровью и периферическими тканями, выведения изучаемых препаратов, а также оценку биодоступности при внутрисудистом введении лекарственного вещества [11].

ЦЕЛЬ. Исследование фармакокинетических свойств соединения RU-1205 при однократном пероральном введении, а также изучение корреляции

между его фармакокинетическими и обезболивающими свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Исследования проводились на половозрелых крысах-самцах, массой 200-230 г в количестве 74 особей, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» ПАМН (Санкт-Петербург, Россия). Животные до начала эксперимента подверглись адаптационному карантину в течение 14 дней в виварии кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Крысы имели круглосуточный доступ к кормушкам и поилкам *ad libitum*, и содержались в стандартизированных условиях вивария (Постановление от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»; директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, используемых для научных целей»). Животных содержали группами по 5 особей при регулируемом совмещенном световом режиме (12/12 ч) и температуре 20–22°C. За 12 часов до эксперимента животных лишали еды, но при этом имелся свободный доступ к воде. Эксперименты были одобрены региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (ONHP), протокол № 2077-2018 от 30 октября 2018 г.).

Исследуемые вещества

Соединение RU-1205 представляет собой (дигидрохлорид 2-(4-фторфенил)-9-[2-(морфолин-4-ил)этил]-9H-имидазо[1,2-a]-бензимидазола) (рис. 1) в виде субстанции синтезированной в НИИ физической и органической химии Южного Федерального Университета г. Ростов-на-Дону. Чистота соединения составляла не менее 99,46%.

Дизайн исследования

На первом этапе исследования проводилось изучение фармакокинетических свойств соединения RU-1205 в дозе 50 мкг/кг при однократном внутрижелудочном введении методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Животные случайным образом были разделены на 7 групп – контрольную, получавшую растворитель 0,9% раствор натрия хлорида в объеме 100 мкл на 100 г веса животного, и 6 групп, получавших соединение RU-1205 в дозе 50 мкг/кг (n=6). Для внутрижелудочного введения использовался атравматический зонд №14 (Kent Scientific, США). С целью определения фоновых пиков перед экспериментом производился забор крови у всех 42 животных с последующим получением образцов плазмы объемом 1,5–2 мл. После введе-

ния соединения RU-1205 через 30 минут, 1, 2, 4, 8, 12 часов животные подвергались декапитации с помощью гильотины (OpenScience, Россия) с последующим забором крови и органов. Декапитация и забор материала у животных из группы контроля производились через 20 минут после введения растворителя. Образцы крови стабилизировали 5% водным раствором цитрата натрия («Полисинтез», Россия) (pH 6,0) с последующим центрифугированием в режиме 15 мин при 3000 об/мин, RCF=604g (ELMI, Латвия) для получения плазмы. Для преципитации белков плазмы и извлечения исследуемого вещества к образцам крови добавляли ацетонитрил в соотношении 1:1. Исследуемые органы (головной мозг, печень, почки, сердце, легкие, сальник и мышечная ткань) подвергались измельчению и гомогенизации (Silent Crusher, Германия) до получения 20% водного гомогената.

Изучение тканевой биодоступности является неотъемлемой частью фармакокинетических исследований новых соединений. После получения результатов можно судить об интенсивности распределения веществ между периферическими тканями и органом мишенью (для соединения RU-1205 органом-мишенью является головной мозг). При изучении тканевой доступности соединения RU-1205 была исследована концентрация соединения в головном мозге, органах элиминации (печень, почки), в особенно васкуляризованных тканях (сердце, легкие), умеренно кровоснабжаемых тканях (мышцы, для эксперимента выбрана четырехглавая мышца бедра), в слабо васкуляризованных тканях (сальник) [12].

Количественное определение соединения RU-1205 в плазме крови и гомогенатах органов изучалось по ранее разработанной методике [13] с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с диодноматричным детектированием на жидкостном хроматографе (Shimadzu, Япония). Определение осуществлялось установке, состоящей из хроматографической колонки SUPELCOSIL LC-18 (5мкм 100 x 4,6мм) с диодноматричным ультрафиолетовым детектором (температура термостатирования 50°C). Для приготовления подвижной фазы использовался ацетонитрил (УФ210) (Россия) в соотношении 1:1 с буферной системой (однозамещенный фосфат калия 50 mMоль, pH=5.0). Длина волны при детектировании составляла 205 нм, скорость потока подвижной фазы 1мл/мин. Концентрация соединения RU-1205 в пробах определялась по предварительно построенному калибровочному графику. Для этого строили зависимость стандартных концентраций (0.5; 1; 5; 10; 25 мкг/мл) от площадей хроматографических пиков по методу абсолютных стандартов. Коэффициентом регрессии (R^2) составлял 0,998.

Для оценки фармакокинетических свойств соединения RU-1205 с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 (США) рассчитывались следующие фармакокинетические параметры:

1. AUC (Area Under the Curve) – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» (модельно-независимым методом статистических моментов [14]);
2. Kel – константа элиминации;
3. Cl – клиренс;
4. $T_{1/2}$ – продолжительность периода полувыведения;
5. MRT – среднее время пребывания в организме молекулы соединения RU-1205;
6. Vd – общий (кажущийся) объем распределения.

Оценка интенсивности проникновения соединения RU-1205 в различные органы и ткани проводилась с использованием параметра тканевой доступности (fT), который представляет собой отношение значения AUC органа/ткани к AUC плазмы крови.

На втором этапе исследования проводилось изучение экскреции соединения RU-1205 методом ВЭЖХ в пробах мочи и кала при однократном внутрижелудочном введении. Эксперименты проводились на 20 половозрелых крысах-самцах, случайным образом разделенных на контрольную и опытные группы (n=10). Опытной группе однократно вводилось соединение RU-1205 в дозе 50 мг/кг внутрижелудочно при помощи атравматического зонда, животные из группы контроля получали растворитель – 0,9% раствор натрия хлорида. После 24, 48, 72 и 96 часов в метаболических камерах «Термопласт» (Италия) проводился забор проб. Образцы подвергались пробоподготовке и анализу, описанным выше методом ВЭЖХ.

На третьем этапе изучалась динамика анальгетической активности в зависимости от концентрации соединения RU-1205 в плазме крови при однократном внутрижелудочном введении в тесте электрического раздражения корня хвоста. Исследования проводились на 12 половозрелых крысах-самцах (n=6). Соединения RU-1205 вводилось однократно внутрижелудочно в дозе 5 мг/кг при помощи атравматического зонда, животным контрольной группы – 0,9% раствор натрия хлорида. В течение 12-ти часов проводилось изучение анальгетической активности в тесте электрического раздражения корня хвоста при нанесении стимуляции через подкожные электроды (прямоугольные импульсы с частотой 100 Гц, длительностью 10 мсек, продолжительность стимуляции 1 сек) (Электростимулятор лабораторный ЭСЛ-2, Россия) при постепенном последовательном увеличении напряжения [15,16]. Величина болевого порога (до проявления спинального рефлекса «отдергивания хвоста») оценивалась, как показатель напряжения, выражаемый в вольтах. О наличии анальгетических свойств соединения RU-1205 судили на основании изменения амплитуды напряжения по сравнению с показателями контрольных животных.

Для прогнозирования возможных метаболитов соединения RU-1205 использовали программу «PALLAS 3.00» (CompuDrug Chemistry Ltd.).

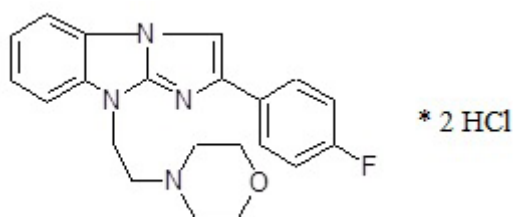


Рисунок 1 – Структурная формула соединения RU-1205

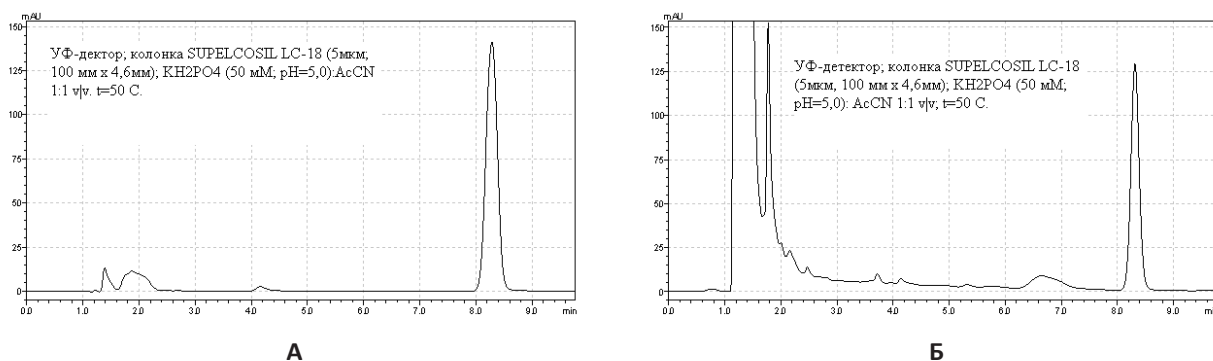


Рисунок 2 – Хроматограмма субстанции соединения RU-1205 в концентрации 5 мкг/мл в водном растворе (А) и биологическом материале (Б). время удерживания – 8,00–8,83 мин.

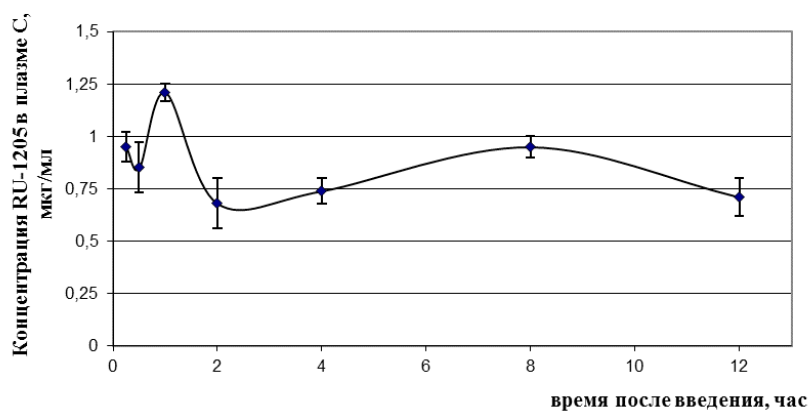


Рисунок 3 – Кинетическая кривая соединения RU-1205 в плазме крови крыс

Примечание: введение – перорально, доза 50 мг/кг

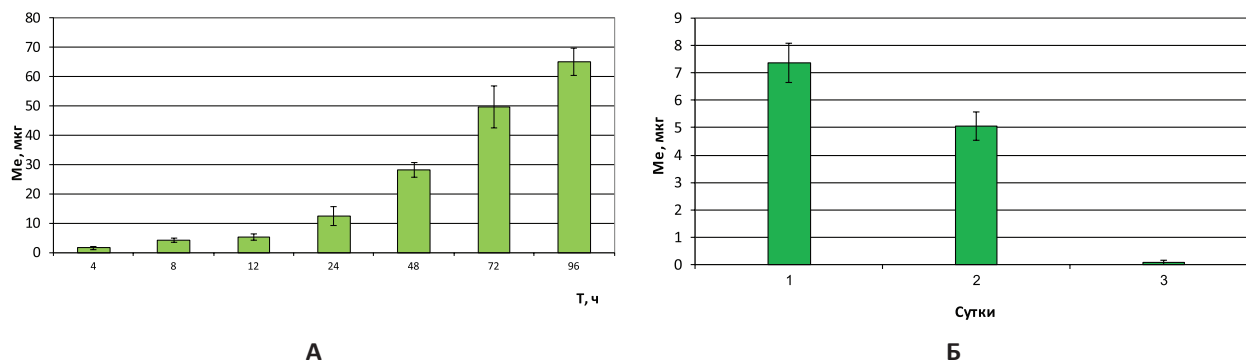


Рисунок 4 – Кумулятивная экскреция соединения RU-1205 через почки (А) и ЖКТ (Б) при внутрижелудочном введении

Примечание: по оси абсцисс – время, ч; по оси ординат – количество RU-1205, мкг

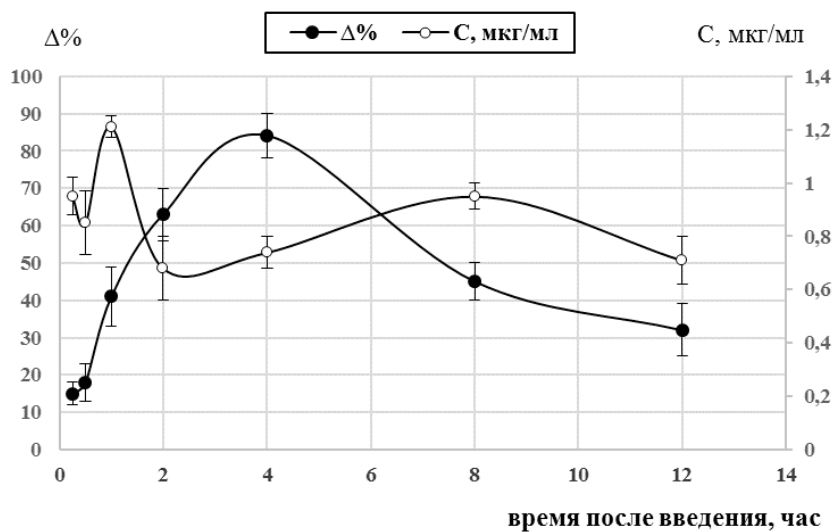


Рисунок 5 – Зависимость динамики антиноцицептивной активности RU-1205 при внутрижелудочном введении от концентрации соединения в плазме крови и времени

Примечание: по оси абсцисс – время (часы); по оси ординат: слева – изменение порога болевой чувствительности (Δ% по отношению к контролю), справа – концентрация соединения в плазме крови (мкг/мл)

Таблица 1 – Прогноз возможных метаболитов соединения RU-1205 *in silico* (программа «PALLAS 3.00»)

А	Б	В
Г	Д	Е
Ж	Структура соединения RU-1205	

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Используя разработанный метод количественного определения, были получены хроматограммы стандартных водных и плазменных растворов соединения RU-1205 (рис. 2).

Фармакокинетическая кривая изменения концентрации субстанции соединения RU-1205 в плазме крови при пероральном введении представлена на рисунке 3. Как видно из рисунка, кинетическая кривая имеет двухфазный характер динамики изменения концентрации. Первая фаза повышения концентрации характеризует процесс всасывания вещества. Быстрый этап повышения концентрации начинается с 30 минуты, а максимальная концентрация соединения в плазме ($C_{\max}=1,05$ мкг/мл) достигается уже к 60 минуте исследования, что свидетельствует о быстрой адсорбции соединения RU-1205 из желудочно-кишечного тракта (рис.3). Вторая часть фармакокинетической кривой характеризует элиминацию субстанции соединения из плазмы крови вначале с резким снижением концентрации в течение второго часа исследования и последующим постепенном снижении на протяжении 12 часов, что свидетельствует о длительном процессе элиминации. Площадь под фармакокинетической кривой составила 27,56 мкг*час/мл. Продолжительный характер элиминации соединения RU-1205 также подтверждают высокие значения таких показателей, как $T_{1/2}$ и MRT, которые составляют 17,7 ч и 7,85 ч, соответственно, а также невысокий показатель – $Cl - 1,81$ л/час/кг.

Для характеристики распределения лекарственного вещества был рассчитан показатель кажущегося объема распределения (V_d), дающий возможность определить один из вариантов распределения соединения: нахождение в плазме крови, не выходя за пределы сосудистого русла (при показателе меньше объема плазмы); распределение во внеклеточной и внутриклеточной жидкости (при сопоставимых показателях с общим количеством жидкости в организме) или же нахождение в основном в тканях (при значениях выше общего объема жидкости организма). Полученное значение – 43,88 л/кг превосходит реальный объем жидкости в организме крыс (0,67 л/кг) более чем в 65 раз, что может указывать на интенсивное проникновение соединения в органы и ткани организма и депонирование в периферических тканях [17].

Абсолютную биодоступность определяли путем сравнительного изучения динамики концентраций исследуемого вещества в плазме крови после приема при пероральном и внутривенном пути. Данный показатель рассчитывали, как отношение площади под кривой при пероральном введении лекарствен-

ного вещества к показателю площади под кривой при внутривенном пути. На основании предыдущих исследований показатель AUC при внутривенном введении RU-1205 составляет 14,76 мкг*час/мл [18], исходя из чего абсолютная биодоступность при пероральном пути соответствует 37,3%.

Основным результатом процессов распределения лекарственного вещества в организме является дальнейший транспорт его в зону потенциального действия, где оно взаимодействует со специфическими мишенями, представляющими из себя как целый орган, так и отдельные клетки или специфические молекулярные структуры, определяющие фармакологический эффект препарата. Интенсивность проникновения изучаемого вещества в периферические ткани характеризуются тканевой доступностью. Соединение RU-1205 интенсивно распределяется в тканях исследуемых органов, при этом было определено, что в распределении препарата по органам прослеживается значительная неоднородность. Анализ абсолютных величин тканевой доступности (fT) соединения RU-1205 показал, что оно имеет наименьшую тропность к сердцу, легким, селезенке, мышце. В печени и почках отмечается значительное содержание изучаемого вещества, с показателями AUC 17,65 и 82,94 мкг*час/мл, соответственно. Параметр тканевого распределения для почечной ткани составил 3,01 и 0,64 для тканей печени соответственно. Изучаемое вещество определяется в данных органах-мишенях в течение 12 часов в печени и 8 часов в почках. Наибольшее содержание отмечалось в тканях почек, что может свидетельствовать о преимущественном почечном выведении RU-1205. В высоких концентрациях соединение также определяется в жировой ткани, в сальнике, что, по-видимому, обуславливается его липофильностью. В головном мозге при пероральном введении содержание изучаемого вещества находится ниже порога определения.

При исследовании экскреции RU-1205 после перорального введения было определено, что выведение соединения происходит посредством почечной экскреции и через кишечник. Так, с мочой исследуемое соединение выводится четверо суток и двое суток с калом. Интенсивность процесса экскреции в течение последующих трех суток исследования после перорального приема соединения представлена данными кумулятивной мочевой и кишечной экскреции (рис. 4). Кумулятивная экскреция с мочой составляет 65,12 мкг, что соответствует порядка 0,65% от введенной дозы. Также было обнаружено, что в моче определяется большее количество изучаемого вещества, чем в фекалиях (Рис. 4А.). При этом было выявлено, что внепочечный (метаболический) клиренс соединения RU-1205 значительно преобладает над почечным, что по литературным данным свидетельствует об активном метаболизме изучаемого вещества в печени [19, 20].

Изучение обезболивающих свойств соединения показало, что достоверное анальгетическое действие отмечается уже через 15 минут после перорального введения RU-1205. При этом латентный период ноцицептивной реакции возрастает на 16%. Антиноцицептивное действие постепенно нарастает и достигает наивысших значений к 4-ому часу после введения, затем плавно снижается, достигая порядка 50% от максимальных показателей эффективности к 8-ми часам наблюдения (рис. 5). Наблюдаемый обезболивающий эффект носит продолжительный характер, сохраняясь в течение 12 часов.

Компьютерный прогноз метаболитов изучаемого вещества *in silico* с использованием программы «PALLAS 3.00» позволил определить семь возможных метаболитов. Данные метаболиты в основном представляют собой продукты реакций окисления, в частности 3 прогнозируемых метаболита под шифрами «а», «г» и «ж», возможно, образуются в результате реакции гидроксилирования (табл.1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из перспективных групп опиоидных анальгетиков с избирательным механизмом действия без риска развития респираторной депрессии и наркотической зависимости (характерной для μ -агонистов) в последние годы рассматриваются селективные каппа-опиоидные агонисты, которые в отличие от μ - или δ -агонистов наряду с высокой обезболивающей активностью не стимулируют дофаминергическую «reward» систему [6, 21–23]. Хотя агонисты каппа-опиоидного рецептора уже давно признаны анальгетиками с низким потенциалом злоупотребления, лимитирующим фактором продвижения каппа-селективных анальгетиков первого поколения являются серьезные побочные эффекты, связанные с дисфорией, ангедонией и галлюцинациями [24].

На сегодняшний день существуют агонисты опиоидных рецепторов, которые способны оказывать антиноцицептивное действие, при этом, не вызывая нежелательных психотропных эффектов. Возможность подобной активности объясняется избирательной активацией путей передачи сигнала от опиоидного рецептора (избирательный функциональный сигналинг). Так, например, стимуляция μ -опиоидных рецепторов морфином, а κ -рецепторов селективным каппа-агонистом U 50488 вызывает активацию двух внутриклеточных каскадов G_i/o и β – аррестинового [25, 26]. Это реализуется в эффективном обезболивании, а также побочных эффектах в виде эйфории, формировании зависимости, угнетении дыхания (для морфина) и дисфории (для U 50488). Антиноцицептивные эффекты при активации любого из опиоидных рецепторов реализуются за счет активации G_i -протеинового пути, тогда как аддиктивный потенциал, дисфория и большинство других неблагоприятных сопутствующих эффектов опиоидов обуслов-

лены β – аррестиновым каскадом внутриклеточных сигналов. За последнее десятилетие были идентифицированы G_i -смещенные μ - и κ -опиоидные агонисты (PZM21, Oliceridine, Herkinorin), κ -агонисты с β -аррестин-смещенной антагонистической активностью, а также лиганды (Noribogaine), сочетающие свойства высокоэффективных G_i - активаторов и ингибиторов β -аррестина [27–29].

Механизм формирования дисфории и аверсии, индуцируемой каппа-рецепторными агонистами, состоит в активации митоген-активируемой протеинкиназы – p38-MAPK по β – аррестinovому сигнальному пути [30]. Гипотеза о том, что высокоселективные каппа-рецепторные агонисты, выраженно не активирующие или же ингибирующие p38-MAPK-киназный каскад внутриклеточных сигнальных реакций, стимуляция которого реализуется в каппа-опосредованной аверсии, гипералгезии и воспалении, будут оказывать более выраженное обезболивающее действие без риска развития дисфории [31], послужила предпосылкой к разработке новой технологии поиска каппа-селективных агонистов со свойствами ингибиторов p38-MAPK и перспективой создания на их основе конкурентно-способных анальгетиков без респираторного дистресс синдрома, наркотического потенциала и дисфории. Большинство избирательных каппа-рецепторных лигандов и селективных ингибиторов p38-MAPK являются производными циклических азотсодержащих гетеросистем, к которым также относятся производные бензимидазола и конденсированные системы на его основе [32].

В результате целенаправленного комплексного изучения производных бензимидазола с помощью методов компьютерного моделирования *in silico*, а также в ходе экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* были определены основные закономерности каппа-рецепторных взаимодействий, которые были реализованы в интегральном скаффолде (2-п-фторфенилимидазо[1,2-а]бензимидазол) [33–35], и позволили выявить оригинальную молекулу – соединение под лабораторным шифром – RU-1205. Каппа-рецепторный механизм действия соединения был лабораторно подтвержден на экспериментальной модели семявыносящего протока кролика (показатель ингибирования электрически-индуцированного сокращения изолированного протока $IC_{50} = 2$ nM), а также доказан с использованием неселективного опиоидного антагониста – налоксона и каппа-селективного антагониста норбинолторфимина, которые блокировали анальгетическую активность исследуемого соединения в тестах *in vivo* [36].

При пероральном введении в дозе 50 мг/кг максимальное значение концентрации соединения RU-1205 наблюдалось через 1 час после введения – время необходимое для проникновения через стенку ЖКТ и прохождения через печеночный барьер. Изучаемое вещество длительно циркулирует в плазме крови на

протяжении 12-ти часов. Продолжительный характер элиминации соединения RU-1205 также подтверждают высокие значения периода полувыведения и среднего времени пребывания в организме молекулы соединения RU-1205. Отмечается, что абсолютная биодоступность субстанции соединения RU-1205 при пероральном введении составляет 37%. Для сравнения, применяемый в клинике агонист каппа-опиоидных рецепторов буторфанола тартрат, в эксперименте на животных имеет низкое значение биодоступности при пероральном введении, составляющее менее 10%.

Полученные результаты изучения экскреции показали, что внепочечный (метаболический) клиренс соединения RU-1205 значительно преобладает над почечным. Это согласуется с данными литературы по изучению экскреции производных бензимидазола, из которых следует, что производные бензимидазола подвергаются интенсивным метаболическим превращениям в организме. Так показано, что афобазол (фабомотизол) после введения разными способами регистрируется в моче и кале лишь в незначительных количествах [37, 38], 80% введенной дозы омепразола выводится с мочой в виде метаболитов и небольшая часть – с калом [39].

При оценке компьютерного прогнозирования возможных метаболитов RU-1205 следует отметить, что во всех образующихся соединениях радикалом у атома C² остается фторфенильный радикал, который предположительно участвует в развитии анальгетического эффекта [33]. Для всех метаболитов, кроме метаболитов «д» и «е» характерно сохранение морфолинового радикала, который также участвует в развитии обезболивания. Также на основании компьютерного анализа было установлено, что в процессе метаболизма RU-1205 возможен отрыв морфолинового радикала и, вероятно, изменение анальгетической активности (метаболит «д»).

Как в доклинических исследованиях, так и при дальнейшем клиническом применении новых препаратов целесообразно проводить поиск взаимосвязей между фармакокинетическими показателями и эффектами лекарственного средства. Обсуждение таких корреляций является важным для понимания системы взаимоотношений фармакокинетических и фармакодинамических механизмов в действии будущего препарата. Поэтому следующим этапом исследования было изучение зависимости фармакодинамических свойств (обезболивания) от фармакокинетики соединения RU-1205.

В ранее проведенных исследованиях было выявлено, что соединение оказывает дозозависимый анальгетический эффект, а среднееэффективная доза RU-1205 при пероральном пути введения составляет 5 мг/кг [8]. Основной параметр, характеризующий степень биологической доступности препарата, площадь под фармакокинетической кривой RU-1205, увеличивается с увеличением дозы линейно [40]. Учитывая чувствительность разработанного метода ВЭЖХ и

возможность сопоставления данных фармакокинетики и фармакодинамики при линейной кинетике была оценена корреляция анальгетических эффектов и фармакокинетики при разных дозах. При сопоставлении фармакокинетических и обезболивающих свойств было определено, что разница в максимальном обезболивающем эффекте и пике концентрации вещества в плазме составляет 3 часа. Данную разницу можно объяснить особенностями проникновения соединения RU-1205 через гематоэнцефалический и печеночный барьер. При данном пути введения RU-1205 проникает в головной мозг в концентрациях ниже пороговых и не определяется при изучении тканевой доступности, однако при этом наблюдается центральный анальгетический эффект, что позволяет предположить, что при биотрансформации соединения RU-1205, возможно, образуются активные метаболиты, обладающие анальгетическими свойствами. Из литературных источников известно, что для некоторых опиоидных анальгетиков характерно образование активных метаболитов [41]. Так, например, в результате глюкуронизации морфина образуются основные метаболиты морфина, один из которых – морфин-6-глюкуронид, обладает выраженными обезболивающими свойствами, превосходящими сам препарат морфин [42]. Другой опиоидный анальгетик (смешанного действия) – трамадол метаболизируется путем N- и O-деметилирования с последующей конъюгацией с глюкуроновой кислотой с образованием активного метаболита – моно-O-десметилтрамадола, который вызывает более выраженную активацию мю-рецепторов по сравнению с самим трамадолом [41]. Гидроморфон- полусинтетическое производное морфина, по фармакологическим свойствам близок к морфину, в том числе в плане биотрансформации. Он также интенсивно метаболизируется посредством глюкуронизации до гидроморфон-3-глюкуронида; другие второстепенные метаболиты включают неконъюгированный и конъюгированный дигидроморфин и дигидроизоморфин, гидроморфон-3-сульфат, норгидроморфон и нордигидроизоморфин [41]. Его метаболиты дигидроморфин и норгидроморфон обладают той же потенцией, что и морфин. Метадон – опиоид, применяемый в ряде стран как анальгетик, а также при лечении наркотической зависимости (оборот препарата в России запрещен, согласно I списку Постановления Правительства РФ № 681 от 30 июня 1998 года (ред. от 03.12.2020)), представляет собой рацемическую смесь R- и S-метадона. причем R-метадон обладает почти в 50 раз более мощным анальгетическим эффектом, нежели S-метадон. В результате окислительной биотрансформации он подвергается стереоселективному метаболизму (N-деметилированию), и с участием CYP2C19 из энантиомера S-метадона образуются метаболиты α-(3S6S)-метадол и α-(3S6S)-N-десметилметадол, последний из которых обладает анальгетической активностью, сравнимой с

R-метадоном (активный энантиомер) [42]. Анальгетик оксикодон (в пероральной форме рассматривающий до недавнего времени как альтернатива морфину, за счет менее выраженного аддитивного действия) подвергается метаболизму с N-деметилованием до нороксикодона и кодеина, O-деметилованием до оксиморфона через CYP3A4 и CYP2D6 соответственно [41, 42]. Оксиморфон дополнительно метаболизируется посредством глюкуронизации в 3-положении в оксиморфон-3-глюкуронид. Сам оксикодон и нороксикодон имеют более низкое сродство, а оксиморфон более высокое сродство к μ -опиоидному рецептору [43, 44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования были изучены основные фармакокинетические параметры соединения RU-1205 при однократном пероральном введении. Исследованы

процессы тканевого распределения изучаемого соединения по органам организма крыс, а также его экскреция. Величина абсолютной биодоступности при данном пути введения составила 37,3%. Несмотря на то, что при разработанных хроматографических условиях соединение RU-1205 при пероральном пути введения в головном мозге не обнаруживается, наблюдаемый центральный обезболивающий эффект (реализующийся в результате проникновения через гематоэнцефалический барьер) может свидетельствовать о возможном наличии активных продуктов метаболизма с анальгетической активностью. Совокупность полученных результатов позволяет полагать, что соединение RU-1205 подвергается активным процессам биотрансформации в организме животных. На основании выявленных фармакокинетических параметров исследуемого соединения возможно планирование оптимальной схемы проведения последующих клинических испытаний.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Синтез соединения RU-1205 выполнен при финансовой поддержки Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Госзадания, грант FENW-2020-0031 (0852-2020-0031)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А. Спасов – концепция и дизайн исследования, утверждение окончательного варианта статьи; О.Ю. Гречко – административная организация экспериментальной работы; Л.А. Смирнова – разработка эксперимента, редактирование текста статьи; Н.В. Елисеева – анализ фактического материала, написание текста; Ю.В. Лифанова – пробоподготовка, статистическая обработка; А.И. Ращенко – проведение экспериментальной серии по изучению фармакокинетических параметров, обработка полученных результатов; А.С. Морковник – синтез соединения, редактирование текста статьи; О.Н. Жуковская, В.А. Анисимова – синтез соединения. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Harbaugh C.M., Suwanabol P.A. Optimizing Pain Control During the Opioid Epidemic // *Surg Clin North Am.* – 2019. – Vol. 99, No.5. – P. 867–883. DOI: 10.1016/j.suc.2019.06.002.
2. Арбух Д.М., Абузарова Г.Р., Алексеева Г.С. Опиоидные анальгетики в терапии болевых синдромов (часть 1). // *Вестник анестезиологии и реаниматологии.* – 2017. – Т. 14, № 3. – С. 58–67. DOI 10.21292/2078-5658-2017-14-3-58-67.
3. Wang S. Historical Review: Opiate Addiction and Opioid Receptors // *Cell Transplant.* – 2019. – V. 28(3). – P. 233–238. DOI: 10.1177/0963689718811060.
4. Палехов А.В., Введенская Е.С. Опиоидные анальгетики: проблемы сегодняшнего дня и поиск путей их решения // *Российский журнал боли.* – 2017. – Т. 3–4, № 54. – С. 89–94.
5. FDA (Food and Drug Administration). Analysis of Long-Term Trends in Prescription Opioid Analgesic Products: Quantity, Sales, and Price Trends // *FDA Report.* – 2018. – P. 1–12. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.fda.gov/media/111695/download>.
6. Prinszano T.E., Tidgewell K, Harding W.W. Kappa opioids as potential treatments for stimulant dependence // *J. AAPS.* – 2005. – Vol. 7, No.3. – P.592–599. DOI: 10.1208/aapsj070361.
7. Grechko O.Y., Litvinov R.A., Spasov A.A., Rashchenko A.I., Shtareva D.M., Anisimova V.A. Study of μ - and δ -Opioid Activities in Agents with Various κ -Receptor Selectivity // *Bull Exp Biol Med.* – 2017. – Vol. 162, No.5. – P. 632–635. DOI: 10.1007/s10517-017-3674-5.
8. Spasov A.A., Grechko O.Yu., Shtareva D.M., Rashchenko A.I., Eliseeva N.V., Anisimova V.A. Analgesic activity of the kappa opioid receptor agonist – RU-1205 in rats // *Journal of Clinical and Health Sciences.* – 2018. – Vol. 3, No.2. – P. 13–18. DOI:10.24191/jchs.v3i2.7275.
9. Spasov A.A., Grechko O.Yu., Eliseeva N.V., Litvinov R.A., Shamshina D.D. Toxic effect of single treatment with kappa-opioid agonist, RU-1205 compound, on the neurological status of wild type mice // *JSM Clinical Pharmaceutics.* – 2017. – Vol. 3, No. 1. – 1014.
10. Thigpen J.C., Odle B.L., Hariforoosh S. Opioids: A Review of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Neonates, Infants, and Children // *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* – 2019. – Vol. 44, No.5. – P. 591–609. DOI: 10.1007/s13318-019-00552-0.
11. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекар-

- ственных средств в рамках Евразийского экономического союза. Том 2. Разработка и проведение исследований лекарственных средств – М.: Ремедиум, 2017. – 308 с.
12. Su M., Dong C., Wan J., Zhou M. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of trans-resveratrol-3-O-glucoside and its two metabolites in rats // *Phytomedicine*. – 2019. – 152882. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152882.
 13. Смирнова Л.А., Спасов А.А., Ращенко А.И., Сучков Е.А., Рябуха А.Ф., Кузнецов К.А. Аналитические особенности количественного определения производных бензимидазола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Волгоградский научно-медицинский журнал*. – 2013. – № 2 (38). – С. 9–13.
 14. Пиотровский В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики // *Фармакология и токсикология*. – 1986. – Т. 49, №5. – С. 118–127.
 15. Romita V.V., Henry J.L. Lente peripheral electrical stimulation differentially inhibits tail vs. limb withdrawal reflexes in the rat // *Brain Res*. – 1996. – Vol. 720, No.1–2. – P. 45–53. DOI: 10.1016/0006-8993(96)00105-9.
 16. Millan M.J. Kappa-opioid receptor-mediated antinociception in the rat. I. Comparative actions of mu- and kappa-opioids against noxious thermal, pressure and electrical stimuli // *J Pharmacol Exp Ther*. – 1989. – Vol. 251, No.1. – P. 334–341.
 17. Smith DA, Beaumont K, Maurer TS, Di L. Volume of Distribution in Drug Design. *J Med Chem*. 2015 Aug 13;58(15):5691-8. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00201. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25799158.
 18. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans // *Pharm Res*. – 1993. – Vol. 10, No.7. – P. 1093–1095. DOI: 10.1023/a:1018943613122.
 19. Спасов А.А., Смирнова Л.А., Гречко О.Ю., Ращенко А.И., Штарева Д.М., Анисимова В.А. Фармакокинетические и обезболивающие свойства инъекционной лекарственной формы нового производного имидазобензимидазола – соединения РУ-1205 с каптагоностической активностью // *Биомедицинская химия*. – 2015. – Т. 61. № 5. – С. 636–639. DOI: 10.18097/PBMC20156105636.
 20. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics – renal metabolic and excretion clearance // *J Pharm Pharmacol*. – 2007. – Vol. 59, No.11. – P. 1463–1471. DOI: 10.1211/jpp.59.11.0002.
 21. Stowe C.M., Plaa G.L. Extrarenal excretion of drugs and chemicals // *Annu Rev Pharmacol*. – 1968. – Vol. 8. – P. 337–356. DOI: 10.1146/annurev.pa.08.040168.002005.
 22. Minervini V., Lu H.Y., Padarti J., Osteicoechea D.C., France C.P. Interactions between kappa and mu opioid receptor agonists: effects of the ratio of drugs in mixtures // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2018. – Vol. 235, No.8. – P. 2245–2256. DOI: 10.1007/s00213-018-4920-x.
 23. Carlezon W.A. Jr., Miczek K.A. Ascent of the kappa-opioid receptor in psychopharmacology // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2010. – Vol. 210, No.2. – P. 107–108. DOI: 10.1007/s00213-010-1849-0.
 24. Shippenberg T.S., Zapata A., Chefer V.I. Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction // *Pharmacol Ther*. – 2007. – Vol. 116, No.2. – P. 306–21. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.06.011.
 25. Margolis E.B., Karkhanis A.N. Dopaminergic cellular and circuit contributions to kappa opioid receptor mediated aversion // *Neurochem Int*. – 2019. – Vol. 129. – 104504. DOI: 10.1016/j.neuint.2019.104504.
 26. Siuda E.R., Carr R. 3rd, Rominger D.H., Violin J.D. Biased mu-opioid receptor ligands: a promising new generation of pain therapeutics // *Curr Opin Pharmacol*. – 2017. – Vol. 32. – P. 77–84. DOI: 10.1016/j.coph.2016.11.007.
 27. Bruchas M.R., Chavkin C. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2010. – Vol. 210, No.2. – P. 137–147. DOI: 10.1007/s00213-010-1806-y.
 28. Bedini A., Di Cesare Mannelli L., Micheli L., Baiula M., Vaca G., De Marco R., Gentilucci L., Ghelardini C., Spampinato S. Functional Selectivity and Antinociceptive Effects of a Novel KOPr Agonist // *Front Pharmacol*. – 2020. – Vol. 11. – 188. DOI: 10.3389/fphar.2020.00188.
 29. Maillet E.L., Milon N., Heghinian M.D., Fishback J., Schürer S.C., Garamszegi N., Mash D.C. Noribogaine is a G-protein biased κ -opioid receptor agonist // *Neuropharmacology*. – 2015. – Vol. 99. – P. 675–688. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.032.
 30. Markham A. Olliceridine: First Approval // *Drugs*. – 2020. – Vol. 80, No.16. – P. 1739–1744. DOI: 10.1007/s40265-020-01414-9. e. 537, 185–190 (2016). DOI: 10.1038/nature19112.
 31. Ehrich J.M., Messinger D.I., Knakal C.R., Kuhar J.R., Schattauer S.S., Bruchas M.R., Zweifel L.S., Kieffer B.L., Phillips P.E., Chavkin C. Kappa Opioid Receptor-Induced Aversion Requires p38 MAPK Activation in VTA Dopamine Neurons // *J Neurosci*. – 2015. – Vol. 35, No.37. – P. 12917–12931. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2444-15.2015.
 32. Bruchas M.R., Land B.B., Aita M., Xu M., Barot S.K., Li S., Chavkin C. Stress-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation mediates kappa-opioid-dependent dysphoria // *J Neurosci*. – 2007. – Vol. 27, No.43. – P. 11614–11623. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3769-07.2007.
 33. Shanware N.P., Williams L.M., Bowler M.J., Tibbetts R.S. Non-specific in vivo inhibition of CK1 by the pyridinyl imidazole p38 inhibitors SB 203580 and SB 202190 // *BMB Rep*. – 2009. – Vol. 42, No.3. – P. 142–147. DOI: 10.5483/bmbrep.2009.42.3.142.
 34. Гречко О.Ю., Спасов А.А., Анисимова В.А., Петров В.И., Васильев П.М., Елисеева Н.В., Жуковская О.Н. 2-п-фторфенилимидазо[1,2-а]бензимидазол – перспективный скаффолд для создания селективных капта-опиоидных агонистов // В книге: XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Тезисы докладов в 5 томах. Уральское отделение Российской академии наук. – 2016. – С. 482.
 35. Анисимова В.А., Спасов А.А., Толпыгин И.Е., Минкин В.И., Черников М.В. и др. Синтез и фармакологическая активность 9-R-2-галогенфенилимидазо[1,2-а]бензимидазолов // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2010. – Т. 44, № 7. – С. 7–13. DOI:10.30906/0023-1134-2010-44-7-7-13
 36. Спасов А.А., Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., Васильев П.М., Анисимова В.А. Новый класс агонистов капта-опиоидных рецепторов // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2010. – Т. 73, № 5. – С. 8–9.
 37. Середенин С.Б., Виглинская А.О., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Кравцова О.Ю., Жердев В.П. Фармакокинетика афобазола у крыс // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2007. – Т. 70, № 2. – С. 59–64.
 38. Середенин С.Б., Виглинская А.О., Можаяева Т.Я., Колы-

- ванов Г.Б., Литвин А.А., Авдюнина Н.И., Савельев В.Л., Жердев В.П. Метаболизм афобазола у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 7, № 2. – С. 50–52. DOI: 10.30906/0869-2092-2008-71-2-50-52
39. Сереброва С.Ю., Стародубцев А.К., Писарев В.В., Кондратенко С.Н., Василенко Г.Ф., Добровольский О.В. Фармакокинетика, продолжительность антисекреторного эффекта омепразола и эзомепразола, вероятные причины их изменений при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2009. – Т. 4. – С. 86–92.
40. Смирнова Л.А., Ращенко А.И., Рябуха А.Ф., Кузнецов К.А., Сучков Е.А. Количественное определение нового агониста κ-опиоидных рецепторов производного бензимидазола // В книге: Инновации в современной фармакологии. IV съезд фармакологов России. – 2012. – С. 171–172.
41. Smith H.S. The metabolism of opioid agents and the clinical impact of their active metabolites. Clin J Pain. – 2011. – Vol. 27, No.9. – P. 824–838. DOI: 10.1097/AJP.0b013e31821d8ac1.
42. Sverrisdóttir E., Lund T.M., Olesen A.E., Drewes A.M., Christrup L.L., Kreilgaard M. A review of morphine and morphine-6-glucuronide's pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in experimental and clinical pain // Eur J Pharm Sci. – 2015. – Vol. 74. – P. 45–62. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.03.020. Epub 2015 Apr 7.
43. Coller J.K., Christrup L.L., Somogyi A.A. Role of active metabolites in the use of opioids // Eur J Clin Pharmacol. – 2009. – Vol. 65, No.2. – P. 121–139. DOI: 10.1007/s00228-008-0570-y.
44. Lalovic B., Phillips B., Risler L.L., Howald W., Shen D.D. Quantitative contribution of CYP2D6 and CYP3A to oxycodone metabolism in human liver and intestinal microsomes // Drug Metab Dispos. – 2004. – Vol. 32, No.4. – P. 447–454. DOI: 10.1124/dmd.32.4.447.

АВТОРЫ

Спасов Александр Алексеевич – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7185-4826. E-mail: aspasov@mail.ru

Смирнова Людмила Андреевна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией фармакологической кинетики НИИ фармакологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0950-8519. E-mail: smirlusi@yandex.ru

Гречко Олеся Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-4184-4897. E-mail: olesia-grchko@mail.ru

Елисеева Наталья Владимировна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-2243-5326. E-mail: nvkirillova@rambler.ru

Лифанова Юлия Викторовна – ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО

«Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9663-5067. E-mail: j_semenova_pharm@mail.ru

Ращенко Андрей Игоревич – кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии антиоксидантных средств НИИ фармакологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-8357-4007. E-mail: a.rashencko@yandex.ru

Жуковская Ольга Николаевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории органического синтеза НИИ физической и органической химии Южного федерального университета. ORCID ID: orcid.org/0000-0003-2485-2139. E-mail: zhukowskaia.ol@yandex.ru

Морковник Анатолий Савельевич – доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории органического синтеза НИИ ФОХ ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет». ORCID ID: 0000-0002-9182-6101. E-mail: asmorkovnik@sfedu.ru

Анисимова Вера Алексеевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории органического НИИ ФОХ ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет». ORCID ID: 0000-0002-0877-4575

УДК 547.814.5:544.18



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ (НО•) АКТИВНОСТИ РОДСТВЕННЫХ СТРУКТУР, СОДЕРЖАЩИХ ЦИННАМОИЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ. IV. ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ МЕЖДУ ИНДЕКСАМИ НЕНАСЫЩЕННОСТИ И ПРОИЗВОДНЫМИ ФЛАВОНА С ФЛОРОГЛЮЦИНОВЫМ КОЛЬЦОМ «А»

Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

E-mail: edwardov@mail.ru

Получено 20.07.2020

Принята к печати 15.01.2021

Изучены квантово-химические параметры 52 производных, относящихся к флаванонам, флаванололам, флавонам и флавонолам с флороглюциновым типом кольца «А», и содержащими электронодонорные заместители в кольце «В». **Цель.** Анализ динамики изменения электронной плотности, связей чисел, индексов свободной валентности и ненасыщенности на атомах углерода C-7→C-8 виниленовой группы главной цепи сопряжения во взаимосвязи с положением и числом заместителей в кольце «В» и видом фармакологической активности.

Материалы и методы. Квантово-химические параметры анализируемых 4-х групп соединений рассчитаны полуэмпирическим методом PM7 (программа WinMopas 2016) на рабочей станции с процессором IntelXeonE5-1620 3,5 ГГц, 20 Гб оперативной памяти.

Результаты и обсуждение. При сопоставлении квантово-химических параметров анализируемых соединений установлено, что при формировании кратной связи C-7→C-8 индексы свободной валентности и ненасыщенности возрастают на обоих углеродных атомах виниленовой группы у флавонов и флавонолов по сравнению с соответствующими флаванонами и флаванололами. Это объясняется тем, что величина связей чисел N_{μ} на этих атомах, наоборот, уменьшается ($F_{\mu}=4,732-N_{\mu}$). Переход от флаванона к флавону сопровождается формированием виниленовой группы C-7→C-8, в связи с чем оба атома из sp^3 -гибридизованного состояния переходят в sp^2 -состояние. Следствием такой трансформации является изменение значения электроотрицательности и увеличением индекса ненасыщенности атомов C-7 и C-8: $C\ sp^3=2,5$; $C\ sp^2=2,8$. Вместе с тем переход от флаванона к флавону приводит к образованию сопряженной системы с участием π -электронов ароматического ядра «В», атомов C-7, C-8 и карбонила что принято называть «главной цепью сопряжения». Указанные структурные изменения, а именно, переход от менее окисленного флаванона к более окисленному флавону способствует уменьшению электронной плотности на атомах C-7 и C-8, и увеличению суммарной ненасыщенности молекул в целом. Малликовские заряды на C-7 всех групп соединений характеризуются положительным значением. Что касается атомов углерода фрагмента «В», то здесь выявлены следующие особенности: при наличии одного заместителя –ОН или –ОСН₃ на атоме углерода, с которым связан заместитель, Малликовский заряд – положительный; если в кольце «В» имеются два заместителя –ОН или –ОСН₃, а также две –ОСН₃ группы, то атомы углерода, связанные с указанными заместителями, тоже имеют положительный Малликовский заряд; в случае тригидроксизамещенных у C-2', C-3' и C-4' кольца «В» все три атома углерода характеризуются положительным Малликовским зарядом; если в положениях C-2', C-3' и C-4' находятся метоксигруппы, то положительный Малликовский заряд сосредоточен только на атомах C-2' и C-4', а на C-3' этот заряд имеет отрицательное значение.

Заключение. Перечисленные выше данные о квантово-химических параметрах главной цепи сопряжения свидетельствуют о том, что переход атомов C-7 и C-8 в sp^2 -гибридное состояние приводит к понижению электронной плотности и уменьшению величин связей чисел, при одновременном увеличении индексов ненасыщенности и свободной валентности на этих атомах. Таким образом, пусковой механизм антирадикальной активности, в первую очередь в отношении радикала НО•, определяется тем, что эта электрофильная по своим свойствам частица при первичной атаке присоединится по положению C-8.

Ключевые слова: флаваноны; флаванололы; флавоны; флавонолы; флороглюциновый тип кольца «А»

Список сокращений: F_{μ} – индексы свободной валентности; IUA – индекс ненасыщенности; ЭО – электроотрицательность; N_{μ} – суммарные значения связей чисел; V_{μ} – теоретическая валентность.

Для цитирования: Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин. Использование квантово-химических параметров для прогнозирования антирадикальной (НО•) активности родственных структур, содержащих циннамоильный фрагмент. IV. Взаимосвязь структура-активность между индексами ненасыщенности и производными флавонов с флороглюциновым кольцом «А». *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):161-169. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-161-169

© Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин, 2021

For citation: E.T. Oganessian, S.S. Shatokhin. Using quantum-chemical parameters for predicting antiradical (HO•) activity of related structures containing a cinnamoyl fragment. IV. Structure-activity relationship between unsaturation indices and flavone derivatives with floriglucan ring "A". *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(2):161-169. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-161-169

USING QUANTUM-CHEMICAL PARAMETERS FOR PREDICTING ANTIRADICAL (HO•) ACTIVITY OF RELATED STRUCTURES CONTAINING A CINNAMOIL FRAGMENT.

IV. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP BETWEEN UNSATURATION INDICES AND FLAVONE DERIVATIVES WITH FLOROGLUCIN RING “A”

E.T. Oganesyanyan, S.S. Shatokhin

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

E-mail: edwardov@mail.ru

Received 20 Jul 2020

Accepted 15 Jan 2021

The quantum-chemical parameters of 52 derivatives related to flavanones, flavanones, flavones and flavonols with a phloroglucinic type of the A ring and containing electron-donating substituents in the B ring were studied.

The aim is the analysis of the dynamics of changes in the electron density, bond numbers, free valence indices and unsaturation indices on carbon atoms C-7→C-8 of the vinyl group of the main conjugation chain in relation to the position and number of substituents in the “B” ring and the type of the pharmacological activity.

Materials and methods. The quantum-chemical parameters of the 4 analyzed groups of the compounds, have been calculated by the semi-empirical method PM7 (WinMopac 2016 program) on the workstation with an Intel Xeon E5-1620 3.5 GHz processor, 20 GB of RAM.

Results and discussion. When comparing the quantum chemical parameters of the analyzed compounds, it was established that when the C-7→C-8 multiple bond is formed, the free valency and unsaturation indices increase on both carbon atoms of the vinylene group in flavones and flavonols compared to the corresponding flavanones and flavanonols. This is explained by the fact that the value of the bond numbers N_{μ} on these atoms, on the contrary, decreases ($F_{\mu} = 4.732 - N_{\mu}$). The transition from flavanone to flavone is accompanied by the formation of a vinyl group C-7→C-8, and therefore both atoms from the sp^3 -hybridized state go into the sp^2 -state. The consequence of this transformation is a change in the electronegativity value and an increase in the unsaturation index of C-7 and C-8 atoms: $C\ sp^3 = 2.5$; $C\ sp^2 = 2.8$. At the same time, the transition from flavanone to flavone leads to the formation of a conjugated system with the participation of π -electrons of the aromatic system “B”, C-7, C-8 atoms and the carbonyl group, which is commonly called the “main conjugation chain”. These structural changes, namely, the transition from a less oxidized flavanone to a more oxidized flavone, contribute to a decrease in the electron density on C-7 and C-8 atoms, and an increase in the total unsaturation of the molecules in general. Mulliken charges on C-7 of all groups of compounds are characterized by a positive value. As for the carbon atoms of the B fragment, the following features are revealed here: in the presence of one substituent –OH or –OCH₃ on the carbon atom to which the substituent is bounded, the Mulliken charge is positive; if there are two substituents in the B ring –OH or –OCH₃, as well as two –OCH₃ groups, then the carbon atoms bonded to the indicated substituents also have a positive Mulliken charge; in the case of trihydroxy substituted in the C-2, C-3 and C-4 B ring, all three carbon atoms are characterized by a positive Mulliken charge; if there are methoxy groups in positions C-2, C-3 and C-4, then the positive Mulliken charge is concentrated only on C-2 and C-4 atoms, and on C-3 atom this charge has a negative value.

Conclusion. The above data on the quantum-chemical parameters of the main conjugation chain indicate that the transition of C-7 and C-8 atoms to the sp^2 -hybrid state, leads to a decrease in the electron density and a decrease in the bond numbers, with a simultaneous increase in the indices of unsaturation and free valence on these atoms. Thus, the trigger mechanism of the anti-radical activity, primarily with respect to the HO• radical, is determined by the fact that this particle, electrophilic in its properties, will attach in the C-8 atom during an initial attack.

Keywords: flavanones, flavanones, flavones, flavonols, phloroglucinic type of the A ring

Abbreviations: F_{μ} – free valence indices; IUA – unsaturation index; EO – electronegativity; N_{μ} – the total values of the bond numbers; V_{μ} – theoretical valence.

ВВЕДЕНИЕ

В завершающем IV сообщении обобщены результаты исследования взаимосвязи между строением соединений, содержащих флороглюциновый тип кольца «А» и электронодонорные заместители в кольце «В» с суммарными величинами индексов ненасыщенности (IUA) и электронной плотности.

ЦЕЛЬ.

Анализ динамики изменения электронной плотности, связевых чисел, индексов свободной валентности и ненасыщенности на атомах углерода C-7→C-8 виниленовой группы главной цепи сопряжения во взаимосвязи с положением и числом заместителей в кольце «В» и видом фармакологической активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Квантово-химические параметры анализируемых 4-х групп соединений рассчитаны полуэмпирическим методом PM7 (программа WinMopas 2016) на рабочей станции с процессором IntelXeonE5-1620 3,5 ГГц, 20 Гб оперативной памяти.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структуры анализируемых соединений и суммарные значения перечисленных параметров на участке C-1→C-9 циннамоильного фрагмента представлены в таблице 1.

Из данных таблицы следует, что при переходе от флаванонов к флаванонолам значения теоретической валентности (V_m) и IUA изменяются очень незначительно (второй знак после запятой ~0,04), несмотря на то, что у флавананола при C-8 появляется электронодонорная ОН-группа, что способствует повышению электронной плотности на C-7 и понижению на C-8. У пары флавон-флавонол введение енольного гидроксила у C-8 способствует явному увеличению значения IUA, увеличению электронной плотности на C-7 и ее снижению на C-8.

Величина V_m остается практически неизменной, в том числе и у пары флаванон-флаванол.

Такая особенность сохраняется у всех типов соединений, представленных в таблице 1 и по этой причине далее параметр V_m нами рассматриваться не будет.

Весь последующий период, после опубликования пионерских исследований Сент-Джёрджи в 1936 г. о биологических свойствах некоторых флавоноидов, позволил накопить обширную информацию о представителях данного класса природных соединений.

В настоящее время описана структура примерно 8000 флавоноидов [1–6] и из этого многообразия агликонов и гликозидов лишь очень незначительное число индивидуальных веществ (примерно 2–3%) подробно изучены биохимически и фармакологически. Такой низкий процент изученности можно объяснить тем, что в подавляющем большинстве растений содержание индивидуальных веществ мизерный (0,1–2%) и их получение в достаточных количествах с целью последующего биохимического и фармакологического изучения связано с большими материальными затратами.

Как правило, подробные сведения о биологических свойствах индивидуальных соединений – производных 2-фенил-бенз-γ-пирона касаются тех веществ, которые из исходного сырья могут быть получены препаративно (кверцетин и рутин из софоры японской, травы гречихи; таксифолин, или дигидрокверцетин, из лиственницы сибирской; гесперитин и гесперидин – из пульпы – губчатой части корок цитрусовых; диосмин – окислением гесперитина и т.д.).

Все же самым характерным и, пожалуй, наиболее важным считается антиоксидантные свойства флавоноидов, опосредованное влияние которых проявляется, примерно, 50 видами фармакологической активности [7–10].

Следует отметить тот факт, что на протяжении всего своего эволюционного развития человек, употребляя растительную пищу, привносит в свой организм флавоноиды, которые предохраняют клетки от оксидантного стресса и тем самым нормализуют их метаболизм.

Таким образом, флавоноиды являются своеобразным защитным щитом естественной антиоксидантной системы организма, а это имеет важное значение для сохранения всей клеточной системы.

Применяемые в настоящее время лечебные и лечебно-профилактические средства на основе флавоноидов представляют собой либо их суммарные субстанции – легалон, карсил, силибор, флакумин и др. (чаще всего), либо индивидуальные соединения – рутин, кверцетин, флаворонин и др.¹ Эти средства не являются препаратами немедленного действия, поэтому их лечебный эффект проявляется, как правило, в процессе длительного применения (детралекс, троксевазин). Широко распространенные в природе производные 2-фенил-бенз-γ-пирона представлены в виде гликозидов и их агликонов, причем гликозиды численно преобладают.

Следует подчеркнуть, что фармакологически активным фрагментом в флавоноидных гликозидах является неуглеводный остаток, т.е. агликон, поэтому нет необходимости рассуждать о тех огромных экономических затратах, которые понадобились бы для подробного изучения биологических свойств хотя бы одной сотни агликонов, производных 2-фенил-бенз-γ-пирона. Подобное занятие непродуктивно, так как вряд ли следует ожидать выявления новых свойств этих соединений. Более того, если сопоставить известные данные о биологической активности изученных флавонов, флаванонов, флаванолах и флаванонолах с данными прогноза по PASS [11], то наиболее общими для всех типов структур являются такие виды активности, как противовоспалительная, антиоксидантная, гепатопротекторная, желчегонная, связывание свободных радикалов, агонист апоптоза, агонист целостности мембран, ингибиторы проницаемости мембраны, антимуtagenная, капилляроукрепляющая.

Заменить индивидуальные соединения можно суммарными флавоноидными субстанциями, полученными из соответствующих производящих растений, поскольку, зачастую, эффект сохраняется, а иногда и превосходит ожидаемый результат.

Сведения об антирадикальной ($HO\bullet$) активности флавоноидов разрознены и, как правило, немногочисленны. Более того, в работах, не взаимосвязанных между собой, авторы используют разные методы генерирования данного радикала, что не позволяет количественно оценить и сравнивать между собой полученные результаты.

¹ Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>

Таблица 1 – Суммарные значения $N\mu$ (связевые числа), $V\mu$ (теорет. валентность), IUA (индекс ненасыщенности) и электронной плотности на атомах углерода главной цепи сопряжения (C-1→C-9)*

№ п/п	Заместители	флаванон 1					флаванон 2					флаванон 3					флаванон 4				
		R_1	R_2	R_3	R_4	$N\mu$	$V\mu$	IUA	Эл.пл.	$N\mu$	$V\mu$	IUA	Эл.пл.	$N\mu$	$V\mu$	IUA	Эл.пл.	$N\mu$	$V\mu$	IUA	Эл.пл.
1	H	H	H	H	H	34,48	35,53	1,05	36,502	34,24	35,5	1,27	36,287	34,41	35,51	1,09	36,208	34,18	35,56	1,38	36,059
2	OH	H	H	H	H	34,24	35,4	1,15	36,27	34,00	35,34	1,34	36,021	34,17	35,36	1,19	35,906	33,95	35,41	1,46	35,787
3	CH ₃ O	H	H	H	H	34,28	35,45	1,16	36,252	34,02	35,37	1,36	36,083	34,17	35,38	1,21	35,932	34,02	35,5	1,49	35,828
4	H	OH	H	H	H	34,24	35,4	1,16	36,297	34,06	35,44	1,38	36,049	34,2	35,5	1,3	35,965	33,99	35,45	1,49	35,821
5	H	CH ₃ O	H	H	H	34,23	35,42	1,19	36,337	34,05	35,45	1,41	36,091	34,19	35,42	1,23	36,001	33,68	35,5	1,82	35,861
6	H	H	OH	H	H	34,22	35,38	1,15	36,273	33,98	35,33	1,35	36,033	34,18	35,37	1,19	35,942	33,94	35,4	1,47	35,798
7	H	H	CH ₃ O	H	H	34,22	35,39	1,16	36,314	33,96	35,34	1,38	36,076	34,17	35,39	1,19	35,979	33,92	35,42	1,5	35,839
8	H	OH	OH	H	H	34,14	35,41	1,26	36,025	33,93	35,41	1,48	35,786	34,1	35,4	1,3	35,691	33,88	35,47	1,59	35,552
9	H	CH ₃ O	OH	H	H	34,13	35,42	1,29	36,057	33,91	35,42	1,51	35,823	34,09	35,42	1,33	35,728	33,86	35,48	1,62	35,588
10	H	OH	CH ₃ O	H	H	34,14	35,42	1,28	36,057	33,93	35,42	1,49	35,823	34,1	35,41	1,32	35,724	33,87	35,48	1,61	35,587
11	H	CH ₃ O	CH ₃ O	H	H	34,14	35,42	1,29	36,084	33,9	35,43	1,53	36,861	34,09	35,43	1,34	35,764	33,85	35,49	1,64	35,624
12	H	OH	OH	OH	H	33,98	35,318	1,33	35,786	33,81	35,37	1,56	35,547	33,95	35,32	1,37	35,45	33,75	35,42	1,67	35,312
13	H	CH ₃ O	CH ₃ O	CH ₃ O	H	33,93	35,32	1,39	35,898	33,75	35,37	1,62	35,661	33,9	35,33	1,43	35,562	33,7	35,42	1,73	35,425

Таблица 2 – Антирадикальная (НО•) активность некоторых производных флавонола и флавонола*

Соединения, для которых экспериментально выявлена антирадикальная (НО•) активность *	Антирадикальная (НО•) активность, установленная экспериментально* А, %	Суммарные значения связевых чисел ($N\mu$), теоретической валентности ($V\mu$), индексов ненасыщенности (IUA) и электронной плотности на атомах углерода главной цепи сопряжения			
		4	$N\mu$	$V\mu$	Эл.плот.
1 Флавонол (незамещенный)					
2 апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавонол)		34	34,27	35,53	1,26
3 диосметин (5,7,3'-тригидроксифлавонол)		39	33,98	35,33	1,35
4 5,7-дигидроксифлавонол		28	33,93	35,42	1,49
5 мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонол)		50	33,75	35,37	1,62
6 кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонол)		48	33,75	35,42	1,67
7 рамнетин (3,5,3',4'-тетрагидроксифлавонол)		46	33,88	35,47	1,59
8 морин (3,5,7,2',4'-пентагидроксифлавонол)		40	33,88	35,474	1,589
9 кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифлавонол)		20	33,641	35,173	1,532
10 лютеолин (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонол)			33,93	35,41	1,48

Примечание: * – для соединений 1–9 представлены данные в соответствии с Housine... [12]; ** – сведения об активности в отношении радикала (НО•) отсутствуют

Таблица 3 – Прогнозируемые виды активности по PASS

№ п/п	Соединения, для которых экспериментально выявлена антирадикальная (НО•) активность (А, %) согласно [11]	Активность	Соединения и вероятность проявления ими прогнозируемой активности								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Флавоны* (незамещенный) 4	Antimutagenic	0,795	0,921	0,943	0,931	0,963	0,940	0,952	0,947	0,948
2	Апигенин 34		0,547	0,64	0,627	0,612	0,720	0,689	0,667	0,680	0,676
3	Диосметин 39		0,732	0,683	0,683	0,651	0,924	0,872	0,798	0,850	0,856
4	5,7-дигидрокси-3',4',5'-триметоксифлавоны 28	Antiinflammatory	0,719	0,808	0,808	0,784	0,832	0,811	0,839	0,759	0,771
5	Флавонолы		0,947	0,967	0,956	0,944	0,968	0,973	0,966	0,974	0,974
6	Мирицетин 50		0,914	0,946	0,952	0,959	0,959	0,938	0,954	0,956	0,957
7	Кверцетин 48	Free radical scavenger	0,720	0,847	0,851	0,860	0,915	0,887	0,877	0,886	0,881
8	Рамнетин 46		0,539	0,539	0,539	0,569			0,529		0,530
9	Морин 40		0,650	0,692	0,692	0,607	0,705	0,737	0,726		0,705
10	Кемпферол 20	Membrane integrity agonist	10	11	12	13	15	16	17	14	18
11	Флаванон (незамещенный)		0,537	0,857	0,883	0,881	0,917	0,920	0,916	0,910	0,895
12	Нарингенин (дигидроапигенин)		0,602	0,660	0,691	0,640	0,628	0,737	0,692	0,685	0,722
13	Эриодиктиол (дигидролютеолин)	Apoptosis agonist	0,550	0,794	0,817	0,746	0,938	0,961	0,919	0,832	0,946
14	Гесперитин (дигидродиосметин)		0,514	0,769	0,809	0,878	0,877	0,901	0,925	0,830	0,831
15	5,7,3',4',5'-пентагидроксифлаванон (таксифолин)**		0,935	0,964	0,962	0,952	0,973	0,969	0,966	0,956	0,975
16	Дигидрокверцетин (таксифолин)**	Inhibitor membrane permeability	0,748	0,851	0,877	0,874	0,850	0,834	0,848	0,830	0,823
17	Дигидромирицетин (ампелопсин)		0,520	0,709	0,790	0,780	0,795	0,835	0,785	0,800	0,766
18	3,5,7,3'-тетрагидрокси-4'-метоксифлаванон		0,712	0,714	0,634	0,653	0,687	0,644	0,706	0,594	0,759
19	Дигидрокемпферол (аромадендрин)	Capillary fragility treatment	0,510	0,577	0,577	0,566	0,714	0,668	0,707	0,690	0,668

Примечание: * – соединения 2→4 – производные флавоны; ** – соединения 16–18 – производные флаванолов

Таблица 4 – Прогнозируемые по PASS виды активности некоторых флаванонов

№ п/п	Соединения*	Противовирусная активность	Противоопухолевая активность	Суммарные значения связей чисел (N _μ), теоретической валентности (V _μ), индексов ненасыщенности (IUA) и электронной плотности на атомах углерода главной цепи сопряжения		
				N _μ	V _μ	IUA
1	Флаванон (незамещенный)	Influenza (0,555) Rhinovirus (0,578)	Antineoplastic (0,578)	34,48	35,53	1,05
2	Нарингенин (дигидроапигенин)	Influenza (0,691) Rhinovirus (0,611)	Antineoplastic (0,751) Anticarcinogenic (0,690)	34,22	35,38	1,15
3	Гесперитин (дигидродиосметин)	Influenza (0,673) Rhinovirus (0,564) Herpes (0,503)	Antineoplastic (0,772) Anticarcinogenic (0,783)	34,14	35,42	1,28
4	5,7-дигидрокси-3',4',5'-триметоксифлаванон	Вероятность прогноза ниже 0,500	Antineoplastic (0,628) Anticarcinogenic (0,514)	33,93	35,32	1,39
5	Дигидромирицетин (ампелопсин)	Influenza (0,659) Herpes (0,508)	Antineoplastic (0,781) Anticarcinogenic (0,837)	33,95	35,32	1,37
6	Дигидрокверцетин (таксифолин)	Rhinovirus (0,503) Influenza (0,620)	Antineoplastic (0,790) Anticarcinogenic (0,690)	34,1	35,4	1,3
7	дигидрорамнетин	Rhinovirus (0,510) Influenza (0,625)	Antineoplastic (0,800) Anticarcinogenic (0,695)	34,2	35,42	1,3
8	3,5,7,2',4'-пентагидроксифлаванон	Herpes (0,543) Hepatit B (0,505)	Antineoplastic (0,808) Anticarcinogenic (0,796)	34,35	35,42	1,33
9	Дигидрокемпферол (аромадендрин)	Rhinovirus (0,528) Influenza (0,617)	Antineoplastic (0,715) Anticarcinogenic (0,792)	34,18	35,37	1,19
10	Эриодиктиол (дигидролютеолин)	Rhinovirus (0,590)	Antineoplastic (0,763) Anticarcinogenic (0,775)	34,14	35,41	1,26
11	3,5,7,3' -тетрагидрокси-4'-метоксифлаванон	Influenza (0,573)	Antineoplastic (0,747) Anticarcinogenic (0,835)	34,1	35,41	1,32

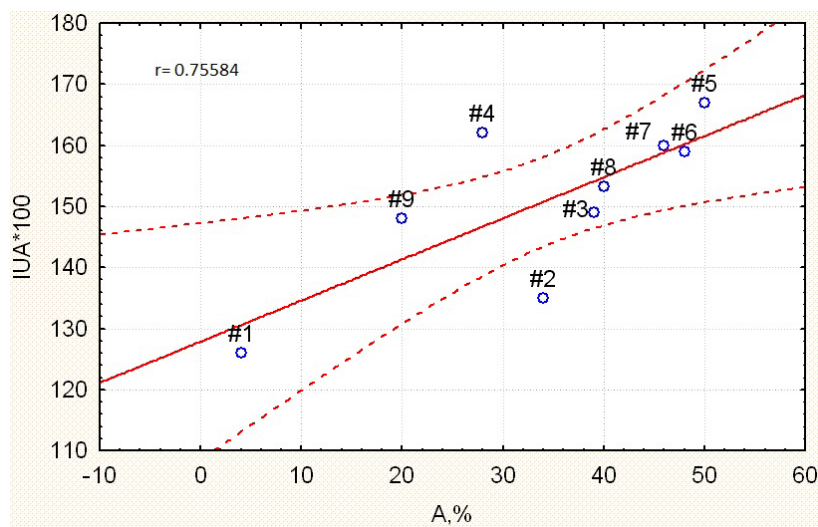


Рисунок 1 – Функциональная зависимость между Σ_{IUA} циннамоильного фрагмента соединений 1–9 (табл. 2) и уровнем их антирадикальной активности (НО•)

Наиболее информативными являются работы [12] и [13], где представлены сведения об активности репрезентативных групп соединений.

В работе Husaine и др. [12] на одной модели изучена антирадикальная активность девяти производных флавонола (таблица 2), представляющих собой агликоны. Как видно из данных таблицы наиболее активным является мирицетин, а далее с небольшим отставанием следуют кверцетин, рамнетин и морин. Все четыре агликона относятся к флавонолам, однако, если первые три вещества в кольце «В» содержат орто-дигидроксигруппировку в положении 3', 4' (активность соответственно 50, 48, 46), то у морины гидроксигруппы в кольце «В» находятся у С-2' и С-4', что, по-видимому, сказывается на активности.

Кемпферол, также относящийся к флавонолам, содержит только одну ОН-группу в положении 4', а отсюда и низкая активность, которая в 2,5 раза меньше, чем у мирицетина.

Апигенин и диосметин не являются флавонолами: в положениях 5 и 7 они содержат гидроксигруппы, а в кольце «В» у апигенина одна ОН-группа у С-4', а у диосметина – 3'-ОН и 4'-ОСН₃. У незамещенного флавонола активность сведена к минимуму и равна 4. Хотя и информация, изложенная в работе [12] весьма ограниченная, однако при сопоставлении этих данных между собой можно утверждать, что антирадикальная активность флавонолов выше, чем у флавонов; орто-замещение в кольце «В» типа 3',4'-ди ОН или 3'-ОН, 4'-ОСН₃ способствует усилению антирадикальной активности.

С целью расширения информации о других видах биологической активности соединений, представленных в таблице 2 и соответствующих им производных флаванона была использована программа PASS [11], которая позволила выявить другие виды активности, представленные в таблицах 3 и 4. Здесь приведены только те виды, вероятность проявления которых не ниже 0,5.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для анализируемых производных флавонола и флаванона наиболее характерны такие виды активности, которые для них в разное время были выявлены экспериментально.

Для перечисленных в таблице 4 флавоноидов характерна также противораковая (Antineoplastic, Anticarcinogenic, Cytoprotectant) активность.

Имея столь обширную информацию о различных видах биологической активности следовало бы изучить функциональные зависимости между одним из квантово-химических параметров и уровнем активности. К сожалению, выявлять корреляционные взаимосвязи среди столь ограниченного числа соединений, различающихся между собой наличием енольного гидроксила у С-3, некорректно, потому что из 9 соединений только 4 представлены флавонами, а 5 – флавонолами.

Особо следует отметить прогноз противовирусной активности (табл. 4) анализируемых структур, у которых ядро «А» представлено флороглюциновым фрагментом: практически для всех соединений характерна активность против вируса гриппа и риновируса. У отдельных соединений отмечается активность в отношении вируса «Герпес» и «Гепатита В».

В настоящее время и ближайшей перспективе актуальной задачей будет являться поиск профилактических средств против различных коронавирусных инфекций. В этой связи особое значение приобретают исследования с применением компьютерных технологий, в частности молекулярного докинга.

Важным структурным признаком эриодиктиола является наличие ортодигидроксигруппы в положениях 3', 4' кольца «В», которая и связывается с S-белком SARS-CoV-2 [6].

В работе Wu и др. [14] приведены результаты изучения некоторых природных соединений с антивирусным и противовоспалительным действием. Установлена высокая аффинность связывания с 3CLpro

таких флавоноидов, как 7-О-глюкуронид хризина, гесперидин и неогесперидин. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти соединения могут быть потенциальными ингибиторами 3CLpro и, вероятно, могут быть использованы для профилактики и лечения инфекции, вызванной SARS-CoV2. Аналогичную активность показали также ликофлавонол (из сое-лодки уральской), космосин и мангостин (из *Garcinia mangostana* L.). Более того, гесперидин может препятствовать взаимодействию ACE2 с RBD.

Авторами также выявлена высокая аффинность связывания вогонин-7-глюкуронида (вагонозида) и витексина (8-С-глюкопиранозидапигенина) с тремя белками Nsp1, Nsp3 и ORF7, которые являются факторами вирулентности коронавируса. Авторами также показано, что из проанализированных 3500 соединений наиболее высокую аффинность по отношению к различным целевым белкам проявляют антибактериальные, противовоспалительные и противовирусные вещества и в их числе силибин, гесперидин, неогесперидин, байкалин, кемпферол-3-рутинозид и рутин. Это свидетельствует о том, что указанные соединения могут оказаться полезными для лечения SARS-CoV-2 [15–17].

С нашей точки зрения, специалистам-вирусологам, располагающим соответствующими возможностями, стоит обратить внимание, на природные полифенольные соединения, которые содержат орто-дигидроксигруппы в ароматическом ядре «В». К числу таких веществ относятся кофейная кислота, таксифолин (дигидрокверцетин), амиелопсин (дигидромирицетин), рамнетин, морин, лютеолин, физетин, робинетин и др. Конечно, иметь на перспективу в достаточных количествах перечисленные индивидуальные соединения вряд ли будет возможно с экономической точки зрения.

Ранее нами были опубликованы работы, посвященные анализу квантово-химических характеристик производных коричной кислоты во взаимосвязи с их антирадикальной (ОН*) активностью [13] и возможными путями метаболизма. Полученные данные явились обоснованием для прогноза и последующего синтеза нового производного коричной кислоты, которое по способности ингибирования реакции генерации супероксидного анион-радикала оказалось активнее аскорбиновой кислоты ($C1/2=27,5$ мкМ), кофейной кислоты ($C1/2=15,7$ мкМ). Полученное новое соединение ($C1/2=9,8$ мкМ) пространственно затрудненную фенольную ОН-группу, расположенную между двумя трет-бутильными заместителями и представляет собой 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутил-коричную кислоту. [18] Здесь же показано, что между уровнем антиоксидантной активности и суммарной степенью ненасыщенности изученных производных коричной кислоты существует линейная зависимость с коэффициентом корреляции 0,911.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Остаток коричной кислоты в структуре флавоноидов составляет главную цепь сопряжения и, как

показали наши исследования, у замещенной коричной кислоты квантово-химические характеристики практически совпадают с таковыми циннамоильного фрагмента флавонов, флавонолов и флаванонов с аналогичными заместителями и с таким же типом замещения в кольце «В». [19]

Несмотря на малое число родственных структур в таблице 2 (1-4-флавоны, 5-9 флавонолы) наблюдается линейная зависимость между суммарной величиной ненасыщенности и видом активности; соединения 2, 3, 5, 6, 7, 8 располагаются на прямой (рис. 1).

На графике указано, что коэффициент корреляции равен 0,75, что для биологических экспериментов вполне приемлемо [20].

На основании анализа и сравнения квантово-химических параметров, представленных в работах [13, 18–19], мы считаем, что индекс ненасыщенности (IUA) может быть наиболее надежным критерием для осуществления корреляционных анализов антирадикальной активности (ОН•) в рядах производных флавана, флаванона, флавонола и флавонола. Это возможно, в первую очередь, потому гидроксильный радикал, характеризуясь высокой электрофильностью, присоединяется по положению С-8 циннамоильного фрагмента², где сосредоточена наибольшая электронная плотность.

Тем не менее, данный параметр удобен и для качественного анализа закономерностей структура-активность.

Следует также отметить, переход ядра флавана в флаванон сопровождается восстановлением винильного фрагмента С-8→С-7 и, соответственно, атомы С-8 и С-7 переходят в sp^3 -гибридизованное состояние. Квантово-химические параметры изменяются следующим образом: суммарные значения связей чисел (Nc) у флаванонов увеличивается, теоретической валентности остается неизменной, электронной плотности также увеличивается, а индекса ненасыщенности у флаванонов уменьшается по сравнению с соответствующими флаванами.

Заслуживают особого внимания новейшие исследования, посвященные поиску так называемых малых молекул, способных связываться с коронавирусом S-белком, что будет, по-видимому, полезно как для профилактики, так и, возможно, для облегчения инфекции, вызванной COVID-19.

К числу таких «малых молекул» авторы отнесли эриодиктиол, хризин, рутин, гесперидин, кверцетин, неогесперидин и другие, содержащие флороглюциновый тип кольца «А», а также орто-дигидрокси или орто-метокси-гидрокси заместители в кольце «В».

Наконец, зная структуру агликона, флавоноида, его биохимические и фармакологические свойства можно осуществлять химическую модификацию введением в молекулу конкретных функциональных групп в зависимости от конечной цели, стоящей перед химиком-синтетиком.

² Нами соблюдается нумерация атомов углерода циннамоильного фрагмента, генерируемая программами WinMoras 2016.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Э.Т. Оганесян – поиск и анализ литературы, интерпретация полученных результатов, написание текста рукописи; С.С. Шатохин – поиск и анализ литературы, выполнение квантово-химических расчетов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Ahmad A., Kaleem M., Ahmed Z., Shafiq H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections-A review // Food Research International. – 2015. – Vol. 77. – P. 221–235. DOI:10.1016/j.foodres.2015.06.021.
- de Araújo F. F., de Paulo Farias D., Neri-Numa I.A., Pastore G.M. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential // Food Chemistry. – 2021. – Vol. 338. – P. 127535. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127535.
- Lichota A., Gwozdziński L., Gwozdziński K. Therapeutic potential of natural compounds in inflammation and chronic venous insufficiency // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2019. – Vol. 176. – P. 68–91. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.04.075
- Loh Y.C., Chan S.Y., Tew W.Y., Oo C.W., Yam M.F. New flavonoid-based compound synthesis strategy for antihypertensive drug development // Life Sciences. – 2020. – Vol. 249. – P. 117512. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117512.
- Perez-Vizcaino F., Fraga C.G. Research trends in flavonoids and health // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2018. – Vol. 646. P. 107–112. DOI: 10.1016/j.abb.2018.03.022.
- Raffa D., Maggio B., Raimondi M.V., Plescia F., Dainone G. Recent discoveries of anticancer flavonoids // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 142. – P. 213–228. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.034.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships // Journal of Nutritional Biochemistry. – 2002. – Vol. 13, No. 10. – P. 572–584. DOI: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5.
- Mladěnka P., Zatloukalová L., Filipský T., Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity // Free Radical Biology & Medicine. – 2010. – Vol. 49, No. 6. – P. 963–975. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010.
- Procházková D., Boušková I., Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids // Fitoterapia. – 2011. – Vol. 82. – P. 513–523. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.01.018.
- Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance // Plant Science. – 2012. – Vol. 196. – P. 67–76. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014.
- Филимонов Д.А., Дружиловский Д.С., Лагунин А.А., Глориезова Т.А., Рудик А.В., Дмитриев А.В., Погодин П.В., Порошков В.В. Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения // Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2018. – Т. 1, №1. DOI: 10.18097/bmcr.00004.
- Husaine S.R., Cillard J., Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids // Phytochemistry. – 1987. – Vol. 26, No.9. – P. 2489–2491.
- Агаджанян В.С., Оганесян Э.Т. Применение квантово-химических методов анализа для интерпретации антирадикальной активности в ряду гидроксипроизводных коричной кислоты // Хим.-фарм. журн. – 2008. – Т. 42, №11. – С. 12–17. DOI: 10.30906/0023-1134-2008-42-11-12-17.
- Wu C., Liu Y., Yang Y., Zhang P., Zhong W., Wang Y., Wang Q., Xu Y., Li M., Li X., Zheng M., Chen L., Li H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods // Acta. Pharm. Sin. B. – 2020. – Vol. 10, No.5. – P. 766–788. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.02.008.
- Antonio A.D.S., Wiedemann L.S.M., Veiga-Junior V.F. Natural products' role against COVID-19 // RSC Advances. – 2020. – Vol. 10, No.39. – P. 23379–23393. DOI: 10.1039/D0RA03774E.
- Russo M., Moccia S., Spagnuolo C., Tedesco I., Russo G.L. Roles of flavonoids against coronavirus infection // Chemico-Biological Interactions. – 2020. – Vol. 328. – P. 109211. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109211.
- Sestili P., Stocchi V. Repositioning Chromones for Early Anti-inflammatory Treatment of COVID-19 // Frontiers in Pharmacology. – 2020. – Vol. 11. – P. 854. DOI: 10.3389/fphar.2020.00854.
- Агаджанян В.С., Оганесян Э.Т., Абаев В.Т. Целенаправленный поиск соединения-лидера в ряду производных коричной кислоты, обладающих антирадикальной активностью // Хим.-фарм. журн. – 2010. – Т. 44, №7. – С. 21–26. DOI: 10.30906/0023-1134-2010-44-7-21-26.
- Оганесян Э.Т., Шатохин С.С., Глушко А.А. Использование квантово-химических параметров для прогнозирования антирадикальной (НО·) активности родственных структур, содержащих циннамоильный фрагмент. I. Производные коричной кислоты, халкона и флаванона // Фармация и фармакология. – 2019. – Т. 7, №1. – С. 53–66. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-1-53-66.
- Akoglu H. User's guide to correlation coefficients // Turkish Journal of Emergency Medicine. – 2018. – Vol. 18, No.3. – P. 91–93. DOI: 10.1016/j.tjem.2018.08.001.

АВТОРЫ

Оганесян Эдуард Тонинович – доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-2756-9382. E-mail: edwardov@mail.ru

Шатохин Станислав Сергеевич – аспирант кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-7891-8338. E-mail: Shatohin.stanislav95@yandex.ru



**Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Проводит обучение по следующим специальностям:

Код специальности	Наименование специальности	Квалификация	Срок обучения
СРЕДНЕЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ			
33.02.01	Фармация очно	ФАРМАЦЕВТ	2 года 10 месяцев
31.02.05	Стоматология ортопедическая очно	ЗУБНОЙ ТЕХНИК	2 года 10 месяцев
БАКАЛАВРИАТ			
38.03.02	Менеджмент очно-заочно, заочно	БАКАЛАВР	5 лет
СПЕЦИАЛИТЕТ			
31.05.03	Стоматология очно	ВРАЧ-СТОМАТОЛОГ ОБЩЕЙ ПРАКТИКИ	5 лет
33.05.01	Фармация	ПРОВИЗОР	5 лет
30.05.01	Медицинская биохимия очно	ВРАЧ-БИОХИМИК	6 лет
МАГИСТРАТУРА			
32.04.01	Общественное здравоохранение очно-заочно	МАГИСТР	2 года
АСПИРАНТУРА			
31.06.01	Клиническая медицина очно/заочно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	3года/4 года
33.06.01	Фармация очно/заочно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	3года/4 года
30.06.01	Фундаментальная медицина очно/заочно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	3года/4 года
ОРДИНАТУРА			
33.08.01	Фармацевтическая технология очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года
33.08.02	Управление и экономика фармации очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года
33.08.02	Фармацевтическая химия и фармакогнозия очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года
31.08.73	Стоматология терапевтическая очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года
31.08.75	Стоматология ортопедическая очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года

Адрес: 357532, Российская Федерация, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр-т Калинина, 11.

