Научно-практический журнал
Scientific and Practical Journal

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACY & PHARMACOLOGY

2022 Том / Volume X

№ 4

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

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

www.pmedpharm.ru www.pharmpharm.ru

ПМФИ
Филиал ВолгГМУ

БРЕЙНМАКС®

- Усиление нейропротекции
- Улучшение памяти и внимания
- Повышение работоспособности
- Нормализация эмоционального состояния

1. Инструкция по медицинскому применению препарата БРЕЙНМАКС®.
2. Данилов Ан.Б., Данилов Ал.Б. Возможности повышения эффективности нейропротективной терапии у пациентов с острыми и хроническими цереброваскулярными заболеваниями, когнитивными нарушениями и астеническим синдромом различной этиологии: резолюция совета экспертов. РМЖ. 2022;4:51–54.

ИНФОРМАЦИЯ ПРЕДНАЗНАЧЕНА ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ. ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ РЕКОМЕНДУЕТСЯ ОЗНАКОМИТЬСЯ С ИНСТРУКЦИЕЙ

ПРОМОМЕД
ООО «ПРОМОМЕД ДМ»
129090 Москва, Проспект Мира, 13, стр. 1, офис 106
тел. +7 (495) 640-25-28
www.promo-med.ru

Научно-практический журнал

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Периодичность 6 номеров в год

Том 10, Выпуск 4, 2022

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

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

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-кт Калинина, 11.
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России
Телефон: +7 (8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru
www.pharmpharm.ru
Объединенный каталог. Пресса России . Газеты и журналы. Индекс 94183
Формат А4, тираж 1000 экз. 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, ВИНИТИ, 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.

Scientific and Practical Journal

PHARMACY & PHARMACOLOGY

Scientific and practical journal
Volume X, Issue 4, 2022
The mass media registration certificate:
ПИ №ФС77–67428 от 13.10.2016
ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

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 an journals. Code 94183
A4 size, 1000 issues circulation. Price free

Journal "Pharmacy & Pharmacology" is recommended International Comittee 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.

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENS

ОБЗОР / REVIEW

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ / RESEARCH ARTICLE

Фармацевтическая технология и биотехнология / Pharmaceutical Technology and Biotechnology

Фармакология и клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology

Редакционная статья / Editorial

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК: 535.232:615.5-001.15+615.26

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛА РАСТИТЕЛЬНЫХ UV-ФИЛЬТРОВ В СВЕТЕ СОВРЕМЕННОЙ КОНЦЕПЦИИ ФОТОЗАЩИТЫ КОЖИ

О.Д. Немятых[1], И.И. Тернинко[1,2], А.С. Сабитов[3], А.И. Ляшко[1], З.Б. Сакипова[3]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А
[2] Испытательная лаборатория (Центр контроля качества лекарственных средств) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А
[3] Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова,
050000, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Толе Би, д. 88, корп. 4

E-mail: oksana.nemyatyh@pharminnotech.com

Получена 04.05.2022 После рецензирования 20.07.2022 Принята к печати 25.08.2022

Терапевтический потенциал растений основан на фармакологических эффектах, обусловленных их фитохимическим профилем. Сегодня научный интерес к растительным объектам возрастает в результате последних исследований, в которых рассматривается перспектива применения данного сырья для косметической отрасли в качестве средств для защиты кожи от пагубного воздействия УФ-лучей.

Цель. Оценка потенциала растительных UV-фильтров в свете современной концепции фотозащиты кожи.

Материалы и методы. Систематический поиск литературы проводился с помощью электронных информационных массивов PubMed, Scopus, Google Scholar, eLibrary. Глубина поиска составила 10 лет (период с 2010 по 2021 гг). Поиск проводили по ключевым словам: антиоксиданты, косметические средства, фотозащита, химический состав, фармакологическое действие.

Результаты. В работе рассмотрены и научно обоснованы современные принципы фотозащиты кожи, базирующиеся на применении химических или физических UV-фильтров. Отмечена тенденция использования растительного сырья и его компонентов в рецептуре фотопротекторов, что связано с широким спектром активности, отсутствием ксенобиотического эффекта и высокой биодоступностью органических растительных соединений.

Заключение. Анализ данных научных публикаций продемонстрировал потенциальную фотопротекторную активность биологически активных веществ растений, обусловленную антиоксидантным, противовоспалительным и антирадикальным эффектами. Результаты исследования являются теоретическим базисом для дальнейшего всестороннего экспериментального изучения растительных объектов с целью получения пула доказательных данных в области фотопротекции в опытах *in vivo*.

Ключевые слова: растительные UV-фильтры; фотопротекция; концепция современной фотозащиты кожи

Список сокращений: IPD – быстрое пигментационное потемнение; IPF – фактор защиты иммунитета; NADH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; PPD – постоянное пигментационное потемнение; SPF – солнцезащитный фактор; UVA – ультрафиолетовые лучи A; UVB – ультрафиолетовые лучи B; UVC – ультрафиолетовые лучи C; АФК – активная форма кислорода; БАВ – биологически активные вещества; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; УФ-лучи – ультрафиолетовые лучи.

Для цитирования: О.Д. Немятых, И.И. Тернинко, А.С. Сабитов, А.И. Ляшко, З.Б. Сакипова. Оценка потенциала растительных UV-фильтров в свете современной концепции фотозащиты кожи. *Фармация и фармакология.* 2022;10(4):308-319. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-308-319

For citation: O.D. Nemyatykh, I.I. Terninko, A.S. Sabitov, A.I. Lyashko, Z.B. Sakipova. Evaluation of plant-based UV filters potential in modern concept view of skin photoprotection. *Pharmacy & Pharmacology.* 2022;10(4):308-319. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-308-319

Scientific and Practical Journal
PHARMACY & PHARMACOLOGY

REVIEWS, LECTURES

DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-308-319

EVALUATION OF PLANT-BASED UV FILTERS POTENTIAL IN MODERN CONCEPT VIEW OF SKIN PHOTOPROTECTION

O.D. Nemyatykh[1], I.I. Terninko[1,2], A.S. Sabitov[3], A.I. Lyashko[1], Z.B. Sakipova[3]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
14, Prof. Popov Str., Saint-Petersburg, Russia, 197376
[2] Testing Laboratory (Medicines Quality Control Center)
of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
Bld. A, 14, Prof. Popov Str., Saint-Petersburg, Russia, 197376
[3] Asfendiyarov Kazakh National Medical University,
Bld. 4, 88, Tole Bi Str., Almaty, Republic of Kazakhstan, 050000

E-mail: oksana.nemyatyh@pharminnotech.com

Received 04 May 2022 After peer review 20 July 2022 Accepted 25 Aug 2022

A therapeutic plants potential is based on the pharmacological effects due to their phytochemical profile. Today, scientific interest in botanicals is increasing as a result of recent research that looks at the prospect of using these raw materials for the cosmetic industry as a means to protect the skin from the harmful effects of UV rays.

The aim of the study was to evaluate a potential of plant-based UV-filters in modern concept view of skin photoprotection.

Materials and methods. A systematic literature search was carried out using the electronic information arrays PubMed, Scopus, Google Scholar, eLibrary. The search depth was 10 years (the period from 2010 to 2021). The search was carried out by the following keywords: antioxidants, cosmetics, photoprotection, chemical composition, pharmacological action.

Results. In the paper, modern principles of skin photoprotection based on the use of chemical or physical UV-filters are considered and scientifically substantiated A trend for the use of plant-based materials and their components in the formulation of photoprotectors was notified. That is associated with a wide activity spectrum, the absence of a xenobiotic effect, and a high bioavailability of organic plant compounds.

Conclusion. The data analysis from scientific publications demonstrated a potential photoprotective activity of plant-based biologically active substances due to antioxidant, anti-inflammatory and anti-radical effects. The results of the study are a theoretical basis for a further comprehensive experimental study of plant objects in order to obtain a pool of evidence in the field of photoprotection in *in vivo* experiments.

Keywords: plant-based UV filters; photoprotection; concept of modern skin photoprotection

Abbreviations: IPD – Immediate Pigment Darkening; IPF – Immune Protection Factor; NADH – nicotinamide adenine dinucleotide; NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PPD – Persistent Pigment Darkening; SPF – Sun Protection Factor; UVA – ultraviolet A rays; UVB – ultraviolet B rays; UVC – ultraviolet C rays; ROS – reactive oxygen species; BASs – biologically active substances; WHO – World Health Organization; DNA – deoxyribonucleic acid; UV rays – ultraviolet rays.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что солнечный свет является инициатором и катализатором большинства метаболических процессов, ультрафиолетовое излучение, как один из фрагментов спектра солнечного света, при множественных воздействиях на кожу провоцирует фотостарение, а также способствует развитию ряда патологий, в т.ч. фотоканцерогенеза [1].

Последствия пагубного воздействия ультрафиолета подчеркивают необходимость защиты кожи по всему спектру солнечного света. Современная концепция фотозащиты кожи человека предполагает использование косметических средств широкого спектра действия, что обуславливает поиск новых натуральных многофункциональных ингредиентов, в том числе обладающих фотопротекторной активностью. Значительный интерес вызывают компоненты растительного происхождения, которые благодаря поликомпонентности химического состава оказывают многовекторное биологическое действие, что обусловлено, в первую очередь, наличием активных центров биологически активных веществ (гидроксогрупп полифенольных соединений, кето-енольных групп аскорбиновой кислоты, системы сопряженных связей и т.д.) и способствует реализации естественных фотозащитных свойств [2].

В литературе [3–5] присутствуют сведения о способности ряда представителей различных ботанических классификационных групп – от водорослей и лишайников до двудольных растений – в эксперименте оказывать антиоксидантное, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие, что в комплексе реализует механизм фотопротекции. Так, ряд авторов [6–10] сообщают о способности активных компонентов *Silybum marianum* L., *Gracilariopsis longissimi* (S.G. Gmelin)

M. Steentoft, *Elaeagnus angustifolia* L., *Moringa oleifera* Lam., *Vitis vinífera* L., *Ruta graveolens* L., *Ginkgo biloba* L., *Dirmophandra mollis* Benth. проявлять фотопротекторные свойства. Также в литературе представлены результаты изучения химического состава [11–14] и экспериментально доказанных фотозащитных свойств [15–17] сырья шиповника, обобщены данные о высокой биодоступности биомолекул масла шиповника [18–21]. Учитывая низкую токсичность, отсутствие ксенобиотического эффекта и относительную доступность фитосубстанций, исследование и оценка компонентов растительного происхождения в качестве потенциальных фотопротекторов представляет научную и практическую значимость [22].

Результаты данного исследования основаны на систематическом анализе последних данных научных публикаций и могут способствовать формированию логико-структурной взаимосвязи «фитохимический состав – спектр фармакологической активности – перспективы использования растения с целью разработки оригинальных косметических средств с фотопротекторным действием».

ЦЕЛЬ. Оценка потенциала растительных UV-фильтров в свете современной концепции фотозащиты кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили методами контент-анализа и агрегирования данных. Систематический поиск литературы проводился с помощью электронно-информационных баз PubMed, Scopus, Google Scholar, eLibrary. Глубина поиска составила 10 лет (период с 2010 по 2021 гг.). Реперными (ключевыми) словами для осуществления таргетного поиска были: фотозащита, антиоксиданты, косметические средства, химический состав, фармакологическое действие. Для поиска зарубежных источников были использованы аналогичные запросы только на английском языке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика UV-излучения

На сегодняшний день неоспоримым представляется тот факт, что на организм человека воздействуют два спектра UV-лучей: средневолновые (UVB) с диапазоном длин волн 280–320 нм, составляющие 5% ультрафиолета, и длинноволновые (UVA) с диапазоном длин волн 320–400 нм, охватывающие 95% UV-спектра. Как признание значимости дозы ультрафиолета, воздействующего на кожу человека, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) ввела UV-индекс, т.е. индекс ежесуточной оценки интенсивности UV-лучей у поверхности Земли в зависимости от погодных условий в конкретной местности. Стоит отметить, что интенсивность UVB-излучения зависит от угла расположения солнца над горизонтом и нарастает на 4–10% при подъеме на каждые 300 метров вверх и на 3% – при продвижении на юг на каждый градус широты. В отличие от UVB, действие UVA-лучей не смягчается озоновым слоем, они обладают значительной проникающей способностью, проходят через облака, стекло и излучаются постоянно в течение всего светового дня [1, 23].

Влияние UV-излучения на кожу

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что кожа человека воспринимает весь спектр электромагнитных волн, но реагирует на них по-разному. При этом взаимодействие электромагнитных волн со структурами кожи зависит от энергии ее фотона, обратно пропорциональной длине волны. Данный процесс характеризуют параметры отражения/рассеяния, поглощения, глубины проникновения волн. Визуализация воздействия УФ-лучей на кожу по данным различных авторов представлена нами на рис. 1.

По отношению к видимому свету кожа является оптически полупрозрачным образованием Отражение, рассеяние, поглощение волн происходят незначительно на ее поверхности и массово в ее толще. Показатель внутрислойного отражения является одним из показателей молодости кожи, т.к. с возрастом доля отраженного света уменьшается (рис. 2) [1, 23].

В исследованиях российских и зарубежных авторов показано, что чем меньше длина волны (больше ее частота и энергия), тем более плотно с тканевыми и клеточными образованиями она взаимодействует за счет интенсивной абсорбции хромофорами кожи. Как следствие, такие волны реализуют преимущественно поверхностное действие. В роговом слое важным и массивным абсорбирующим агентом является кератин, поглощающий преимущественно UVB-лучи и, в меньшей степени, взаимодействующий с UVA-спектром [23–25]. Наряду с кератином, в этот процесс поглощения энергии волны UV-лучей вовлечены также кератиноциты, меланоциты, фибробласты, клетки Лангерганса и эндотелиоциты. Биологический эффект данного взаимодействия сопровождается продукцией биологических маркеров, в первую очередь, активных форм кислорода (АФК), а также азота и углерода, включающих как свободные радикалы, так и вещества нерадикальной природы (табл. 1) [1, 23].

Важно отметить, что ультрафиолет обладает кумулятивным повреждающим действием на кожу,

DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-308-319

т.е. малые повседневные дозы аккумулируются в месячные/годовые дозы. При этом накапливаются не дозы UV-лучей, а последствия их воздействия, преимущественно представленные окислительными повреждениями клеток и межклеточного матрикса. На сегодняшний день рядом исследований показано, что до 80% признаков старения кожи лица связано с воздействием UV-лучей [24–26]. Так, увеличение времени ежесуточного облучения кожи солнечным светом, с 1–2 до 5 часов в день, приводит к потере влаги в коже, нарушению тонуса капилляров и усилению образования мелких морщин в 4,8 раза, а ежедневное применение косметического средства с солнцезащитным фактором (SPF) 4–10 способно снизить кумулятивную дозу UV на 50% [23].

Учитывая, что в клетках и внеклеточном матриксе есть абсорберы для всех типов волн, биологические последствия носят многовекторный характер. О неблагоприятном влиянии UV-лучей на кожу свидетельствуют исследования этиологии и патогенеза злокачественных заболеваний кожи. Лучи UVA- и UVB-спектров приводят к окислению часто встречающихся в составе белков в клетках и матриксе аминокислот лизина, пролина и аргинина, что запускает необратимый процесс гликации с образованием продуктов завершенного гликолиза, поперечных сшивок белковых волокон внутри и вне клеток. Последнее обстоятельство приводит к выраженному меланогенезу в эпидермисе и истончению дермы [23, 25]. Стоит подчеркнуть, что применение косметики с SPF 15 у детей снижает риск рака кожи в позднем возрасте на 78% [23].

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что UVB-волны реализуют свой эффект исключительно на уровне эпидермиса, в котором формируются первичные повреждения. Биологически наиболее важным абсорбером UVB-лучей является ДНК кератиноцитов росткового слоя эпидермиса, а мишенью – расположенные рядом пиримидиновые основания тимина и цитозина, между которыми в условиях поглощения фотона UVB-волны возникают патологические ковалентные связи. В результате взаимодействия образуются два фотопродукта – циклобутан пиримидиновый димер и 6–4 фотопродукт (рис. 3) [1, 23]. Стоит отметить, что сформированные фотопродукты с измененной пространственной геометрией приводят к подмене нуклеотида во вновь синтезируемой цепи и приводят к UVB-мутациям, которые встречаются при UVB-облучении в 85% случаев. Кроме того, в результате массивного повреждения ДНК в эпидермисе образуются первые «ожоговые» клетки с характерной морфологией. Таким образом, пиримидиновые димеры и «ожоговые» клетки представляют собой ранний, точный и информативный показатель интенсивности UVB-облучения. Маркером интенсивности воздействия UVB-облучения являются также иммунные клетки Лангерганса, которые крайне чувствительны к воздействию UVB-лучей, поскольку теряют свои отростки и мигрируют в регионарные лимфатические узлы [23].

Несмотря на то, что UVB-лучи практически не проникают в дерму, индикаторами степени UVB-поражения являются также дермальные реакции, в т.ч. активизация дермальной MMP-1, разрушающей коллаген, покраснение кожи и эластолиз, нарастающий вследствие накопления в сосочковом слое дермы большого количества незрелого эластина [1].

Вместе с тем, кумулятивное воздействие UVA-лучей на организм человека проявляется более выраженными деструктивными изменениями, чем UVB-облучение. Несмотря на тот факт, что UVB-лучи обладают энергией в 1000 раз превышающей энергию UVA, 90% UVB-лучей блокируются роговым слоем эпидермиса, в то время как 50-60% UVA-лучей способны проникать глубоко в дерму. Стоит отметить, что именно UVA-облучение путем лавинообразной продукции пула свободных радикалов, повреждающих клетки и внеклеточные структуры дермы, определяет манифестацию картины фотостарения кожи путем потери эластичности и формирования морщин. Индикатором повреждения ДНК при UVA-облучении является окисление ДНК в области пуринового основания гуанина с накоплением 8-гидроксигуанина. Наряду с этим, избыток АФК приводит к быстрой лиганд-независимой активации мембранных клеточных рецепторов к многочисленным факторам роста и интерлейкинам, искажению активности генов, включая AP-1 и NF-kB, что в конечном итоге обуславливает ингибирование процессов синтеза проколлагена, синтез продуктов гликирования и активацию металлопротеиназ MMP-1, -3 и -9, определяющих деструкцию структур дермального матрикса (рис. 4, табл. 2) [1, 22, 23].

Физиологические механизмы защиты организма от UVA/UVB-лучей представлены роговым слоем эпидермиса, способным к уплотнению под воздействием UVA/UVB-лучей, меланином (от греч. *melanos* – черный), который задерживает до 90% фотонов, а также урокановой кислотой. При облучении транс-форма кислоты переходит в цис-форму, при отсутствии воздействия UV-излучения протекает обратная реакция (рис. 5) [23, 27].

Таким образом, многовекторность и глубина морфо-функциональных изменений в коже в условиях воздействия всего спектра UV-лучей подчеркивают значимость фотопротекции самого крупного органа организма человека.

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

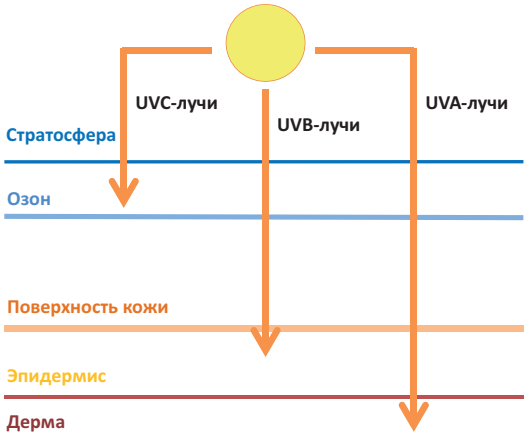


Рисунок 1 – Схема воздействия UV-лучей на кожу человека[1]

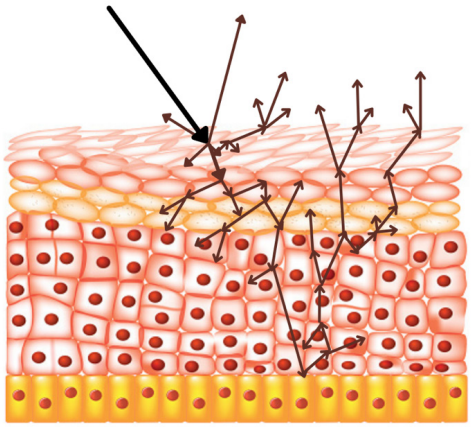


Рисунок 2 – Распространение световой волны внутри кожи

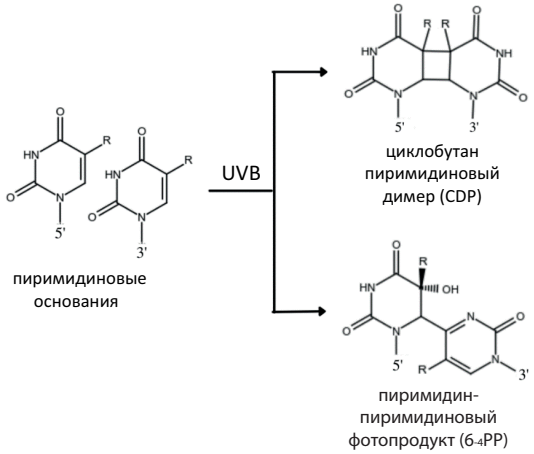


Рисунок 3 – Трансформация тимина T и цитозина C при поглощении фотона UVB-волны

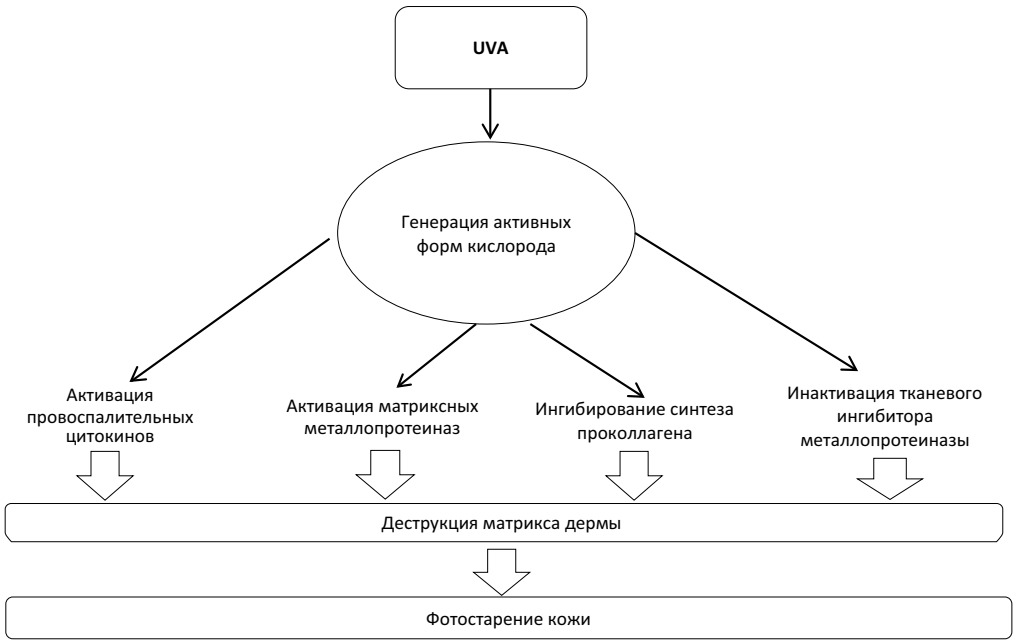


Рисунок 4 – Воздействие на кожу UVA-лучей

[1] Здесь и далее рисунки представляют собой авторскую интерпретацию комплексного анализа данных литературы по отдельным аспектам рассматриваемой проблемы.

DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-308-319

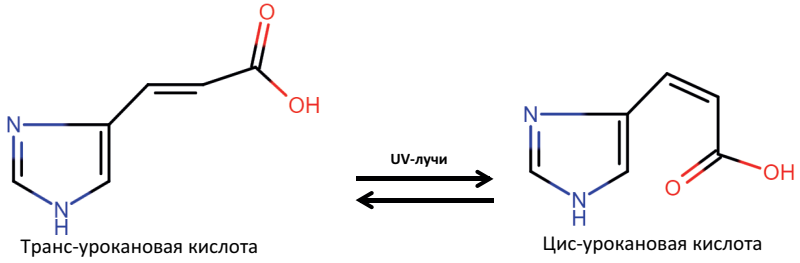


Рисунок 5 – Изомеризация урокановой кислоты квантом света в условиях воздействия UV-лучей

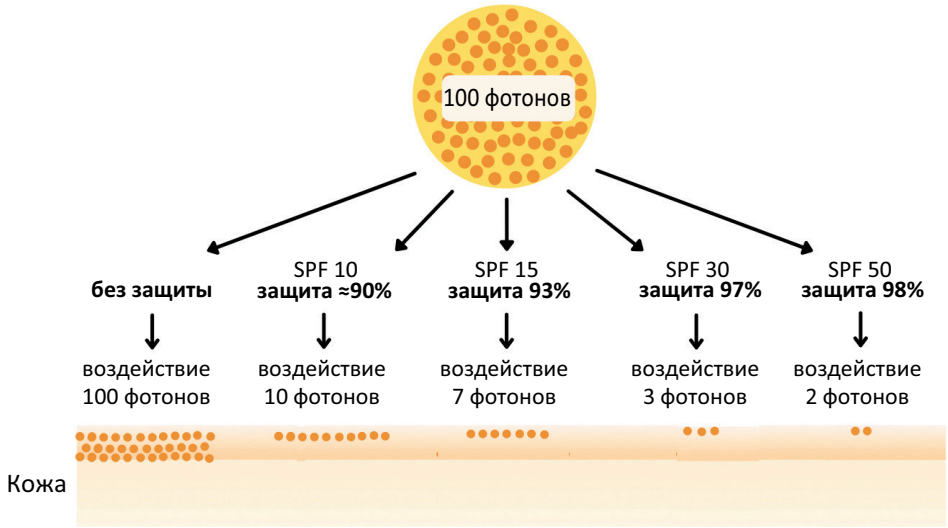


Рисунок 6 – Принцип расчета величины SPF

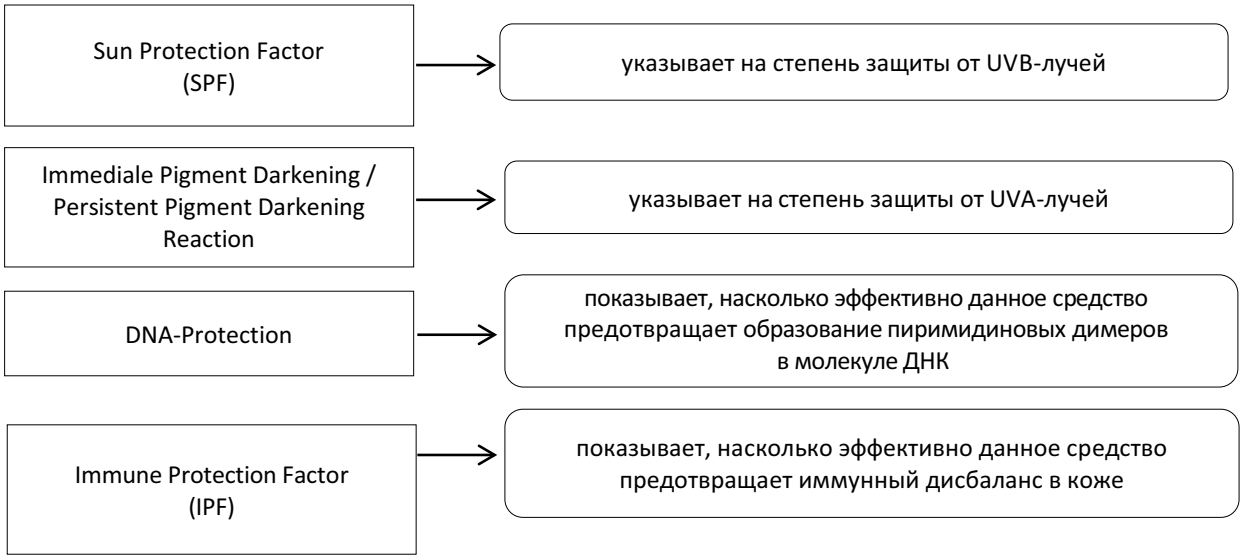


Рисунок 7 – Методы тестирования клеточной биозащиты при воздействии UV-лучей

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Таблица 1 – Генерация токсичных АФК при взаимодействии с различными спектрами солнечного света

Хромофоры кожи	Пик поглощения, нм	АФК
Билирубин	400–600	H_2O_2
Коллаген/эластин	320–400	H_2O_2
Коллаген AGE (пентозидин)	320–400	• O_2^- H_2O_2 •OH
Меланин	230–600	H_2O_2
Медь/цитохром С комплекс IV (митохондрия)	770–1400	• O_2^- H_2O_2 •OH
NADH, NADPH	290–405	• O_2^- $^1O_2$
2-тиорацил/4-тиоуридин	290–405	• O_2^- $^1O_2$
Порфирины	290–700	• O_2^- H_2O_2 $^1O_2$
Триптофан	300–400	• O_2^- H_2O_2 $^1O_2$
Рибофлавин	290–465	• O_2^- $^1O_2$
Уроканиновая кислота	310	$^1O_2$

Примечание: • O_2^- – супероксид-анион радикал; • OH – гидроксильный радикал; $^1O_2$ – синглетный кислород; АФК – активная форма кислорода; NADH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат.

Таблица 2 – Глубина проникновения и воздействие на кожу UVA/UVB-лучей

Глубина проникновения лучей	Тип лучей	Результат воздействия на кожу
Эпидермис	UVA+UVB	– поражение кератиноцитов – поражение меланоцитов – миграция клеток Лангерганса
Дерма	UVA	– генерация свободных радикалов (в т.ч. поражаются ДНК, белки и липиды, мембраны и митохондрии) – снижение синтетической активности фибробластов, нарушение их клеточного цикла и способности к миграции – нарушение синтеза и деструкции коллагена и эластина – инфильтрация околососудистого матрикса форменными элементами крови
Гиподерма	UVA	– поражение адипоцитов, в т.ч. нарушение синтеза липидов и снижение содержания триглицеридов – снижение синтеза адипонектина

Таблица 3 – Характеристики фотопротекторов с различными величинами SPF-фактора

Степень фотозащиты	Величина SPF-фактора	Трансмиссия	Поглощение (%)
Низкая	6	0,167	83,3
Средняя	10	0,100	90,0
Высокая	15	0,067	93,3
	20	0,050	95,0
	25	0,040	96,0
Очень высокая	30	0,033	96,7
	50	0,020	98,0
	60 (50+)	0,017	98,3

Характеристика и механизм защитного действия UV-фильтров

Защитным действием в отношении УФ-лучей обладают UV-фильтры – вещества, предназначенные для защиты кожи от проникновения УФ-излучения путем абсорбции, отражения или рассеивания. Эффективность UV-фильтров измеряется фактором солнечной защиты (SPF) и является отношением минимальной дозы UV-излучения, которая вызывает покраснение защищенной кожи к минимальной дозе UV-излучения, вызывающей покраснение незащищенной кожи. Индекс солнечной защиты, например 50, обозначает, что для получения эритемы при наличии защиты требуется в 50 раз большая доза облучения UV, чем без защиты (рис. 6) [1, 23, 27].

На сегодняшний день доказано, что трансмиссия (коэффициент пропускания без изменения направления) UV-лучей в условиях использования фотопротектора связана обратно пропорциональной зависимостью с величиной поглощения. При этом существенное увеличение значений SPF-фактора реализуется лишь некоторым увеличением величин показателя поглощения (табл. 3) [1, 27].

DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-308-319

Таблица 4 – Классификация и номенклатура UV-фильтров

Критерий	Физические UV-фильтры	Химические UV-фильтры
Химическая природа	– неорганические соединения (используются в микронизированном, ультра-микронизированном, тонкодисперсном виде и в форме наночастиц)	– органические соединения
Механизм действия	– представляют собой минеральные экраны, которые рассеивают и отражают солнечные лучи	– поглощают ультрафиолет и под действием кванта света претерпевают изомеризацию
Локализация эффекта	– поверхность рогового слоя эпидермиса	– эпидермис
Преимущества	– высокий уровень безопасности, инертность по отношению к UV-лучам – UVA/UVB – фотозащита – ценовая доступность	– возможность создания комбинаций с минимальными «рабочими» концентрациями и широким защитным спектром – сочетаемость с другими компонентами рецептуры
Недостатки	– физические частицы в течение дня удаляются за счет активности желез и др. факторов – «эффект белил» – довольно высокие «рабочие» концентрации – сложности при сочетании с другими компонентами рецептуры	– вероятность развития аллергических реакций – потенциальная фототоксичность (в т.ч. провоцируют фотоконтактный дерматит)
Наименования фильтров, присутствующих на европейских и российских косметических рынках	– диоксид цинка, диоксид титана	– UVB: п-аминобензойная кислота (PABA) и ее производные (падимат О), салицилаты (гомоментилсалицилат, октисалат. троламин салицилат), циннаматы (октиноксат), производные камфоры, производные метоксикоричной кислоты – UVA: авобензон, мексорил, нео гелиопан UVA/UVB: октокрилен, бензофенон-3,4,5,8, фенилбензотриазол сульфокислоты (энсулизол), диоксибензон, триазины и триазоны (тиносорб, ювинул)

Уровень необходимой коже фотозащиты строго индивидуален и определяется возрастом и особенностями организма, типом и состоянием кожи, прогнозируемой длительностью пребывания на солнце, а также UV-индексом (0–12) региона с учетом облачности. Так как UVB-лучи более интенсивные, то цифра на этикетке солнцезащитного средства обозначает защиту от данного типа волн. Более слабые UVA-лучи не требуют очень высокой степени защиты, поэтому защита от них составляет 1/3 от лучей типа B. Например, маркировка SPF 30 означает, что от UVB будет защита 30, а от UVA – 1/3, то есть 10[2] [26].

Для точного определения уровня UVA-протекции применяют несколько тестов. Все они базируются на измерении пропускания/поглощения (рис. 7). Методы *in vivo*, в частности немедленное наличие темной пигментации (Immediale Pigment Darkening – IPD) и постоянное наличие темной пигментации (Persistent Pigment Darkening – PPD) основаны на определении кожного ответа на UVA-облучение (пигментация и эритема) с последующим подсчетом UVA-защитного фактора, аналогичного подсчету SPF. Кроме того, сегодня введены дополнительные тесты для оценки не только защитного эффекта против эритемы, но также и защиты от иммунологических и мутационных эффектов, вызванных ультрафиолетом[3].

В состав солнцезащитных препаратов входят фильтры, задерживающие солнечные лучи (табл. 4), принцип работы которых основан на физическом или химическом взаимодействии. Химические фильтры, улавливая UV-лучи, преобразуют их в тепловую энергию. Физические фильтры, такие как минеральные соединения титана или цинка, остаются на поверхности кожи и блокируют солнечное облучение, отражая лучи. Физические фильтры практически всегда отбеливают кожу и хуже смываются, подходят для чувствительной кожи, химические – прозрачные и незаметные на лице, могут обладать раздражающим действием. Перечень UV-фильтров, разрешенных к применению в Европейском союзе, представлен в Регламенте (EU) 1223/200[4]. Документ содержит

[2] Regulation (Ec) No. 1223/2009 Of The European Parliament And Of The Council of 30.11.2009 on cosmetic products // Official Journal of the European Union. – 2009. – L. 342. – P. 59–209.

[3] Commission Recommendation of 22 September 2006 on the efficacy of sunscreen products and the claims made relating thereto // Official Journal of the European Union. – 2006. – L. 265. – P. 39–42.

[4] Regulation (EC) No. 1223/2009 Of The European Parliament And Of The Council of 30.11.2009 on cosmetic products, 2009.

28 позиций International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI) с указанием области поглощения и максимально допустимой концентрации. В России соответствующий перечень регламентирован Приложением 5 Таможенного регламента Комиссии таможенного союза 009/2011[5], который также определяет условия использования фотопротекторов и предупреждения, информация о которых должна быть доведена до потребителя.

В свете рассуждений о свойствах фотопротекторов стоит отметить фотостабильность, т.е. способность сохранять свою структуру и свойства под влиянием излучения, а также коэффициент гашения, демонстрирующий, насколько активно препарат поглощает энергию. Важно подчеркнуть, что некоторые химические фильтры в значительной мере подвергаются фотолизу. К примеру, через 15 мин после воздействия солнечного света отмечается снижение активности: авобензона – до 36%, октил-п-метоксициннамата – на 4,5%. Эффективными значениями коэффициента гашения считаются величины более 20 (бутилметоксидибензоилметан – 31,0 октилдеметил п-аминобензойная кислота – 28,4, этилгексил-п-метоксициннамат – 24,2) [27].

Таким образом, особенности химической структуры, механизма действия, необходимость сохранения стабильности, эффективности и безопасности применения определяет круг требований к современному фотопротектору, в т.ч. способность поглощать лучи в широком диапазоне; фото-, термо- и водоустойчивость; низкая проникающая способность в отношении рогового слоя эпидермиса; приемлемый профиль безопасности (отсутствие токсичности, а также канцерогенного, сенсибилизирующего эффектов); способность эффективно предотвращать видимые (солнечные ожоги) и невидимые (фотостарение, канцерогенез) эффекты UV-излучения [28, 29].

Фотопротекторные свойства растительных БАВ

Высокий уровень инноваций и динамизма фармацевтической и косметической отраслей находит отражение в активном поиске новых многофункциональных натуральных ингредиентов. В настоящее время особое внимание обращает на себя тенденция применения растительного сырья и его компонентов в рецептуре солнцезащитных средств, что обусловлено широким спектром активности, отсутствием ксенобиотического эффекта и высокой биодоступностью органических растительных соединений[6] [30, 31].

На сегодняшний день неоспоримым представляется тот факт, что растения адаптируются к изменениям окружающей среды [32–35], в т.ч. повреждающему действию солнечных лучей путем реализации защитных механизмов, включающих продуцирование или активацию процессов биосинтеза антиоксидантных молекул [36–38]. Более того, в ряде исследований [22, 24, 26, 30] научно обоснованы гипотезы о потенциальной фотопротекторной активности соединений растительного происхождения.

При этом в ряде работ [39, 40] отмечается, что растительные экстракты проявляют синергетическое действие с химическими и физическими УФ-фильтрами, повышая тем самым SPF-фактор растительных косметических композиций. Причем механизм фотопротекторного действия различен: от собственной адсорбции УФ-лучей до антиоксидантного и противовоспалительного эффектов, которые опосредованно реализуют фотопротекцию, нивелируя негативное действие солнца.

В ряду БАВ растений наибольшее фотопротекторное значение исследователи придают различным классам фенольных соединений. Так, Acevedo A. с коллегами сообщает, что после введения вербаскозида и линарина в состав фотопротекторного косметического средства, его SPF-фактор составлял 24. Данные соединения представляют собой гликозиды кофейной кислоты и акацетина, что в очередной раз подтверждает тезис о выраженной антирадикальной активности полифенольных соединений [41]. Полифенольные соединения проявляют широкий спектр биологических свойств: антиоксидантное, противовоспалительное, гепатопротекторное, вазоактивное, антитромботическое, противоопухолевое, антибактериальное и противопротозойные. В работе Velasco M.V.R. и соавт. отмечают подобие структуры полифенольных соединений с органическими УФ-фильтрами, например, этилгексилметоксициннаматом и, как следствие, схожесть фотопротекторных свойств [42].

Фотопротекторные свойства изучены для многих фенольных комплексов растений. Так, положительное влияние полифенольных соединений сухого экстракта подорожника ланцетовидного было продемонстрировано в работе бразильских ученых [43]. Показано, что добавление 7% сухого экстракта в фитокомпозицию увеличивало соотношение UVA/UVB с 0,49 до 0,52. Оптимальные фотозащитные свойства демонстрирует силимарин – комплекс флаволигнановых соединений расторопши пятнистой – который при введении его в косметические фотопротекторные средства обеспечивает SPF, равный 13–14 [44]. Высокие фотопротекторные свойства (SPF = 9,9) характерны также для фенольного комплекса морских водорослей [45]. Сообщается о фотопротекторных свойствах антоцианов – отдельной группы соединений флавоноидной природы, обеспечивающих красно-фиолетовые оттенки окраски надземных частей (преимущественно

[5] Решение Комиссии Таможенного союза от 23.09.2011 № 799 «О принятии технического регламента Таможенного союза «О безопасности парфюмерно-косметической продукции» (вместе с «ТР ТС 009/2011. Технический регламент Таможенного союза. О безопасности парфюмерно-косметической продукции»).

[6] Там же.

цветков и плодов) растений. Cefali L.C. с соавторами показали, что масляные экстракты антоцианов малины и черники демонстрируют SPF-фактор 37 и 54 соответственно [46].

Несмотря на преимущественное акцентирование внимания на доказательности фотопротекторных свойств фенольных соединений, для других групп растительных БАВ также характерно защитное действие от негативного влияния солнечных лучей. В работах авторов [47-49] отмечается высокая фотопротекторная активность лигнина за счет его способности нивелировать свободные радикалы. Отмечено, что включение лигнина в косметические лосьоны, увеличило соотношение UVA/UVB в диапазоне 0,69–0,72. В публикациях [50, 51] приводятся данные по изучению фотопротекторной активности кофеина, пирокатехина, хлорогеновой и 3,4,5-трикофеилхинной кислот, выделенных из зерен кофе. Показана их эффективность в протекции старения кожи, вызванного воздействием UV-лучей и позитивное влияние на поврежденную ДНК.

В литературе приведена доказательная база и показана возможность использования в качестве натуральных UV-фильтров растительных масел: авокадо (SPF 4–15), кокосового (SPF 2–8), макадамии (SPF 6), ши (SPF 3–6), жожоба (SPF 4), что обусловлено наличием остатков полиненасыщенных (преимущественно линолевой и линоленовой) кислот и их способностью нейтрализовать свободные радикалы, обеспечивая антиоксидантную защиту. Растительные экстракты, например, алоэ, ромашки, шлемника, винограда и др., можно рассматривать как комплексные фитокомпозиции без индивидуализации маркерного компонента фотопротекторного действия [31, 32].

Стоит отметить, что российскими и зарубежными авторами изучен и экспериментально установлен фотозащитный потенциал, выраженный антиоксидантной активностью биологически активных веществ шиповника [11–14]. Выявлены потенциальные возможности использования масла орешков (плодиков) в разработке солнцезащитных средств за счет компонентов масла – каротиноидов, витаминов E и F, триглицеридов полиненасыщенных (линолевой и линоленовой) кислот, которые способствуют защите от UV-излучения. В литературе [18, 19] обобщены данные о высокой биодоступности биомолекул масла шиповника, что определяется его составом, схожим с липидным слоем кожи человека.

Подтверждением возможности использования вторичных метаболитов растений – фенольных соединений (в т.ч. флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, лигнаны), витаминов, терпенов – может служить широкое применение последних в рецептуре фотозащитных косметических средств и нутрицевтических продуктов [1, 22, 23]. Поскольку формирование доказательной базы клинической эффективности в области фотопротекции растительных солнцезащитных фильтров, представляющих целый комплекс биомолекул с антиоксидантным, противовоспалительным и антирадикальным действием, осложняется трудоемкостью выделения и наработки оптимального количества БАВ, подобные позиции на рынке косметических ингредиентов сегодня отсутствуют [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных научных публикаций демонстрирует потенциальную фотопротекторную активность БАВ растений, обусловленную антиоксидантным, противовоспалительным и антирадикальным эффектами. Результаты исследования являются теоретическим базисом для дальнейшего всестороннего экспериментального изучения растительных объектов с целью получения пула доказательных данных в области фотопротекции *in vivo*.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.Д. Немятых – концепция и дизайн работы, написание текста; А.С. Сабитов – сбор и обработка материала; А.И. Ляшко – сбор и обработка материала, написание текста; И.И. Тернинко – сбор и обработка материала, написание текста; З.Б. Сакипова– сбор и обработка материала, написание текста.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Wolf P. [UV-Filter. State of the Art] // Hautarzt. – 2009. – Vol. 60, No. 4. – P. 285–293. DOI: 10.1007/s00105-008-1623-y. German
2. He H., Li A., Li Sh., Tang J., Li L., Xiong L. Natural components in sunscreens: Topical formulations with sun protection factor (SPF) // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 134. – Art. ID: 111–161. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111161
3. Westfall A., Sigurdson G.T., Giusti M.M. Antioxidant, UV protection, and antiphotoaging properties of anthocyanin-pigmented lipstick formulations // J. Cosmet. Sci. – 2019. – Vol. 70, No. 2. – P. 63–76.
4. Korać R.R., Khambholja K.M. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation // Pharmacogn. Rev. – 2011. – Vol. 5, No. 10. – P. 164–173. DOI: 10.4103/0973-7847.91114
5. Lohézic-Le Dévéhat F., Legouin B., Couteau C., Boustie J.,

Coiffard L. Lichenic extracts and metabolites as UV filters // J. Photochem. Photobiol. B. – 2013. – Vol. 120. – P. 17–28. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.01.009

6. Vostálová J., Tinková E., Biedermann D., Kosina P., Ulrichová J., Rajnochová Svobodová A. Skin protective activity of silymarin and its flavonolignans // Molecules. – 2019. – Vol. 24, No. 6. – P. 1022–2406. DOI: 10.3390/molecules24061022
7. Álvarez-Gómez F., Korbee N., Casas V., Teófilo Abdala-Díaz R., Figueroa F. UV photoprotection, cytotoxicity and immunology capacity of red algae extracts // Molecules. – 2019. – Vol. 24, No. 2. – Art. No. 341. DOI: 10.3390/molecules24020341
8. Ahmady A., Amini H. M., Zhakfar A.M., Babak G., Sediqi M.N. Sun protective potential and physical stability of herbal sunscreen developed from afghan medicinal plants // Turk. J. Pharm. Sci. – 2020. – Vol. 17, No. 3. – P. 285–292. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2019.15428
9. Baldisserotto A., Buso P., Radice M., Dissette V., Lampronti I., Gambari R., Manfredini S., Vertuani S. Moringa oleifera leaf extracts as multifunctional ingredients for “natural and organic” sunscreens and photoprotective preparations // Molecules. – 2018. – Vol. 23, No. 3. – Art. No. 664. DOI: 10.3390/molecules23030664
10. Cefali L.C., Ataide J.A., Fernandes A.R., Sanchez-Lopez E., Sousa I.M.O., Figueiredo M.C., Ruiz A.L.T.G., Foglio M.A., Mazzola P.G., Souto E.B. Evaluation of *In Vitro* Solar Protection Factor (SPF), Antioxidant Activity, and Cell Viability of Mixed Vegetable Extracts from *Dirmophandra mollis* Benth, *Ginkgo biloba* L., *Ruta graveolens* L., and *Vitis vinífera* L. // Plants (Basel). – 2019. – Vol. 8, No. 11. – Art. ID: 453. DOI: 10.3390/plants8110453
11. Kiralan M., Yildirim G. Rosehip (*Rosa canina* L.) Oil // Fruit Oils: Chemistry and Functionality. – 2019. – P. 803–814. DOI: 10.1007/978-3-030-12473-1_43
12. Fascella G., D’Angiolillo F., Mammano M., Amenta M., Romeo F., Rapisarda P., Ballistreri G. Bioactive compounds and antioxidant activity of four rose hip species from spontaneous Sicilian flora // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 289. – P. 56–64. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.02.127
13. Jiménez P.P., Masson S.L., Quitral R.V. Chemical composition of chia seed, flaxseed and rosehip and its contribution in fatty acids omega-3 // Revista Chilena De Nutricion. – 2013. – Vol. 40, No. 2. – P. 155–160. DOI: 10.4067/S0717-75182013000200010
14. Pashazadeh H., Özdemir N., Zannou O., Koca I. Antioxidant capacity, phytochemical compounds, and volatile compounds related to aromatic property of vinegar produced from black rosehip (*Rosa pimpinellifolia* L.) juice // Food Bioscience. – 2021. – Vol. 44, No. 9. – Art. ID: 101318. DOI:10.1016/j.fbio.2021.101318
15. Dąbrowska M., Maciejczyk E., Kalemba D. Rose hip seed oil: Methods of extraction and chemical composition // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2019. – Vol. 121, No. 8. – Art. ID: 1800440. DOI: 10.1002/ejlt.201800440
16. Duru N., Karadeniz F., Erge H.S. Changes in bioactive compounds, antioxidant activity and HMF formation in rosehip nectars during storage // Food and Bioprocess Technology. – 2012. – Vol. 5, No. 7. – P. 2899–2907. DOI: 10.1007/s11947-011-0657-9
17. Kayath H., Dhawan S., Nanda S. *In-vitro* Estimation of Photo-Protective Potential of Rosehip Seed Oil and QbD Based Development of a Nanoformulation // Current Nanomedicine. – 2019. – Vol. 9, No. 3. – P. 216–231. DOI: 10.2174/2468187309666190126112141
18. Kulaitienė J., Medveckienė B., Levickienė D., Vaitkevičienė N., Makarevičienė V., Jarienė E. Changes in fatty acids content in organic rosehip (*Rosa* spp.) seeds during ripening // Plants. – 2020. – Vol. 9, No. 12. – Art. No. 1793. DOI: 10.3390/plants9121793
19. Bhave A., Schulzova V., Chmelarova H., Mrnka L., Hajslova J. Assessment of rosehips based on the content of their biologically active compounds // J. Food Drug. Anal. – 2017. – Vol. 25, No. 3. – P. 681–690. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.12.019
20. Дубцова Г.Н., Негматуллоева Р.Н., Бессонов В.В., Байков В.Г., Шевякова Л.В., Махова Н.Н., Передеряев О.И., Богачук М.Н., Байгарин Е.К. Состав и содержание биологически активных веществ в плодах шиповника // Вопросы питания. – 2012. – Т. 81, № 6. – P. 84–88.
21. Chu C.C., Nyam K.L. Application of seed oils and its bioactive compounds in sunscreen formulations // Journal of the American Oil Chemists’ Society. – 2021. – Vol. 98, No. 7. – P. 713–726. DOI: 10.1002/aocs.12491
22. Radice M., Manfredini S., Ziosi P., Dissette V., Buso P., Fallacara A., Vertuani S. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review // Fitoterapia. – 2016. – Vol. 114. – P. 144–162. DOI: 10.1016/j.fitote.2016.09.003
23. Олисова О.Ю., Владимирова Е.В., Бабушкин А.М. Кожа и солнце // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – Т. 15, № 6. – С. 57–62. DOI: 10.17816/dv36783
24. Свиридова А.А., Ищенко А.А. Солнцезащитные средства. I. Классификация и механизм действия органических фильтров // Химия и химическая технология. – 2006. – Т. 49, № 11 – С. 3–14.
25. Cavinato M., Jansen-Dürr P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin // Exp. Gerontol. – 2017. – Vol. 94. – P. 78–82. DOI: 10.1016/j.exger.2017.01.009
26. Wu S., Han J., Laden F., Qureshi A.A. Long-term ultraviolet flux, other potential risk factors, and skin cancer risk: a cohort study // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2014. – Vol. 23, No. 6. – P. 1080–1089. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0821
27. Fitzpatrick T.B. The validity and practicability of sun-reactive skin types I through VI // Arch. Dermatol. – 1988. – Vol. 124, No. 6. – P. 869–871. DOI: 10.1001/archderm.124.6.869
28. Smanalieva J., Iskakova J., Oskonbaeva Z., Wichern F., Darr D. Investigation of nutritional characteristics and free radical scavenging activity of wild apple, pear, rosehip, and barberry from the walnut-fruit forests of Kyrgyzstan // European Food Research and Technology. – 2020. – Vol. 246, No. 5. – P. 1095–1104. DOI: 10.1007/s00217-020-03476-1
29. Ácsová A., Hojerová J., Janotková L., Bendová H., Jedličková L., Hamranová V., Martiniaková S. The real UVB photoprotective efficacy of vegetable oils: *in vitro* and *in vivo* studies // Photochem. Photobiol. Sci. – 2021. – Vol. 20, No. 1. – P. 139–151. DOI: 10.1007/s43630-020-00009-3
30. Charles Dorni A.I., Amalraj A., Gopi S., Varma K., Anjana S.N. Novel cosmeceuticals from plants- an industry guided review // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. – 2017. – Vol. 7. – P. 1–26. DOI: 10.1016/j.jarmap.2017.05.003
31. Baumann L. How to use oral and topical cosmeceuticals to prevent and treat skin aging // Facial Plast. Surg. Clin. North. Am. – 2018. – Vol. 26, No. 4. – P. 407–413. DOI: 10.1016/j.fsc.2018.06.002
32. Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications // Nanoscale Res. Lett. – 2013. – Vol. 8, No. 1. – Art. No. 102. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102
33. Fivenson D., Sabzevari N, Qiblawi S., Blitz J, Norton B,

Norton S. Sunscreens: UV filters to protect us: Part 2-Increasing awareness of UV filters and their potential toxicities to us and our environment // International Journal of Women's Dermatology. – 2021. – Vol. 7, Issue 1. – P. 45–69. DOI: 10.1016/j.ijwd.2020.08.008
34. Takshak S., Agrawal S.B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. – 2019. – Vol. 193. – P. 51–88. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002
35. Shikov A.N., Narkevich I.A., Akamova A.V., Nemyatykh O.D., Flisyuk E.V., Luzhanin V.G., Povydysh M.N., Mikhailova Y.V., Pozharitskaya O.N. Medical Species Used in Russia for the Management of Diabetes and Related Disorders // Front. Pharmacol. – 2021. – Vol. 12. – Art. ID: 697411. DOI: 10.3389/fphar.2021.697411
36. Zhang S., Zhang L., Zou H, Qiu1 L., Zheng Y., Yang D., Wang Y. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants // Plant Physiol. Biochem. – 2020. – Vol. 148. – P. 80–89. DOI: 10.3389/fpls.2021.781236
37. Verdaguer D., Jansen M., Llorens L., Morales L., Neugart S. UV-A radiation effects on higher plants: Exploring the known unknown // Plant Sci. – 2017. – Vol. 255. – P. 72–81. DOI: 10.1016/j.plantsci.2016.11.014
38. Cefali L.C., Ataide J.A., Moriel P., Foglio M.A., Mazzola P.G. Plant-based active photoprotectants for sunscreens // Int. J. Cosmet.Sci. – 2016. – Vol. 38, No 4. – P. 346–353. DOI: 10.1111/ics.12316
39. Piovesana de Souza F., Campos G.R., Packer J.F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. // Acerola. J. Basic. Appl. Pharm. Sci. – 2013. – Vol. 34, No. 1. – P. 69–77.
40. Kumar N., Jose J. Current developments in the nanomediated delivery of photoprotective phytochemicals // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2020. – Vol. 27, No. 31. – P. 38446–38471. DOI: 10.1007/s11356-020-10100-y
41. Avila Acevedo J.G., Castañeda C.M., Benitez F.J., Durán D.A., Barroso V.R., Martínez C.G., Muñoz L.J., Martínez C.A., Romo de Vivar A. Photoprotective activity of Buddleja scordioides // Fitoterapia. – 2005. – Vol. 76, No. 3–4. – P. 301–309. DOI: 10.1016/j.fitote.2005.03.009
42. Velasco M.V.R., Balogh T.S., Pedriali C.A., Sarruf F.D., Pinto C.A.S.O., Kaneko T.M., Rolim Baby A. [Association of rutin with octyl p-methoxycinnamate and benzophenone-3: *in vitro* evaluation of photoprotective efficacy by reflectance spectrophotometry] // Lat. Am. J. Pharm. – 2008. – Vol. 27, No. 1. – P. 23–27. Portuguese
43. Velasco M.V., Sarruf F.D., Salgado-Santos I.M., Haroutiounian-Filho C.A., Kaneko T.M., Baby A.R. Broad spectrum bioactive sunscreens // Int. J. Pharm. – 2008. – Vol. 363, No. 1–2. – P. 50–57. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.06.031
44. Netto MPharm G., Jose J. Development, characterization, and evaluation of sunscreen cream containing solid lipid nanoparticles of silymarin // J. Cosmet. Dermatol. – 2018. – Vol. 17, No. 6. – P. 1073-1083. DOI: 10.1111/jocd.12470
45. Shanuja S.K., Iswarya S., Sridevi J., Gnanamani A. Exploring the UVB-protective efficacy of melanin precursor extracted from marine imperfect fungus: Featuring characterization and application studies under *in vitro* conditions // Int. Microbiol. – 2018. – Vol. 21, No. 1–2. – P. 59–71. DOI: 10.1007/s10123-018-0005-2
46. Cefali L.C. Franco J.G., Nicolini G.F., Ataide J.A., Mazzola P.G. *In vitro* antioxidant activity and solar protection factor of blackberry and raspberry extracts in topical formulation // J. Cosmet. Dermatol. – 2019. – Vol. 18, No. 2. – P. 539–544. DOI: 10.1111/jocd.12842
47. Young A.R., Narbutt J., Harrison G.I., Lawrence K.P., Bell M., O'Connor C., Olsen P., Grys K., Baczynska K.A., Rogowski-Tylman M., Wulf H.C., Lesiak A., Philipsen P.A. Optimal sunscreen use, during a sun holiday with a very high ultraviolet index, allows vitamin D synthesis without sunburn // Br. J. Dermatol. – 2019. – Vol. 181, No. 5. – P. 1052–1062. DOI: 10.1111/bjd.17888
48. Li S.X., Li M.F., Bian J., Wu X.F., Peng F., Ma M.G. Preparation of organic acid lignin submicrometer particle as a natural broad-spectrum photo-protection agent // Int. J. Biologic. Macromolecul. – 2019. – Vol. 132. – P. 836–843. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.177
49. Cefali L.C., Ataide J.A., Fernandes A.R., Sousa I.M.O., Gonçalves F.C.D.S., Eberlin S., Dávila J.L., Jozala A.F., Chaud M.V., Sanchez-Lopez E., Marto J., d'Ávila M.A., Ribeiro H.M., Foglio M.A., Souto E.B., Mazzola P.G. Flavonoid-Enriched Plant-Extract-Loaded Emulsion: A Novel Phytocosmetic Sunscreen Formulation with Antioxidant Properties // Antioxidants (Basel). – 2019. – Vol. 8, No. 10. – Art. No. 443. DOI: 10.3390/antiox8100443
50. Cho Y.H., Bahuguna A., Kim H.H., Kim D.I., Kim H.J., Yu J.M., Jung H.G., Jang J.Y., Kwak J.H., Park G.H., Kwon O.J., Cho Y.J., An J.Y., Jo C., Kang S.C., An B.J. Potential effect of compounds isolated from *Coffea arabica* against UV-B induced skin damage by protecting fibroblast cells // J. Photochem. Photobiol. B. – 2017. – Vol. 174. – P. 323–332. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.08.015
51. Musazzi U.M., Franzè S., Minghetti P., Casiraghi A. Emulsion versus nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product? // Drug Deliv. Transl. Res. – 2018. – Vol. 8, No. 2. – P. 414–421. DOI: 10.1007/s13346-017-0390-7

АВТОРЫ

Немятых Оксана Дмитриевна – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-5933-2120. E-mail: oksana.nemyatyh@pharminnotech.com

Тернинко Инна Ивановна – доктор фармацевтических наук, доцент, начальник структурного подразделения Испытательной лаборатории (Центр контроля качества лекарственных средств) ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России; профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-2942-1015. E-mail: inna.terninko@pharminnotech.com

Сабитов Асхат Султанович – преподаватель школы фармации, КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, Республика Казахстан. ORCID ID: 0000-0001-8101-2123. E-mail: acxam78@gmail.com

Ляшко Анастасия Игоревна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9534-0398. E-mail: anastasia.fitisova@pharminnotech.com

Сакипова Зуриядда Бектемировна – доктор фармацевтических наук, профессор, декан Школы фармации, КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, Республика Казахстан. ORCID ID: 0000-0003-4477-4051. E-mail: sakipova.z@kaznmu.kz

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 615. 453

РАЗРАБОТКА МИКРОКАПСУЛ НА БАЗЕ КОМБИНИРОВАННОЙ АНТИДИАБЕТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ И ЕЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

А.Ш. Гиёсзода[1], Э.Ф. Степанова[2], О.Ф. Веселова[3], С.Е. Стороженко[3]

[1] Негосударственное образовательное учреждение «Медицинский колледж» района М.С. Хамадони, 735140, Таджикистан, Хатлонская область, р. М.С.А. Хамадони ул. Сомони, д. 26
[2] Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 3573352, Россия, г. Пятигорск, пр-т Калинина, д. 11
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1

E-mail: EFStepanova@yandex.ru

Получена 30.04.2022 После рецензирования 22.06.2022 Принята к печати 15.08.2022

В статье рассматриваются результаты сравнительной оценки гипогликемической активности комбинированного препарата, содержащего микрокапсулы с фитокомпозицией, состоящей из экстрактов солодки голой, козлятника лекарственного, мяты перечной и гликлазида. Описаны способы получения микрокапсул с оригинальной оболочкой из ПЭГ-6000.

Цель. Разработать оптимальную технологию получения микрокапсул с оболочкой из ПЭГ-6000, содержащих комбинированную субстанцию антидиабетического действия и провести её подробное фармакологическое исследование на модели сахарного диабета 2-го типа. Провести подробное сравнительное фармакологическое исследование микрокапсулированной антидиабетической композиции с оболочкой на основе ПЭГ-6000, включающей гликлазид и сумму фитоэкстрактов на модели сахарного диабета 2-го типа.

Материалы и методы. В качестве основных объектов исследования были получены микрокапсулы с оболочкой из ПЭГ-6000 с использованием в качестве базовой жидкости метилмиристата. Капсулы содержали в своем составе сумму растительных экстрактов: сухой экстракт солодки голой, сухой экстракт козлятника лекарственного, сухой экстракт мяты перечной, а также гликлазид. Изучение гипогликемической активности проведено после однократного введения препаратов животным с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом 2-го типа. Оценка накопительного эффекта препаратов проведена в течение 14 суток с проведением теста на резистентность к пероральной глюкозе на 7 и 14 сутки.

Результаты. Получены микрокапсулы с оригинальной оболочкой методом диспергирования в системе жидкость-жидкость с корректировкой некоторых технологических этапов. Изучено влияние исследуемых препаратов на гликемический профиль у крыс с экспериментальной моделью сахарного диабета 2-го типа. Проведена сравнительная оценка фармакологического эффекта при раздельном и совместном применении микрокапсулированных препаратов.

Заключение. Доказана рациональность комбинирования фитокомпонентов и синтетического средства сахароснижающего действия в микрокапсулах. Полученные результаты свидетельствуют о рациональности комбинации растительных экстрактов и синтетического сахароснижающего средства – гликлазида в микрокапсулах.

Ключевые слова: микрокапсулы; ПЭГ-6000, метилмиристат; сахарный диабет; экстракт солодки голой; козлятник лекарственный (галега); мята перечная; гликлазид

Список сокращений: СД – сахарный диабет; PPAR-γ – рецептор-активатор пролиферации пероксисом; GLUT-4 – глюкозный транспортёр тип 4; AMPK – аденозинмонофосфатная протеинкиназа; ПЭГ – полиэтиленгликоль; МКЭ – микрокапсулы с растительными экстрактами; МКГ – микрокапсулы с гликлазидом; ТГ – таблетки гликлазида; Пл – плацебо; ГА – гипогликемическая активность.

Для цитирования: А.Ш. Гиёсзода, Э.Ф. Степанова, О.Ф. Веселова, С.Е. Стороженко. Разработка микрокапсул на базе комбинированной антидиабетической субстанции и ее фармакологическая характеристика. *Фармация и фармакология.* 2022;10(4):320-330. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-320-330

For citation: A. Giyoszoda, E.F. Stepanova, O.F. Veselova, S.E. Storozhenko. Development of microcapsules based on combined antidiabetic substance: pharmacological characteristics. *Pharmacy & Pharmacology.* 2022;10(4):320-330. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-320-330

Scientific and Practical Journal
PHARMACY & PHARMACOLOGY

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-320-330

DEVELOPMENT OF MICROCAPSULES BASED ON COMBINED ANTIDIABETIC SUBSTANCE: PHARMACOLOGICAL CHARACTERISTICS

A. Giyoszoda[1], E.F. Stepanova[2], O.F. Veselova[3], S.E. Storozhenko[3]

[1] Non-state educational institution "Medical College" of M.S. Hamadoni district, 26, Somoni Str., R.M.C.A. Hamadoni Khatlon region, Tajikistan, 735140
[2] Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532
[3] Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, 1, Partisan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russia, 660022

E-mail: EFStepanova@yandex.ru

Received 30 April 2022 After peer review 22 June 2022 Accepted 15 Aug 2022

The comparative assessment results of the hypoglycemic activity of a combined preparation containing microcapsules with a phytocomposition consisting of *Glycyrrhiza glabra* L. extracts, a dry extract of *Galega officinalis* L., *Mentha piperita* L., and gliclazide, are discussed in the article. Methods for obtaining microcapsules with an original PEG-6000 shell are described.

The aim of the study was to develop an optimal technology for obtaining microcapsules with a PEG-6000 shell containing a combined antidiabetic substance, and conduct its detailed pharmacological study on the model of type 2 diabetes mellitus, to conduct a detailed comparative pharmacological study of a microencapsulated antidiabetic composition with a shell based on PEG-6000, including gliclazide and a sum of phytoextracts on the model of type 2 diabetes mellitus.

Materials and methods. As the main objects of the study, microcapsules with a PEG-6000 shell were obtained using methyl miristate as the base liquid. The capsules contained the amount of plant extracts in their composition: a dry extract of *Glycyrrhiza glabra* L., a dry extract of *Galega officinalis* L., a dry extract of *Mentha piperita* L., and gliclazide. The study of a hypoglycemic activity was carried out after a single administration of drugs to the animals with alloxan-induced type 2 diabetes mellitus. The cumulative effect assessment of the drugs was carried out within 14 days with a test for the resistance to oral glucose on days 7 and 14.

Results. Microcapsules with the original shell were obtained by dispersion in a liquid-liquid system with the adjustment of some technological stages. The effect of the drugs under study on the glycemic profile in the rats with an experimental model of type 2 diabetes mellitus was investigated. A comparative evaluation of the pharmacological effect was carried out with a separate and combined use of microencapsulated preparations.

Conclusion. The rationality of combining phytocomponents and a synthetic antidiabetic agent in microcapsules has been proven. The obtained results testify to the rationality of plant extracts combination and a synthetic hypoglycemic agent – gliclazide in microcapsules.

Keywords: microcapsules; PEG-6000, methylmiristate; diabetes mellitus; *Glycyrrhiza glabra* extracts; *Galega officinalis* L; *Mentha piperita* L.; gliclazide

Abbreviations: DM – diabetes mellitus; PPAR-γ – peroxisome proliferator-activated receptor; GLUT-4 – glucose transporter type 4; AMPK – adenosine monophosphate protein kinase; PEG – polyethylene glycol; PEMC(s) – plant extract microcapsules; GMC(s) – gliclazide microcapsules; GT(s) – gliclazide tablets; PBO – placebo; HGA – hypoglycemic activity.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее проблемных аспектов современной медицины и фармации, в частности эпидемиологии, является сахарный диабет (СД), который можно рассматривать как неинфекционную эпидемию настоящего времени. Распространенность этого заболевания достигает в отдельных странах более 6% [1, 2]. При этом заболевание нестабильно, его сопровождает, как правило, частая инвалидизация [3] и летальность [4]. Особенно остро ощутилось это в последние годы, связанные с пандемией [5, 6]. Именно в этот период проблема СД достигла максимума.

Вырос интерес к профилактическим мерам – диетам, режимам питания. Однако это никак не отразилось на необходимости развития и совершенствования фармакотерапии, в которой также пришлось пересмотреть базовые акценты. Резко усилился интерес диабетологов к лекарственным растениям, которые сегодня занимают важную позицию при лечении и профилактике СД [7–8]. Поиск новых противодиабетических препаратов, полученных из лекарственных растений, является важной и стратегически значимой задачей, поскольку они содержат биоактивные фитохимические вещества, которые обладают большей активностью и безопасностью по сравнению с традиционной терапией. В то же время невозможно недооценивать

роль синтетических средств, которые на протяжении многих лет достаточно успешно решали эти вопросы – это, прежде всего, метформин, гликлазид, глибенкламид и другие известные и постоянно востребованные лекарственные средства [9–11].

Основным компонентом предложенной фитокомпозиции является экстракт солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.), которая обладает широким спектром фармакологической активности. Биологически активные вещества, содержащиеся в экстракте солодки, могут в значительной степени связываться с гамма рецепторами, активируемыми пролифераторами пероксиса (PPAR-γ), что приводит к снижению уровня глюкозы в крови. Так, халкон и аморфрутин, полученные из корня солодки, способствуют дифференцировке адипоцитов и улучшают метаболизм глюкозы и липидов. Аморфрутин повышает чувствительность клеток к инсулину и, как следствие, толерантность к глюкозе. Глабридин предотвращает непереносимость глюкозы и обеспечивает максимальную ее утилизацию путем транслокации GLUT-4 с использованием аденозинмонофосфатной протеинкиназы (AMPK) [12]. Кроме того, глицирризиновая кислота является одним из основных биоактивных компонентов солодки голой, ингибирует активность пероксидазы, эстеразы гемоглобина и опосредованное гемоглобином окислительное повреждение, при этом не влияя на способность белка связывать кислород. Данный эффект особенно важен при лечении СД, учитывая осложнения, связанные с оксидативным стрессом [13–15]. Кроме того, имеются исследования [16] о положительном влиянии экстракта солодки на микробиоту кишечника, что крайне важно, так как известно, что патогенез возникновения и тяжесть течения СД косвенно связан с нарушением ферментативного и биохимического равновесия жизнедеятельности нормальной микрофлоры кишечника.

Одним из лекарственных растений, обладающим ярко выраженным гипогликемическим эффектом, является козлятник лекарственный (*Galega officinalis* L.). В 1920-х годах было установлено, что гуанидин, активный компонент, содержащийся в траве козлятника лекарственного, снижает уровень глюкозы в крови, что стало основанием для синтеза на его основе нескольких противодиабетических соединений и, в частности, метформина [17]. Также сахароснижающий эффект связывают с содержащимся в растении алкалоидом галегином [18]. Тем не менее, изучение антидиабетических свойств козлятника продолжается. На сегодняшний день доказано снижение концентрации глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови животных на фоне введения экстракта галеги, а также повышение толерантности клеток к глюкозе, увеличение содержания С-пептида и инсулина в плазме крови. В исследованиях *in vivo* подтверждено цитопротекторное действие экстракта козлятника лекарственного на клетки поджелудочной железы, выраженное в увеличении числа островков Лангерганса, их средней площади, диаметра, объема и количества β-клеток [19, 20]. Установлено, что экстракт галеги лекарственной регулирует связанные с СД нарушения пролиферации, функции и апоптоза лейкоцитов, тем самым обладает выраженным иммунокорригирующим действием [21].

Среди потенциально новых источников лекарств следует выделить ароматические растения, богатые эфирными маслами, такие как *Mentha piperita* L., *Melissa officinalis* L., *Cuminum cyminum* L. Данные растения очень перспективны из-за их разнообразного химического состава и множественных механизмов действия. Так, антидиабетический эффект мяты перечной связан с ингибированием АТФ-чувствительных K^+-каналов на мембране β-клеток, усилением экзоцитоза инсулина под действием ментола. Кроме того, ментол повышает выживаемость β-клеток, стимулируя экспрессию Bcl-2, антиапоптотического фактора и защищает β-клетки поджелудочной железы от апоптоза в модели диабета у крыс [22, 23]. Кроме того, гипогликемический эффект экстракта мяты связывают с ингибирующим действием на α-амилазу и α-глюкозидазу, что, в свою очередь, оказывает значительное ингибирующее действие постпрандиальной гипергликемии [24].

Таким образом, приведенные литературные сведения о спектре сахароснижающей активности солодки, козлятника и мяты, подтверждают рациональность включения экстрактов данных лекарственных растений в состав предложенной фитокомпозиции и разработки на их основе комбинированных лекарственных форм антидиабетической направленности.

ЦЕЛЬ. Разработать оптимальную технологию получения микрокапсул с оболочкой из ПЭГ-6000, содержащих комбинированную субстанцию антидиабетического действия и провести её подробное фармакологическое исследование на модели сахарного диабета 2-го типа. Провести подробное сравнительное фармакологическое исследование микрокапсулированной антидиабетической композиции с оболочкой на основе ПЭГ-6000, включающей гликлазид и сумму фитоэкстрактов на модели сахарного диабета 2-го типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Основным объектом исследования являлись микрокапсулы, содержащие в своем составе композицию сухих экстрактов солодки голой, козлятника лекарственного, мяты перечной

в соотношении 6:1:3 соответственно, а также гликлазид в традиционной дозировке. В качестве пленкообразователя для микрокапсул был выбран ПЭГ-6000 с плотностью 1200 кг/м^3, растворимый в воде и спирте, не токсичный. Метилмиристат – технологическая среда, прозрачная, бесцветная жидкость с низкой температурой плавления. Для получения микрокапсул использовали сухие экстракты солодки голой, козлятника лекарственного, мяты перечной, полученные от производителя ООО «Казанский завод экстрактов» (Россия), влажность экстрактов составляла не более 4,8%.

Препарат сравнения

Для сравнительной оценки гипогликемической активности препаратом сравнения была выбрана таблетированная форма гликлазида (60 мг, производитель ООО «СЕРВЬЕ РУС», Россия). С этой целью использовали модельные таблетки с содержанием действующего вещества 2,5 мг. Препарат вводили с помощью желудочного зонда с учетом межвидового коэффициента пересчета, в несколько приемов для достижения необходимой дозы гликлазида.

Оборудование

Измерение концентрации глюкозы в крови животных с экспериментальной моделью сахарного диабета 2-го типа осуществляли с использованием глюкометра Accu-Chek Performa Nano (Roche Diagnostics GmbH, Германия).

Получение микрокапсул осуществляли с использованием верхнеприводной мешалки US-1170D с четырехлопастной пропеллерной насадкой (ULAB, Россия). В качестве реактора для получения микрокапсул использовали сосуд с полусферическим дном объемом 500 мл.

Баня водяная шестиместная LOIP LB-161 (АО ЛОИП, Россия).

Введение исследуемых препаратов осуществляли с помощью внутрижелудочного металлического зонда для грызунов.

Получение микрокапсул

Учитывая оригинальность используемой впервые оболочки микрокапсул ПЭГ-6000, был выбран наиболее надежный технологический способ диспергирования в системе жидкость-жидкость. В реактор с базовой средой в виде метилмиристата при температуре 40°С последовательно, тонкой струйкой подавали насыщенный комплекс: 25,0 г раствора суммы экстрактов и 25,0 г раствора гликлазида совместно со 100 г раствора, формирующим оболочку микрокапсул ПЭГ-6000. При этом, определяющим технологическую новизну является выбор базового раствора и активное перемешивающее устройство – пропеллерная мешалка, работающая со скоростью 500–600 об/мин. Также менялся температурный фактор, быстро переходящий из состояния подогрева в искусственное охлаждение. Образующиеся в масле капли быстро застывали, от чего формировались сферические частицы, которые затем отделяли от раствора метилмиристата и промывали спиртом этиловым 90%, следя за тем, чтобы не произошло растворения оболочки. Стандартизация готового продукта микрокапсул проводилась по их сыпучести и углу естественного откоса, который составлял 30°, что свидетельствовало о нормальном технологическом цикле [25].

Экспериментальные животные

Гипогликемическую активность (ГА) исследуемых препаратов изучали на крысах – самцах линии «Wistar» массой 200–220 г, с аллоксан-индуцированным СД. Животные получены из Новосибирского питомника лабораторных животных (ГУП ПИТОМНИК СО РАМН) и содержались в виварии ФГБОУ ВО КрасГМУ Минздрава России. Работу с лабораторными животными проводили согласно Директиве № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, использующихся для научных целей» и ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Животных содержали в конвенциональных клетках площадью 820 см^2, с подстилкой из опилок нехвойных пород древесины, температура воздуха в помещении 22±2°С, относительная влажность воздуха – 65±5%, при свободном доступе к воде и корму. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО КрасГМУ Минздрава России (протокол № 104/2021 от 17.04.2021 г.).

Постановка модели СД 2-го типа

Постановку модели аллоксан-индуцированного СД осуществляли классическим способом в соответствии с руководством А.М. Миронова[1]. Животным внутрибрюшинно вводили 5% раствор никотинамида в дозе 230 мг/кг, с последующим введением через 15 минут 5% раствора аллоксана из расчета 150 мг/кг. На 4-ые сутки после инъекции аллоксана были сформированы 5 групп животных (n=8) с средним содержанием глюкозы в крови более 20 ммоль/л по принципу парных аналогов. Дозы вводимых препаратов были выбраны с учетом ранее проведенных исследований [26, 27] и рассчитаны с учетом межвидового коэффициента пересчета доз. Изучаемые вещества и препарат сравнения вводили в желудок с помощью металлического зонда.

Введение препаратов осуществляли в течение 14 дней согласно следующей схеме:

Группа 1 – микрокапсулы с растительными экстрактами (МКЭ) – 750 мг/кг;

Группа 2 – микрокапсулы с гликлазидом (МКГ) – 150 мг/кг;

[1] Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (часть первая), под ред. А.Н. Миронова – М: Гриф и К, 2012. – 944 с.

Группа 3 – таблетки гликлазида (ТГ) – 60 мг/кг – группа сравнения;

Группа 4 – комбинация микрокапсул (МКЭ + МКГ);

Группа 5 – 2,5 мл воды очищенной (Пл) – контрольная группа.

Определение гипогликемического эффекта

Оценку ГА осуществляли путем мониторинга концентрации глюкозы в крови животных в течение 24-х часов после однократного введения исследуемых препаратов. Учитывая установленный накопительный сахароснижающий эффект, характерный для данной фитокомпозиции и подтвержденный для микрокапсул с желатиновой оболочкой, была изучена эффективность разработанных микрокапсул с оболочкой на основе ПЭГ-6000 при длительном применении. С этой целью проведены тесты на резистентность к пероральной глюкозе на 7 и 14 сутки согласно методикам [26, 27]. Общий дизайн исследования гипогликемической активности исследуемых микрокапсулированных препаратов представлен на рисунке 1. Схема проведения теста на резистентность к глюкозе представлена рисунке 2.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ «Microsoft Excel» (2016), методом описательной статистики, рассчитывали среднее значение (Mean) исследуемого показателя и стандартное отклонение (σ). Нормальность распределения выборки определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для оценки различий между количественными ненормально распределенными данными связанных выборок использовался Т-критерий Вилкоксона, для нормально распределенных данных несвязанных выборок использовался t-критерий Стьюдента ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования ГА после однократного введения микрокапсул, содержащих композицию растительных экстрактов, гликлазид, а также их комбинацию, представлены в таблице 1.

Сопоставление представленных данных в таблице 1 показывает, что снижение концентрации глюкозы в плазме крови животных установлено во всех группах после однократного введения исследуемых препаратов, кроме контрольной. Значимого снижения уровня глюкозы в крови животных контрольной группы в течение 24 ч после начала эксперимента не наблюдалось. ГА на фоне применения микрокапсул с растительными экстрактами развивается через 4 ч и поддерживается в течение 8 ч. После введения МКГ, ГА проявляется через 2 ч и продолжает нарастать в течение 10 ч. Однако достижения физиологического уровня глюкозы в крови животных после однократного введения монопрепаратов не наблюдается в течение 24-х ч. При комбинации МКЭ + МКГ, фармакологический эффект наступает через 2 ч и через 6 ч концентрация глюкозы в крови животных достигает физиологического уровня. После однократного введения разработанных микрокапсул и препарата сравнения стабильный гипогликемический эффект наблюдается с 6 по 12 час. При этом средний уровень глюкозы в крови животных в данном временном интервале составил: для группы 1 – 18,0 ± 1,4 ммоль/л; группы 2 – 11,8 ± 0,9 ммоль/л; группы 3 – 6,6 ± 0,2 ммоль/л; группы 4 – 7,7 ± 0,6 ммоль/л; уровень глюкозы в крови контрольной группы животных составлял 24,7 ± 1,9 ммоль/л.

По результатам статистического анализа полученных результатов ГА комбинации МКЭ + МКГ, сопоставима с таблетированной формой гликлазида. Кроме того, комбинированная композиция микрокапсул превосходит по фармакологической активности микрокапсулы, содержащие только один компонент. Через 6 ч после введения препаратов уровень глюкозы в крови животных группы 4снизился на 68,8% ($p < 0,05$), в то время, как концентрация глюкозы в крови животных в группе 1 и 2 уменьшилась на 22,9% ($p < 0,05$) и 51,4% ($p < 0,05$) соответственно. Также следует отметить, что через 6 ч после введения комбинации МКЭ + МКГ, и препарата сравнения, имеются значимые различия в средних значениях уровня глюкозы в крови животных соответствующих групп. Концентрация глюкозы в крови животных, получающих комбинацию МКЭ + МКГ (группа 4), на 23,3% ($p < 0,05$) больше, чем в крови животных, получавших ТГ. Отсутствие статистически значимых различий в исходных значениях концентрации глюкозы в плазме крови животных данных групп свидетельствует о разных фармакокинетических характеристиках лекарственных форм исследуемых препаратов, а именно, о разной степени элонгации.

Анализируя результаты мониторинга уровня глюкозы в плазме крови животных, можно заключить, что стабильный гипогликемический эффект после однократного введения разработанных микрокапсул наблюдался не сразу, также, как и при однократном введении препарата сравнения, во временном диапазоне с 4 по 12 час после введения препаратов. Однако значимое снижение глюкозы крови в данном временном интервале замечено при применении таблеток гликлазида (3 группа животных), при использовании микрокапсул с гликлазидом (2 группа животных) и при введении комбинации микрокапсул (4 группа). При этом показатели уровня глюкозы в плазме крови животных 3 и 4 групп почти равнозначны и чуть ниже, чем во 2 группе, что может указывать на наличие потенцирования гипогликемического эффекта при комбинации растительных компонентов с синтетическим препаратом.

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-320-330

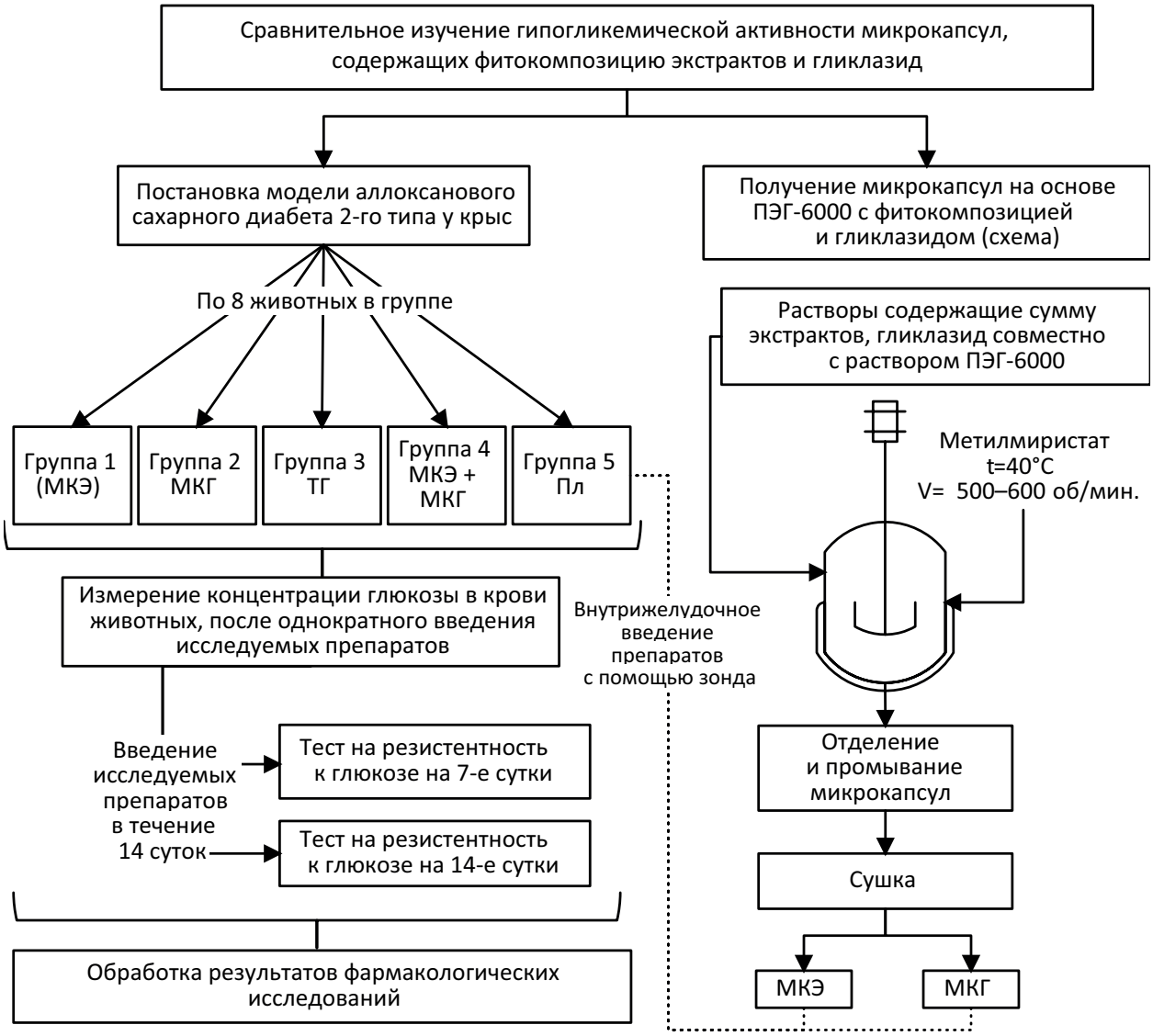


Рисунок 1 – Дизайн исследования

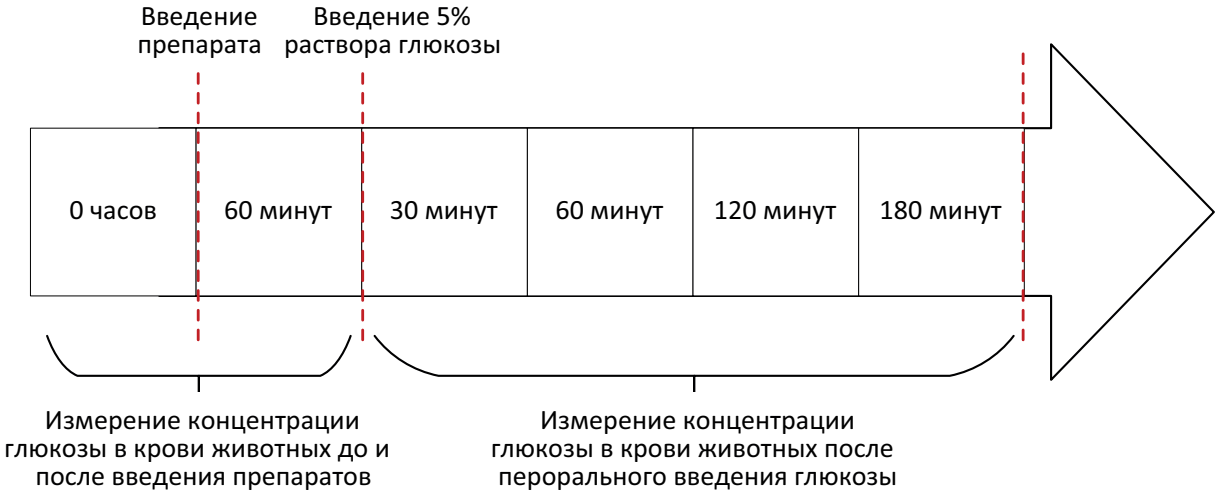


Рисунок 2 – Схема проведения теста на резистентность к глюкозе на 7 и 14 сутки

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Таблица 1 – Уровень глюкозы в крови животных с экспериментальной моделью СД 2-го типа, после однократного введения исследуемых препаратов

Группа	Время, ч							
	0	2	4	6	8	10	12	24
1	25,3±3,8	23,5±4,1#	20,9±3,4#	19,5±2,3*#	19,1±4,3*#	16,8±5,3*#	16,8±4,5*#	23,6±4,4#
2	25,1±3,3	18,5±2,6	15,3±1,9*#	12,2±1,7*#	11,2±1,0*#	11,0±0,7*#	13,0±0,9*#	24,3±4,2#
3	27,7±2,4	15,1±3,8*	8,4±2,4*	6,6±1,1*	6,4±0,9*	6,5±0,7*	6,8±0,5*	12,9±1,8*
4	27,6±4,0	17,6±3,0*	10,2±2,2*	8,6±2,0*#	7,3±1,7*	7,3±1,5*	7,5±1,3*	26,5±3,0#
5	21,7±1,2	22,1±0,6	21,7±0,8	25,7±0,5	26,4±0,9	24,5±0,6	22,2±1,2	26,1±1,4

Примечание: результаты представлены как Mean±σ; * – средние значения концентрации глюкозы в крови, значимо отличающиеся от контрольной группы (p <0,05) и # – средние значения концентрации глюкозы в крови, значимо отличающиеся от группы сравнения (p <0,05), по результатам анализа методом t-критерия Стьюдента.

Таблица 2 – Результаты изучения накопительного эффекта на 7 сутки

Группа	Средняя концентрация глюкозы ммоль/л					
	Введение препарата		Введение глюкозы			
	0	60 мин	30 мин	60 мин	120 мин	180 мин
1	25,3 ± 4,4#	24,4 ± 4,4#	24,0 ± 4,2#	25,8 ± 3,3#	25,5 ± 4,6#	24,0 ± 4,2#
2	23,5 ± 4,8#	20,7 ± 5,5*#	18,0 ± 4,6*#	16,6 ± 3,8*#	14,4 ± 3,4*#	13,6 ± 3,5* #
3	6,4 ± 0,7*	6,2 ± 0,9*	6,9 ± 1,1*	6,0 ± 1,1*	5,8 ± 0,8*	5,8 ± 0,8*
4	19,8 ± 1,8*#	12,4 ± 1,5*#	9,9 ± 1,0*#	6,8 ± 0,6*	6,8 ± 0,5*#	6,8 ± 0,4* #
5	23,9 ± 3,5	24,9 ± 4,0	28,5 ± 2,9	28,7 ± 4,2	26,7 ± 2,8	25,4 ± 2,0

Примечание: результаты представлены как Mean±σ; * – средние значения концентрации глюкозы в крови, значимо отличающиеся от контрольной группы (p <0,05) и # – средние значения концентрации глюкозы в крови, значимо отличающиеся от группы сравнения (p <0,05), по результатам анализа методом t-критерия Стьюдента.

Таблица 3 – Результаты изучения накопительного эффекта на 14 сутки

Группа	Средняя концентрация глюкозы ммоль/л					
	Введение препарата		Введение глюкозы			
	0	60 мин	30 мин	60 мин	120 мин	180 мин
1	18,2 ± 3,2*#	17,9 ± 3,3*#	16,5 ± 4,2*#	17,6 ± 4,4*#	16,0 ± 3,4*#	12,2 ± 2,5*#
2	14,0 ± 2,3*#	12,7 ± 1,4*#	12,7 ± 1,6*#	12,4 ± 1,5*#	11,6 ± 0,9*#	11,1 ± 0,7*#
3	6,7 ± 1,0*	5,6 ± 1,3*	5,6 ± 1,2*	5,9 ± 1,1*	6,1 ± 1,3*	6,3 ± 1,2*
4	12,6 ± 1,4*#	9,0 ± 0,5*#	8,5 ± 0,5*#	6,6 ± 0,4*	6,5 ± 0,4*	6,5 ± 0,4*
5	21,7 ± 3,3	21,3 ± 3,0	27,0 ± 2,8	28,7 ± 1,0	28,3 ± 2,4	28,1 ± 1,4

Примечание: результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; * – средние значения концентрации глюкозы в крови, значимо отличающиеся от контрольной группы (p <0,05). # – средние значения концентрации глюкозы в крови, значимо отличающиеся от группы сравнения (p <0,05), по результатам анализа методом Т-критерия Стьюдента.

Таким образом, изучен и подтвержден профиль ГА исследуемых препаратов после однократного введения. Достоверно установлено, что описанный выше гипогликемический эффект микрокапсул на основе ПЭГ-6000, содержащих комбинацию МКЭ + МКГ, можно охарактеризовать, как более отсроченный и пролонгированный.

Как отмечалось в ранее проведенных исследованиях[2] [25], для композиции экстрактов лекарственных растений характерен накопительный гипогликемический эффект. В подтверждение данной тенденции для микрокапсул на основе ПЭГ-6000 был проведен тест на резистентность к алиментарному введению глюкозы на 7-й и 14-й день исследования. С этой целью, через час после введения исследуемых препаратов, животным всех экспериментальных групп внутрижелудочно с помощью зонда вводили 2,5 мл 5% раствора глюкозы и измеряли уровень глюкозы в крови в течение следующих 3-х часов. Результаты изучения резистентности к пероральной глюкозе на 7 сутки терапии представлены в таблице 2.

По данным, представленным в таблице 2, можно отметить, что уровень глюкозы в крови животных исследуемых групп до введения

[2] Там же.

препаратов на 7 сутки был выше физиологического во всех экспериментальных группах, кроме группы 3. Уровень глюкозы в крови животных контрольной группы был высоким на протяжении всего времени эксперимента. Так же стоит отметить, что концентрация глюкозы в крови животных группы 1 и 2 до введения препаратов не имеет значимых изменений по сравнению с контрольной группой.

Концентрация глюкозы в крови животных, получающих микрокапсулы с растительными экстрактами (группа 1), находилась на высоком уровне на протяжении всего эксперимента, статистически значимых изменений не выявлено (p >0,05) как на фоне введения препарата, так и на фоне перорального введения глюкозы.

Содержание глюкозы в крови животных группы 2 уменьшилось на 13,5% (p <0,05) от исходного значения. Данная тенденция сохранялась внутри группы на протяжении всего эксперимента и к концу теста наблюдалось уменьшение содержания глюкозы в крови животных на 42,1% (p <0,05), что свидетельствует о плавном нарастании фармакологического эффекта. Несмотря на то, что снижение концентрации глюкозы в крови до физиологического уровня не наблюдалось, животные проявляли резистентность к пероральной глюкозе, на фоне применения микрокапсул с гликлазидом.

Уровень глюкозы в крови животных, получающих препарат сравнения (группа 3), до введения препарата находился на уровне физиологической нормы, что связано с проявлением характерного для таблеток гликлазида стабильного гипогликемического эффекта. Данная тенденция сохранялась на протяжении всего эксперимента. Повышение концентрации глюкозы в крови животных группы 2 на фоне алиментарной нагрузки не наблюдалось, что также свидетельствуют о стабильности препарата сравнения.

Уровень глюкозы в крови животных получающих комбинированную терапию микрокапсулами (группа 4) на 7-е сутки был выше физиологической нормы до введения препарата. При этом концентрация глюкозы была на 67,7% (p <0,05) выше, чем у животных группы сравнения, но на 17,2% (p <0,05) ниже уровня в контрольной группе. Однако после введения препарата гипогликемический эффект нарастал и уже через 60 мин было установлено статистически значимое (Т-критерий Вилкоксона) снижение концентрации глюкозы в крови животных группы 4 на 37,4% (p <0,05) с сохранением динамики. Через 60 мин после перорального введения глюкозы уровень гликемии в крови животных группы 4 снизился на 65,7% (p <0,05) с поддержанием физиологически значимого уровня до конца теста, что свидетельствует о резистентности животных получавших комбинацию микрокапсул.

По результатам статистического анализа можно сказать, что введение комбинации микрокапсул (группа 4) способствовало проявлению сопоставимого с препаратом сравнения (группа 3) эффекта толерантности через 60 мин после перорального введения глюкозы.

По результатам проведенного теста на резистентность к алиментарной глюкозе на 7 сутки исследования, терапия комбинацией МКЭ + МКГ дает более выраженный фармакологический эффект по сравнению с раздельным применением.

В таблице 3 представлены результаты изучения резистентности к пероральной глюкозе на 14 сутки введения исследуемых препаратов.

По результатам, представленным в таблице 3, можно сказать, что концентрация глюкозы в плазме крови животных исследуемых групп до введения препаратов на 14 сутки также была выше физиологической нормы во всех экспериментальных группах, кроме группы сравнения. Уровень глюкозы в крови животных, получавших препарат сравнения (группа 3), находился на физиологическом уровне как до введения препарата, так и после. Основываясь на результатах статистического анализа показателей гликемии в крови животных 3 группы (Т-критерий Вилкоксона), можно сказать, что наблюдаемые изменения после алиментарной нагрузки являются статистически незначимым (p >0,05).

Стоит отметить, что уровень глюкозы до введения препаратов на 14 сутки в группах 1, 2 и 4 снизился на 28,1% (p <0,05), 40,4% (p <0,05) и 36,4% (p <0,05) по сравнению со значениями данного параметра в соответствующих группах на 7 сутки. Кроме того, концентрация глюкозы в группах 1, 2 и 4 до введения препаратов на 14 сутки была ниже на 16,1% (p <0,05), 35,5% (p <0,05) и 41,9% (p <0,05) концентрации глюкозы в плазме крови контрольной группы, что в совокупности свидетельствует о проявлении накопительного антидиабетического эффекта исследуемых препаратов микрокапсул.

Через 60 мин после введения микрокапсул установлено значимое изменение концентрации глюкозы в крови животных 2 и 4 групп от исходного уровня на 9,3% (p <0,05) и 28,6% (p <0,05) соответственно. Данная тенденция сохранялась на протяжении всего эксперимента и через 60 мин, после перорального введения глюкозы, в группе 4 наблюдалось снижение концентрации глюкозы на 47,6% (p <0,05) с поддержанием физиологически значимого уровня. В то время, как в группе 2 к концу эксперимента наблюдалось уменьшение содержания глюкозы в крови животных лишь на 20,7% (p <0,05). Средний уровень глюкозы в крови животных, получавших микрокапсулы с растительными экстрактами (группа 1), значимо снизился на 32,9% (p <0,05) от исходного уровня только к окончанию теста. При этом снижение концентрации глюкозы в крови животных группы 1 и 2 до уровня нормы не установлено.

Уровень глюкозы в крови животных контрольной группы был высоким на протяжении всего времени эксперимента и через 30 мин после введения пероральной глюкозы отмечалось значимое повышение ее концентрации в крови.

Анализируя динамику изменения концентрации глюкозы в крови животных исследуемых групп, стоит отметить, что значимое снижение глюкозы наблюдалось в группах 2, 3 и 4 как после введения терапии, так и на фоне введения глюкозы, в сравнении с контрольной группой. Однако, как отмечалось ранее, снижение концентрации глюкозы в крови животных, получавших терапию монопрепаратами микрокапсул до физиологической нормы, не наблюдалось. В то время, как введение комбинации МКЭ + МКГ дает сопоставимый с препаратом сравнения гипогликемический эффект через 2 часа после введения как на 7, так и на 14 сутки.

Более выраженный терапевтический эффект при комбинации растительных экстрактов и гликлазида, вероятнее всего, связан с потенцированием действия, вызванным более широкой направленностью действия растительных компонентов. Это и снижение глюкозы в крови, связанное с взаимодействием биологически активных веществ экстракта солодки с PPAR-γ рецепторами и благодаря повышению утилизации путем GLUT-4 транспортной системы и повышению чувствительности клеток к инсулину [12]. Активные компоненты экстракта козлятника способствуют увеличению количества островков Лангерганса, и повышению чувствительности клеток к инсулину [19, 20]. Разносторонняя направленность механизмов гипогликемического действия применяемых растительных компонентов имеет особо важное значение, учитывая гипогликемическое действие гликлазида реализуемое за счет стимулирования секреции инсулина. Дополнительное ингибирование α-амилазы и α-глюкозидазы активными компонентами экстракта мяты перечной [24] способствует повышению резистентности к алиментарным факторам развития гипергликемии. Указанные эффекты в совокупности способствуют разносторонней направленности терапии, что является положительной характеристикой предложенного состава микрокапсул.

Таким образом, по результатам изучения накопительного эффекта исследуемых препаратов в течение 14-ти суток, введение комбинации МКЭ + МКГ дает более выраженный фармакологический эффект по сравнению с их раздельным применением. ГА комбинации сопоставима с препаратом сравнения и имеет значимые статистические отличия в сравнении с контрольной группой животных. Для разработанной оригинальной противодиабетической субстанции, состоящей из суммы фитоэкстрактов (сухие экстракты солодки, козлятника, мяты) с добавлением гликлазида, т.е. комбинированного состава, характерно фармакологическое потенцирование. В качестве лекарственной формы и средства доставки разработанные микрокапсулы на основе ПЭГ-6000, содержащие весь комплекс активных веществ, проявляли достаточно оригинальный профиль ГА. Комбинация биологически активных веществ растительного происхождения, учитывая их разностороннюю направленность действия, с синтетическим противодиабетическим средством в одной лекарственной форме имеет ряд преимуществ перед классическими гипогликемическими препаратами, а именно – диапазонность и вариабельность действия. Также использование микрокапсул позволяет добиться уменьшения раздражающего действия лекарственной формы на желудочно-кишечный тракт, характерного для таблеток.

Кроме того, микрокапсулы имеют определенные технолого-экономические преимущества – это возможность снижение дозы гликлазида, а учитывая их пролонгированность, полученные микрокапсулы в дальнейшем могут быть использованы как промежуточный и подготовительный этап для конструирования формы – спансулы. Поэтому фармакологическая роль разработанных микрокапсул очевидна, а ее фиксация и обсуждение, представленные в настоящей статье, необходимы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и обоснована технология получения микрокапсул с оболочкой на базе ПЭГ-6000. Показано, что микрокапсулы, содержащие исследуемый комплекс – сумму растительных экстрактов и гликлазид – обладают выраженным положительным свойством постепенного развития гипогликемического эффекта. Введение комбинации микрокапсул вызывает более выраженный фармакологический отклик, сопоставимый с препаратом сравнения по сахароснижающей активности, но и не уступает ему по степени элонгации. Кроме того, вызывает сопоставимую резистентность к алиментарному введению глюкозы, что подтверждает целесообразность выбранной технологии и оригинальность структуры оболочки микрокапсул.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А. Гиёсзода – разработка состава и получение микрокапсул с композицией экстрактов и гликлазидом, написание статьи; Э.Ф. Степанова – разработка дизайна исследования, разработка состава микрокапсул, общее руководство исследованием, написание статьи; О.Ф. Веселова, С.Е. Стороженко – проведение фармакологических исследований, статистическая обработка результатов, написание статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета на 01.01.2021 // Сахарный диабет. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 204–221. DOI: 10.14341/DM12759
2. Дедов И.И., Мокрышева Н.Г., Шестакова М.В., Никонова Т.В., Майоров А.Ю., Галстян Г.Р., Шамхалова М.Ш., Барышева В.О., Аметов А.С., Анциферов М.Б., Бабенко А.Ю., Бардымова Т.П., Валеева Ф.В., Вачугова А.А., Гринева Е.Н., Демидова Т.Ю., Киселева Т.П., Куницына М.А., Маркова Т.Н., Мкртумян А.М., Петунина Н.А., Руяткина Л.А., Салухов В.В., Суплотова Л.А., Хадарцева Е.Л., Халимов Ю.Ш. Контроль гликемии и выбор антигипергликемической терапии у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и COVID-19: консенсусное решение совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов // Сахарный диабет. – 2022. – Т. 25, № 1. – С. 27–49. DOI: 10.14341/DM12873
3. Лунева И.Е., Супонева Н.А. Когнитивные нарушения у больных сахарным диабетом // Эффективная фармакотерапия. – 2022. – Т. 18, № 10. – С. 38–44. DOI: 10.33978/2307-3586-2022-18-10-38-44
4. Маркова Т.Н., Пономарева А.А., Самсонова И.В., Кичигин В.А., Арефьева Н.А. Факторы риска летального исхода у больных сахарным диабетом 2 типа и новой коронавирусной инфекцией // Эндокринология. Новости. Мнения. Обучение. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 8–16. DOI: 10.33029/2304-9529-2022-11-1-8-16
5. Рогожкина А.В., Романова Е.С., Старцева Г.Ю., Филипович О.М., Погромская М.Н., Федуняк И.П. Сравнительная характеристика больных новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа // Профилактическая и клиническая медицина. – 2022. – Т. 2, № 83. – С. 72–78. DOI: 10.47843/2074-9120_2022_2_72
6. Карасева, А.А., Худякова А.Д., Рагино Ю.И. Нарушения метаболизма и риск заболевания COVID-19 // Сибирский научный медицинский журнал. – 2022. – Т. 42, № 1. – С. 1–12. DOI: 10.18699/SSMJ20220101
7. Якимова Т.В., Насанова О.Н., Венгеровский А.И. Влияние экстрактов лекарственных растений на метаболические нарушения при модели сахарного диабета и инсулинорезистентности // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14. – № 2. – С. 75–81.
8. Ismail H.F., Hashim Z., Zaidel D.N.A., Zainol S.N., Tap F.M., Majid F.A.A., Zakaria N.H. Triple-action of the standardized antidiabetic polyherbal extract; Synacinn™ through upregulation of GLUT 4 and inhibition of DPP(IV), α-amylase, and α-glucosidase activity // Med. J. Malaysia. – 2022. – Vol. 77, Suppl. 1. – P. 16–22.
9. Павец, Н.Р., Джавахян М.А. Анализ номенклатуры лекарственных препаратов, применяемых при сахарном диабете // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23, № 6. – С. 10–15. DOI 10.29296/25877313-2020-06-02
10. Eroglu T.E., Jia L., Blom M.T., Verkerk A.O., Devalla H.D., Boink G.J.J., Souverein P.C., de Boer A., Tan H.L. Sulfonylurea antidiabetics are associated with lower risk of out-of-hospital cardiac arrest: real-world data from a population-based study // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2021. – Vol. 87, No. 9. – P. 3588–3598. DOI: 10.1111/bcp.14774
11. Naik A., Adeyemi S.B., Vyas B., Krishnamurthy R. Effect of co-administration of metformin and extracts of *Costus pictus* D.Don leaves on alloxan-induced diabetes in rats // J. Tradit. Complement. Med. – 2021. – Vol. 12, No. 3. – P. 269–280. DOI: 10.1016/j.jtcme.2021.08.007
12. Hasan M.K., Ara I., Mondal M.S.A., Kabir Y. Phytochemistry, pharmacological activity, and potential health benefits of *Glycyrrhiza glabra* // Heliyon. – 2021. – Vol. 7, No. 6. – Art. No. 07240. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07240
13. Jafari F., Jafari M., Moghadam A.T., Emami S.A., Jamialahmadi T., Mohammadpour A.H., Sahebkar A. A Review of *Glycyrrhiza glabra* (Licorice) Effects on Metabolic Syndrome // Adv. Exp. Med. Biol. – 2021. – Vol. 1328. – P. 385–400. DOI: 10.1007/978-3-030-73234-9_25
14. Sen S., Singh R. Glycyrrhiza glabra alcoholic root extract ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-induced free iron-mediated oxidative reactions // J. Food. Biochem. – 2021. – Vol. 45, No. 12 – Art. No. 13970. DOI 10.1111/jfbc.13970
15. Sen S. Liposome-encapsulated glycyrrhizin alleviates hyperglycemia and glycation-induced iron-catalyzed oxidative reactions in streptozotocin-induced diabetic rats // J. Liposome Res. – 2022 – Vol. 15. – P. 1–10. DOI: 10.1080/08982104.2022.2036756
16. Zhang Y., Xu Y., Zhang L., Chen Y., Wu T., Liu R., Sui W., Zhu Q., Zhang M. Licorice extract ameliorates hyperglycemia through reshaping gut microbiota structure and inhibiting TLR4/NF-κB signaling pathway in type 2 diabetic mice // Food Res Int. – 2022. – Vol. 153. – Art. No. 110945. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.110945
17. Wang G.S., Hoyte C. Review of Biguanide (Metformin) Toxicity // J. Intensive Care Med. – 2019. – Vol. 34, No. 11–12. – P. 863–876. DOI: 10.1177/0885066618793385
18. Khezri M., Asghari Zakaria R., Zare N., Johari-Ahar M. Improving galegine production in transformed hairy roots of *Galega officinalis* L. via elicitation. // AMB Express. – 2022. – Vol. 12, No. 1. – Art. No. 65. DOI: 10.1186/s13568-022-01409-7
19. Hachkova H., Nagalievska M., Soliljak Z., Kanyuka O., Kucharska A.Z., Sokol-Letowska A., Belonovskaya E., Buko V., Sybirna N. Medicinal Plants *Galega officinalis* L. and Yacon Leaves as Potential Sources of Antidiabetic Drugs // Antioxidants (Basel). – 2021. – Vol. 10, No. 9. – Art. No. 1362. DOI: 10.3390/antiox10091362
20. Kurylo K., Budniak L., Volska A., Zablotskyy B., Klishch I. Influence of phytocompositions on dynamics of changes in basal glycemia and glycemia in oral glucose tolerance test in rats with streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes mellitus type 2 // Georgian Med News. – 2020. – Vol. 300. – P. 112–116.

21. Nagalievska M., Sabadashka M., Hachkova H., Sybirna N. *Galega officinalis* extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes // BMC Complement. Altern. Med. – 2018. – Vol. 18, No. 1. – Art. No. 4. DOI: 10.1186/s12906-017-2079-3
22. Heghes S.C., Filip L., Vostinaru O., Mogosan C., Miere D., Iuga C.A., Moldovan M. Essential Oil-Bearing Plants From Balkan Peninsula: Promising Sources for New Drug Candidates for the Prevention and Treatment of Diabetes Mellitus and Dyslipidemia // Front. Pharmacol. – 2020 – Vol. 11. – Art. No. 989. DOI: 10.3389/fphar.2020.00989
23. Abdellatief S.A., Beheiry R.R., El-Mandrawy S.A.M. Peppermint essential oil alleviates hyperglycemia caused by streptozotocin- nicotinamide-induced type 2 diabetes in rats // Biomed. Pharmacother. – 2017. – Vol. 95. – P. 990–999. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.020
24. Agawane S.B., Gupta V.S., Kulkarni M.J., Bhattacharya A.K., Koratkar S.S. Chemo-biological evaluation of antidiabetic activity of *Mentha arvensis* L. and its role in inhibition of advanced glycation end products // J. Ayurveda. Integr. Med. – 2019. – Vol. 10, No. 3. – P. 166–170. DOI: 10.1016/j.jaim.2017.07.003
25. Степанова Э.Ф., Полковникова Ю.А., Куль И.Я. Изучение влияния условий микрокапсулирования на физико-технологические характеристики микрокапсул афобазола // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 5. – С. 75–77
26. Гиёсзода А., Степанова Э.Ф., Огай М.А., Стороженко С.Е., Веселова О.Ф., Морозов Ю.А., Макиева М.С., Морозова Е.В., Бутенко Л.И., Сливкин А.И., Беленова А.В. Исследование сахароснижающей активности фитокомпозиций антидиабетической направленности действия // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – № 4. – С. 96–104.
27. Гиёсзода А., Степанова Э.Ф., Шаропов Ф.С., Бобизода М.Г., Назаров У.А. Исследование фитохимической платформы ряда растений, обладающих антидиабетическим эффектом // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2021. – № 4. – С. 89–97. DOI: 10.36107/spfp.2021.267

АВТОРЫ

Гиёсзода Асомуддин – кандидат биологических наук, заместитель директора по науке, практике и инновации НОУ «Медицинский колледж» района М.С. Хамадони, Республика Таджикистан. ORCID ID: 0000-0002-7889-496X. E-mail: asom_giysov@mail.ru

Степанова Элеонора Федоровна – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002- 4082-3330. E-mail: efstapanova@yandex.ru

Веселова Ольга Федоровна – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии с курсом последипломного образования ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-6126-665X. E-mail: veselovaof@mail.ru

Стороженко Сергей Евгеньевич – старший преподаватель кафедры фармации с курсом последипломного образования ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8058-9147. E-mail: s.e.storozhenko@yandex.ru

Scientific and Practical Journal
PHARMACY & PHARMACOLOGY

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-331-342

УДК 615.074

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА «ВЫСУШЕННОЙ КАПЛИ КРОВИ» ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА

В.И. Петров[1,2], И.С. Аникеев[1,2], Т.Е. Заячникова[3], А.В. Стрыгин[1,2,4], А.М. Доценко[1,4]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1
[2] Центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400087, Россия, г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39
[3] Институт непрерывного медицинского и фармацевтического образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1
[4] Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский медицинский научный центр», 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

E-mail: Anikeev.iv@gmail.com

Получена 05.07.2022 После рецензирования 10.08.2022 Принята к печати 20.08.2022

Для контроля концентрации лекарственных препаратов, обладающих узким терапевтическим диапазоном, и проведения эффективных и безопасных методов лечения проводится терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ). Однако на сегодняшний день проведение ТЛМ связано с различными затруднениями, для решения которых разрабатываются более удобные и менее инвазивные методы сбора биологического материла.
Цель. Разработать протоколы взятия и хранения образцов «высушенной капли крови» (Dried Blood Spot, DBS), а также протоколы валидации методов количественного определения лекарственных препаратов в цельной крови с использованием данной технологии для последующего проведения терапевтического лекарственного мониторинга.
Материалы и методы. Для детального анализа метода «высушенной капли крови» и выявления характерных особенностей взятия и хранения биообразцов, был проведен сбор и анализ научной литературы за последние 10 лет. Поиск литературных материалов проводился с помощью открытых и доступных источников, размещенных в научных библиотеках учреждений, в электронных базах данных и поисковых системах: Elibrary, PubMed, Scopus, КиберЛенинка, Medline, ScienceDirect, Web of Science, Google Scholar. Подготовили первичные протоколы взятия, хранения и анализа образцов «высушенной капли крови». На стадиях отбора и хранения проводили апробацию и оптимизацию разработанных протоколов для получения образцов надлежащего качества. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови», оптимизировали протоколы валидации лекарственных препаратов для обеспечения достижения приемлемых валидационных характеристик и проведения последующего ТЛМ.
Результаты. Выявлены особенности сбора, хранения и анализа образцов «высушенной капли крови». Определены такие характеристики, как: эффект объёма капли, эффект гематокрита, однородность капли, которые могут оказывать влияние на результаты количественного ВЭЖХ-МС/МС анализа. Для успешного использования новой методики нами были разработаны надлежащие протоколы взятия образцов «высушенной капли крови» из пальца руки взрослых пациентов и из пятки новорожденных детей, а также протоколы валидации методов количественного определения лекарственных препаратов из данных образцов.
Заключение. Применение метода «высушенной капли крови» с использованием новых разработанных протоколов взятия, хранения и анализа биологических образцов снимает существующие ограничения при проведении ТЛМ, а также в последствии может стать перспективным методом для проведения доклинических и клинических исследований.

Для цитирования: В.И. Петров, И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова, А.В. Стрыгин, А.М. Доценко. Адаптация метода «высушенной капли крови» для проведения терапевтического лекарственного мониторинга. *Фармация и фармакология.* 2022;10(4):331-342. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-331-342

For citation: V.I. Petrov, I.S. Anikeev, T.E. Zayachnikova, A.V. Strygin, A.M. Dotsenko. Adaptation of “dried blood drop” method for therapeutic drug monitoring. *Pharmacy & Pharmacology.* 2022;10(4):331-342. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-331-342

Ключевые слова: метод «высушенной капли крови»; терапевтический лекарственный мониторинг; биоанализ; валидация метода; ВЭЖХ-МС/МС

Список сокращений: ЛП – лекарственный препарат; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией; ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг; DBS – «высушенная капля крови»; QCL – низкий показатель контроля качества; QCM – средний показатель контроля качества; QCH – высокий показатель контроля качества; КК – контроль качества; НПКО – нижний предел количественного определения.

ADAPTATION OF "DRIED BLOOD DROP" METHOD FOR THERAPEUTIC DRUG MONITORING

V.I. Petrov[1,2], I.S. Anikeev[1,2], T.E. Zayachnikova[3], A.V. Strygin[1,2,4], A.M. Dotsenko[1,4]

[1] Volgograd State Medical University,
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131
[2] Scientific Center of Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University,
39, Novorossiyskaya Str., Volgograd, Russia, 400087
[3] Institute for Continuing Medical and Pharmaceutical Education, Volgograd State Medical University,
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131
[4] Volgograd Medical Research Center,
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: Anikeev.iv@gmail.com

Received 05 July 2022 After peer review 10 Aug 2022 Accepted 20 Aug 2022

To control the concentration of drugs with a narrow therapeutic range, and to conduct effective and safe treatments, Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is carried out. However, to date, the implementation of TDM is associated with various difficulties, for the solution of which more convenient and less invasive methods for collecting biological material are being developed.

The aim of the study was to develop protocols for the collection and storage of "dried blood spot" (DBS) samples, as well as protocols for the validation methods for the quantitative determination of drugs in whole blood, using this technology for subsequent therapeutic drug monitoring.

Materials and methods. To analyze a "dried blood spot" method in detail and to identify the characteristic features of taking and storing biosamples, a collection and analysis of scientific literature over the past 10 years has been conducted. The search for literature materials has been carried out from open and accessible sources located in the scientific libraries of institutions, in electronic databases and search engines: Elibrary, PubMed, Scopus, Cyberleninka, Medline, ScienceDirect, Web of Science, Google Scholar. Primary protocols for taking, storing and analyzing samples of the "dried blood drop" have been prepared. To obtain the adequate quality samples, the developed protocols have been tested and optimized at the stages of selection and storage. By high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS), using a "dried blood drop" as a sample preparation, drug validation protocols have been optimized to ensure that acceptable validation characteristics were achieved, and subsequent Therapeutic Drug Monitoring was performed.

Results. The features of the collection, storage and analysis of the "dried blood spot" samples have been revealed. Such characteristics as a spot volume effect, a hematocrit effect, a droplet uniformity, which can affect the results of a quantitative HPLC-MS/MS analysis, have been determined. For a successful use of the new methods, appropriate protocols for taking samples of "dried blood spot" from the finger of adult patients and from the heel of newborns, as well as protocols for validating methods for the quantitative determination of drugs from these samples, have been developed.

Conclusion. The application of the "dried blood spot" method using newly developed protocols for taking, storing and analyzing biological samples, relieves the existing constraints in conducting TDM, and can later become a promising method for conducting preclinical and clinical studies.

Keywords: "dried blood spot" method; therapeutic drug monitoring; bioanalysis; method validation; HPLC-MS/MS

Abbreviations: MP/D – medicinal preparation/drug; HPLC-MS/MS – high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; TDM – Therapeutic Drug Monitoring; DBS – Dried Blood Spot; QCL – low quality control; QCM – mean quality control; QCH – high quality control; QC – quality control; LLQL – lower limit of quantitation level.

ВВЕДЕНИЕ

«Высушенная капля крови» (от англ. Dried Blood Spot, DBS) – это метод пробоподготовки, который является относительно простым методом сбора небольших объемов крови, с помощью которого можно пренебречь сбором плазмы и заморозкой образцов.

Метод «высушенной капли крови» представляет

DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-331-342

широкий спектр возможных применений, которые невыполнимы или затруднены в исполнении традиционными методами сбора биообразцов [1]. Одним из основных таких вариантов использования данной технологии является терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ).

На сегодняшний день для проведения ТЛМ и анализа лекарственных препаратов (ЛП) необходим сбор большого количества биологического материала, которым является плазма или сыворотка крови. Для получения данных биообразцов необходимо произвести отбор цельной крови, которую получают стандартными методами венепункции. Однако для многих групп пациентов стандартные методы отбора цельной крови вызывают значительные затруднения, что ограничивает проведение ТЛМ и корректировку режимов дозирования для ЛП с узким терапевтическим диапазоном [1, 2].

Новая технология сбора образов цельной крови, которым является менее инвазивный и простой способ DBS, позволяет преодолеть существенные ограничения, связанные со стандартными методами и провести ТЛМ в тех клинических ситуациях, в которых он был затруднён или в принципе невозможен [3].

Однако для количественного анализа ЛП в образцах DBS необходимо использование высокочувствительных и селективных аналитических технологий, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС). Использование такой современной аналитической системы позволит оптимизировать анализ биообразцов для проведения ТЛМ и расширить возможности применения DBS на различных стадиях разработки лекарственных средств и в рамках фармакокинетических исследований.

Однако, несмотря на большой потенциал и преимущества этой технологии, её широкое внедрение в рутинную практику ТЛМ станет возможно только после достоверного подтверждения точности и воспроизводимости получаемых аналитических данных о концентрации изучаемых препаратов, что требует дополнительной разработки и валидации биоаналитических методов, использующих метод DBS на этапе взятия биоматериала и его подготовки к исследованию.

ЦЕЛЬ. Разработать протоколы взятия и хранения образцов «высушенной капли крови», а также протоколы валидации методов количественного определения лекарственных препаратов в цельной крови с использованием данной технологии для последующего проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа метода DBS и выявления характерных для него особенностей взятия и хранения биообразцов, был проведен сбор и анализ научной литературы за последние 10 лет. Поиск литературных материалов проводился с помощью открытых и доступных источников, размещенных в научных библиотеках учреждений, в электронных базах данных и поисковых системах: Elibrary, PubMed, Scopus, КиберЛенинка, Medline, ScienceDirect, Web of Science, Google Scholar.

Параметрами для отбора литературы были выбраны следующие слова и словосочетания: «высушенная капля крови»; ВЭЖХ-МС; терапевтический лекарственный мониторинг; валидация; пробоподготовка; биоанализ. Также поиск проводился с помощью английских аналогов ключевых слов: Dried Blood Spot; HPLC-MS; therapeutic drug monitoring; validation; sample preparation; bioanalysis.

После анализа литературных данных разрабатывали первичные протоколы взятия, хранения и анализа образцов DBS на основе проведенного детального анализа и выявления специфических характеристик данной методики.

Далее методом ВЭЖХ-МС/МС, используя в качестве пробоподготовки DBS, проводили анализ образцов ивабрадина и оптимизировали протоколы валидации ЛП для достижения приемлемых валидационных характеристик и проведения последующего ТЛМ.

Основное оборудование: ВЭЖХ система Agilent 1260 (Agilent Technologies, Inc., США) с бинарным насосом и термостатируемым автосемплером. Хроматографическое разделение компонентов проводили на колонке Poroshell 120 C18 (4,6 × 50 мм × 2,7 мкм). Аналиты определяли с помощью гибридной масс-спектрометрической системы Sciex QTRAP 5500.

Мобильная фаза представляла собой смесь вода-ацетонитрил, модификатором мобильной фазы служила 0,1% муравьиная кислота, которую добавляли как в водную, так и в органическую мобильную фазы.

В ходе оптимизации условий хроматографического разделения был выбран градиентный режим элюирования. Соотношение мобильной фазы вода-ацетонитрил (70:30) не изменялось при скорости 0,6 мл/мин до 0,5 минуты, после чего происходило постепенное изменение до соотношения вода-ацетонитрил (0:100), которое было достигнуто на 2 мин. На 3 мин. соотношение было изменено на первоначальное, и, при этом, происходило уравновешивание системы до 5 мин. Модификатором мобильной фазы служила 0,1% муравьиная кислота, которую добавляли как в водную, так и в органическую составляющую мобильной фазы.

В данной методике для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества были использованы стандарты ивабрадина (Servier, Франция) и N-десметиливабрадина в качестве внутреннего стандарта (Toronto Research Chemical Inc., Канада).

Для каждой аналитической серии готовили свежие рабочие растворы стандартов. Конечная концентрация рабочих растворов ивабрадина составила: 10, 20, 100, 500, 1000, 5000, 8000, 10000 нг/мл.

Для получения калибровочного раствора 100 мкл цельной крови переносили в микропробирки на 1,5 мл и добавили 10 мкл рабочего раствора соответствующей концентрации. Концентрация калибровочных растворов составила 1, 2, 10, 50, 100, 500, 800, 1000 нг/мл.

Образцы контроля качества (КК) были приготовлены со следующими четырьмя уровнями концентрации: 1 мкг/мл (нижний предел количественного определения, НПКО), 3 мкг/мл (низкий КК, QCL), 400 мкг/мл (средний КК, QCM) и 750 мкг/мл (высокий КК, QCH).

Далее 20 мкл полученных рабочих растворов наносили на фильтровальную бумагу и давали сохнуть при комнатных условиях в течение 3 часов.

Для подготовки образцов DBS из карт был вырезан диск диаметром 6 мм специальным устройством для выреза маркированных кругов Uni-Core, который помещали в пробирку и экстрагирован экстракционным раствором. Экстракцию проводили с помощью шейкера в течение 20 мин при 25°C, затем образцы переносили в новые пробирки и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Статистическая обработка результатов

Обработка полученных данных проводилась с использованием программно-статистической среды R 3.6.1 в программе RStudio 1.2, а также специализированного программного обеспечения Sciex Analyst 1.6.2. Во время работы системы полученные данные обрабатывались в ПО Analyst в виде полных масс-спектров, интенсивности одиночных или множественных ионов в зависимости от времени или общего ионного тока. Для количественного определения использовался метод градуировочного графика с весовым коэффициентом $1/x^2$. В качестве параметра бралось соотношение площадей пика аналита и внутреннего стандарта [8, 10, 12, 23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общие положения о методе DBS

В отличие от стандартных методов сбора цельной крови, DBS подразумевает сбор минимального количества капиллярной крови из пальца рук взрослых или пяточки новорожденных детей и нанесении капли крови на отмеченную область фильтровальной бумаги. После данной процедуры капля крови сохнет на воздухе при комнатной температуре в течение не менее 4-х часов в сухом месте без попадания прямых солнечных лучей. Высушенные образцы транспортируются в лабораторию, в которой производят манипуляции, связанные с вырезом диска от 3 до 8 мм из фильтровальной карты специальным устройством. Этот диск в последствие экстрагируется органическим растворителем или смесью водного и органического растворителя. Далее полученные образцы количественно определяются с помощью различных биоаналитических технологий [4].

Таким образом, весь процесс сбора образцов DBS рассматривается как распределение капли крови по пористой поверхности с одновременным проникновением и растеканием внутри неё. Распределение и смачивание пор субстрата кровью является комплексным процессом, зависящим от физических и химических свойств (бумаги и крови), что необходимо дополнительно исследовать перед применением в широкой клинической практике [4].

Весь этот механизм метода DBS определяет ряд существенных преимуществ данной технологии перед стандартными способами сбора биоматериала, а также некоторые его ограничения.

Преимущества и недостатки технологии DBS

Одно из основных преимуществ данной технологии – отбор достаточно меньшего количества цельной крови, что позволяет преодолеть существующие ограничения ТЛМ для различных групп пациентов. Также метод DBS подразумевает процесс сушки образцов в стандартных лабораторных условиях и их транспортировку в аналитическую лабораторию без использования специального оборудования и с минимальным риском инфекционного заражения [3, 5].

Существует возможность проводить процедуру взятия биоматериала дома без привлечения специального персонала. Это позволит производить большее количество анализов с помощью метода DBS и построить более точную кривую зависимости «концентрация-время» для оптимизации режима дозирования ЛП с узким терапевтическим диапазоном.

Все вышеперечисленные преимущества могут иметь существенные экономические выгоды при сборе и анализе образцов DBS по сравнению со стандартными методами сбора биообразцов. Возможный отбор проб DBS на дому также приведет к существенным экономическим выгодам у пациентов, которым требуется провести ТЛМ [7].

Однако данный метод не лишён своих недостатков. Анализ образцов DBS подразумевает специальное высокочувствительное аналитическое оборудование и необходимость обучения медицинских работников для получения образцов надлежащего качества [8, 9]. Также стоит принять во внимание, что используемые в настоящее время требования к валидации биоаналитических методик, которые описаны в руководствах для традиционных матриц, не обеспечивают всех необходимых аспектов разработки метода, аналитической и клинической валидации для образцов DBS и применения их в рамках ТЛМ. Такие специфические параметры, характерные для новой технологии, как: влияние гематокрита, которое может привести к различной вязкости крови и распределению капли на бумаге; гомогенность капли и её размер могут повлиять на получаемый результат и в свою очередь требуют дополнительной валидации [10, 11].

Все эти недостатки создают необходимость разработки новых протоколов взятия и хранения образцов крови, а также дополнительной валидации, которые были бы характерны для метода DBS и использования его в ТЛМ.

Анализ существующих литературных источников

За последние 10 лет было опубликовано большое количество статей, описывающих разработку, валидацию нового метода DBS, а также возможностm применения его в рамках проведения ТЛМ различных классов препаратов, таких как: анальгетики, антибиотики, противоэпилептические, антидепрессанты, противомалярийные, противогрибковые, антиретровирусные, мочегонные, иммунодепрессанты и др. [12].

Нами был произведен анализ существующих способов количественного определения ЛП с помощью ВЭЖХ-МС/МС в образцах «высушенной капли крови» (табл. 1). В выбранных работах учитывались дополнительные валидационные характеристики, присущие только для нового способа сбора биообразцов, оказывающих значительное влияние на результаты анализа: размер капли, природа материала, карта для образцов DBS, условия экстракции и уровень гематокрита [9, 10, 13, 15, 16, 18–20, 25–29].

Такие параметры, как эффект гематокрита, эффект объёма капли и однородность пятна могут оказывать существенное влияние на результат анализа ЛП в образцах DBS и могут варьироваться от образца к образцу. Именно эти характеристики и были определены как дополнительные параметры, требующие разработки новых протоколов валидации количественного ВЭЖХ-МС/МС анализа лекарственных препаратов, а также подготовки практических рекомендаций для медицинских работников по сбору и хранению данных образцов цельной крови для получения приемлемых аналитических результатов [8, 9, 17, 39].

Разработка протоколов отбора, хранения образцов и валидации DBS

На основании литературного анализа и существующих методик сбора капель цельной крови на специальную бумагу, нами были разработаны и оптимизированы протоколы взятия образцов DBS из пальца руки для взрослых пациентов и из пятки для новорожденных детей [40–42]. Разработанные протоколы представлены ниже.

Протокол взятия и хранения образцов DBS из пятки новорожденных детей:

1. Оформить информированное добровольное согласие законного представителя;
2. Подписать капли с идентификатором пациента и датой;
3. Выбрать место проведения пункции на боковой стороне пятки;
4. Разогреть стопу с помощью теплой пеленки;
5. Обработать руки и надеть стерильные перчатки;
6. Расположить пятку ниже туловища ребенка и удерживать ее без резкого сгибания лодыжки;
7. Обработать место проведения пункции с помощью антисептического раствора и дать ему высохнуть;
8. Быстро проколоть кожу латерально, в месте, как показано на картинке (Рис. 1), с помощью ланцета и стереть стерильным ватным шариком первую каплю крови.
9. Удерживать место пункции внизу, осторожно надавливая на прилегающую область и произвести взятие крови на бланк на фильтровальную бумагу;
10. Держать карту, не касаясь отмеченной области (Рис. 2);
11. Осторожно прикоснувшись карточкой фильтровальной бумаги к капле крови, нанести её на карту. Дать карточке впитать кровь, пока круг не заполнится. После нанесения не прикасаться к отмеченной области;
12. Дать пятну крови высохнуть в темном месте. Исключить попадание прямых солнечных лучей в течение не менее 4-х часов. Не нагревать и не допускать контакта образцов высушенной капли с другими поверхностями во время процесса сушки;
13. Запечатать карту (или части карты) в газонепроницаемом пакете с застежкой-молнией. Хранить не более одной карты в упаковке в холодильнике до отправки в лабораторию при 2–8°C.

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Рисунок 1 – Место прокола пятки новорожденных

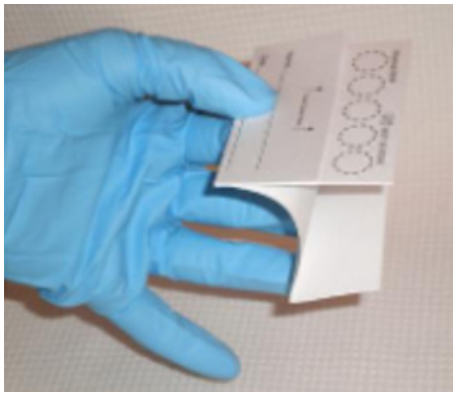


Рисунок 2 – Пример карты для DBS

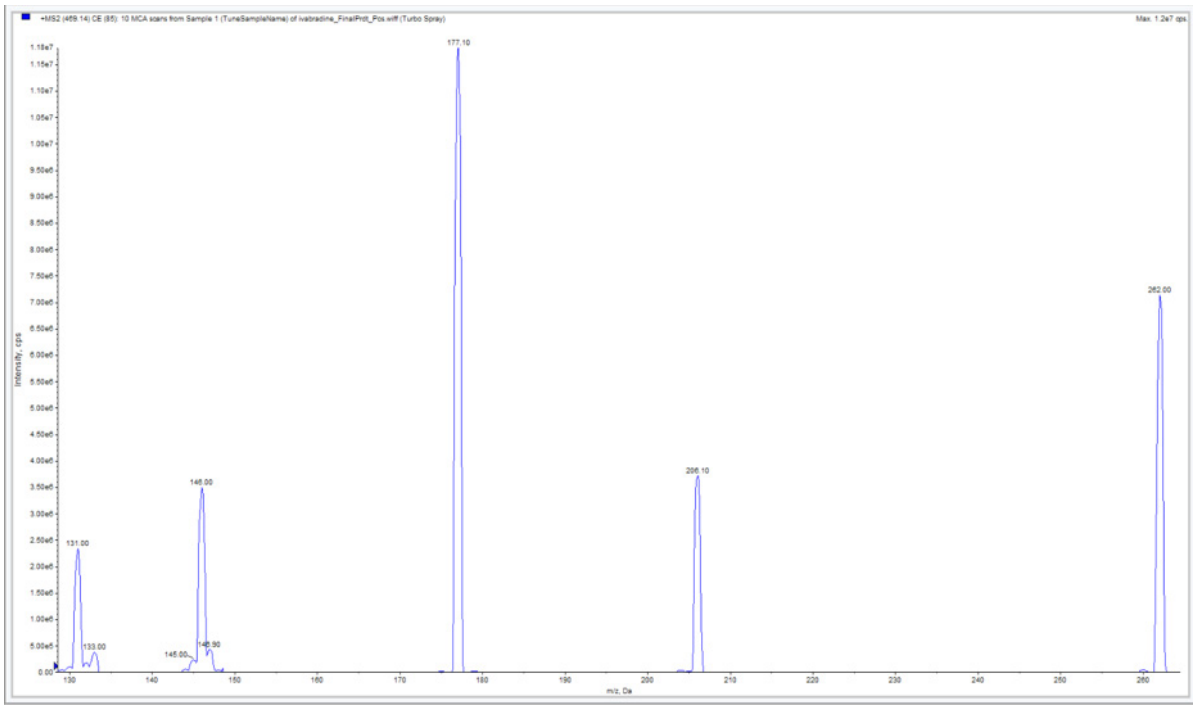


Рисунок 3 – Масс-спектр ивабрадина в плазме крови

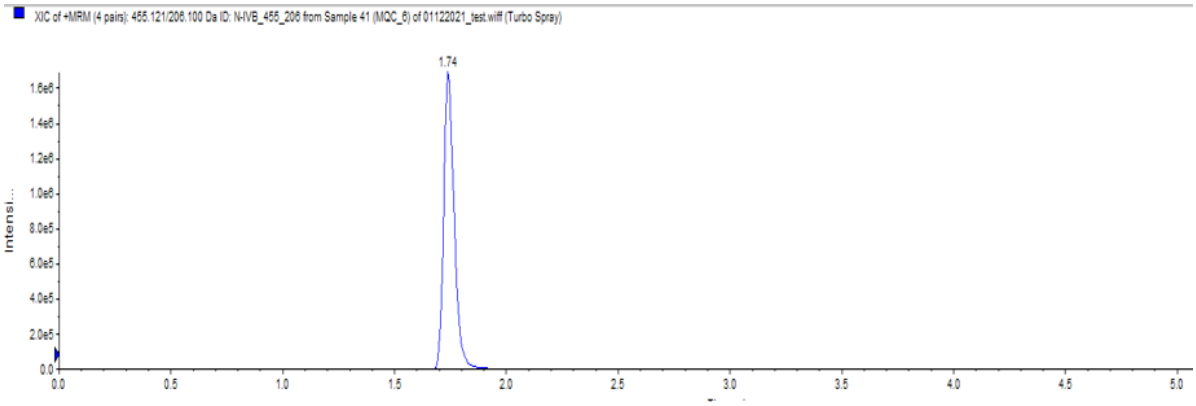


Рисунок 4 – Хромато-масс-спектрограмма ивабрадина в плазме крови
Примечание: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

Таблица 1 – Дополнительные валидационные параметры для анализа лекарственных препаратов с помощью ВЭЖХ-МС/МС

ЛП	Класс ЛП	Дополнительная DBS валидация	Ссылки
Флуконазол	Противогрибковые	Эффект объёма капли	[32, 33]
Микофеноловая кислота	Противоопухолевое	–	[15, 19, 20]
Метотрексат	Противоопухолевый	Эффект гематокрита	[18]
Вориконазол	Противогрибковые	Эффект объёма капли	[14, 15]
Моксифлоксацин	Антибиотик	Эффект объёма капли, тип бумаги	[14, 21]
Пипирециллин	Антибиотик	–	[18, 20]
Сиролимус	Иммунодепрессант	Гомогенность, эффект гематокрита, эффект объёма капли	[22–26]
Эверолимус	Иммунодепрессант	Гомогенность, эффект гематокрита, объёма капли	[24-26, 28, 37, 38]
Тазобактам	Антибиотик	–	[16, 31]
Ванкомицин	Антибиотик	Гомогенность, эффект гематокрита, эффект объёма капли	[16, 17]
Такролимус	Иммунодепрессант	Гомогенность, эффект гематокрита, эффект объёма капли	[22–30]
Циклоспорин А	Иммунодепрессант	Гомогенность, эффект гематокрита, эффект объёма капли	[26, 30, 34-36, 43]

Таблица 2 – Стандартные параметры валидации

Валидационный параметр	Проводимые испытания	Критерии приемлемости [8, 10]
Линейность	8 калибровочных образцов + холостая проба + нулевая проба	≤ 15% от номинальных значений (≤ 20% для НПКО), не менее чем для 75% образцов
Селективность	6 холостых образцов и 6 НПКО	≤ 20% от НПКО
Правильность	5 образцов КК на 4-х концентрационных уровнях	≤ 15% (≤ 20% для НПКО)
Прецизионность	5 образцов КК на 4-х концентрационных уровнях	≤ 15% (≤ 20% для НПКО)
Матричный эффект	5 образцов КК на 2-х концентрационных уровнях при 3-х разных значениях гематокрита	≤ 15%
Стабильность	5 образцов КК на 2-х уровнях концентрации при комнатной температуре в трех временных точках через 2 часа после нанесения капли, через 7 и 14 дней.	≤ 15%

Примечание: КК – образцы контроля качества; НПКО – нижний предел количественного определения.

Таблица 3 – Специфические параметры валидации

Валидационный параметр	Проводимые испытания	Критерии приемлемости [8, 10]
Эффект объёма капли	5 образцов КК на 3-х значениях объёма капли (10, 40, 70 мкл) при 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), на 2-х уровнях концентрации	≤ 15% от номинальных значений
Эффект гематокрита	5 образцов КК для 3-х уровней гематокрита, при 2 концентрационных уровнях	≤ 15% от номинальных значений
Однородность капли	Сравниваются 5 образцов КК на 2-х уровнях концентраций образцов КК при 3-х уровнях гематокрита, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и у края.	≤ 15% от номинальных значений

Примечание: КК – образцы контроля качества.

Таблица 4 – Валидационные параметры методики пробоподготовки «высушенной капли крови»

Параметр		Значение			
		НПКО (1 нг/мл)	QCL (3 нг/мл)	QCM (400 нг/мл)	QCH (750 нг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	9,4	8,0	7,5	11,4
	Между циклами	12,5	10,1	9,2	5,8
Правильность (%)	Внутри цикла	112,3	110,7	106,1	107,2
	Между циклами	91,2	100,7	95,9	96,3
Стабильность (%)		–	88,3	–	91,2
Селективность (%)		10,4	–	–	–
Коэффициент корреляции		0,99			

Таблица 5 – Влияние гематокрита на результаты анализа

Гематокрит %	КК	Номинальная концентрация (нг/мл)	Точность (%)
0,3	QCL	3	113,7
	QCH	750	109,6
0,4	QCL	3	99,4
	QCH	750	105,1
0,5	QCL	3	95,5
	QCH	750	94,7

Протокол взятия и хранения образцов DBS из пальца руки:

1. Оформить информированное добровольное согласие законного представителя;
2. Подписать капли с идентификатором пациента и датой;
3. Выбрать место проведения пункции на указательном пальце;
4. Флеботамисту необходимо обработать руки и надеть стерильные перчатки;
5. Обработать место проведения пункции с помощью антисептического раствора и дать ему высохнуть;
6. Быстро проколоть кожу с помощью ланцета и стереть стерильным ватным шариком первую каплю крови;
7. Удерживать место пункции внизу, осторожно надавливая на прилегающую область и произвести взятие крови на бланк фильтровальной бумаги;
8. Держать карту, не касаясь отмеченной области;
9. Осторожно прикоснувшись карточкой фильтровальной бумаги к капле крови, нанести её на карту. Дать карточке впитать кровь, пока круг не заполнится. После нанесения не прикасаться к отмеченной области;
10. Дать пятну крови высохнуть в темном месте. Исключить попадание прямых солнечных лучей в течение не менее 4-х часов. Не нагревать и не допускать контакта образцов высушенной капли с другими поверхностями во время процесса сушки;
11. Запечатать карту (или части карты) в газонепроницаемом пакете с застежкой-молнией. Хранить не более одной карты в упаковке в холодильнике до отправки в лабораторию при 2–8°C. При этом, все полученные образцы на фильтровальной бумаге должны быть равномерно распределены на отмеченной области и капли не должны сливаться друг с другом. В случае получения неполного распределения крови в отмеченной области или слияния двух капель, такие образцы считают неприемлемыми и не используются для дальнейшего анализа.

Протоколы валидации количественных ВЭЖХ-МС/МС методов анализа

На сегодняшний день такие организации, как International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology и Food and Drug Administration (FDA) работают над созданием общих руководств по валидации технологии DBS, описывая не только валидационные параметры, характерные для стандартных способов пробоподготовки и традиционных матриц, но и специфические параметры, присущие только для этой новой технологии [10, 11, 45–48, 50].

Из анализа существующих методик количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ЛП с использованием данного метода пробоподготовки, нами были разработаны новые протоколы валидации с использованием стандартных (табл. 2) и специфических параметров валидации метода DBS (табл. 3).

При разработке методики количественного определения ивабрадина в образцах DBS были найдены ионы-«предшественники» ивабрадина, которые соответствовали частицам с m/z 469. Для построения метода мониторинга множественных реакций (MRM) использовались ионные переходы,

соответствующие наибольшей интенсивности ионов-«продуктов». Было установлено, что в ходе диссоциации в камере соударений наиболее интенсивны ионы-«продукты» составили: m/z 262,2 и 177,1 m/z (Рис. 3).

При хроматографическом определении в оптимизированных условиях время удерживания ивабрадина в плазме крови составило – 1,74 мин (Рис. 4).

Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 1000 нг/мл при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом >0,99. Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутридневной точности не превышал 15% для основного диапазона концентраций.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация ивабрадина в образцах DBS в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение ивабрадина со значениями относительного стандартного отклонения не более 20%. Нижний предел количественного определения методики составил 1 нг/мл (табл. 4).

Также для метода «высушенной капли крови» было оценено влияние специфических параметров нового метода на результаты анализа.

Влияние гематокрита оценивали на 3-х уровнях (0,3; 0,4; 0,5), для QCL и QCH при этом полученные концентрации находились в диапазоне от 95,5 до 107,1% от номинальных (табл. 5).

Для валидации эффекта объёма провели анализ 3-х объёмов (10, 40, 70 мкл) (30, 40 и 55 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 сериях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала – 15% от полученных значений при среднем объёме.

При валидации однородности капли сравнили результаты образцов КК при QCL и QCH, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и с края. Анализ проводился в 5 сериях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15% от номинальных.

Для оценки стабильность использовали образцы DBS на уровнях QCL и QCH при этом образцы проанализированы в трех временных точках 1, 7 и 14 дней вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. При этом полученные значения после 14 дней хранения находились в диапазоне от 87,2–93,8%.

Термическая стабильность была оценена при хранении образцов DBS в течение 14 дней при температуре 22°C и 45°C, как потенциально возможные температуры при хранении и транспортировке образцов.

Разработанные протоколы оказались пригодными для проведения валидации метода количественного определения ивабрадина и является приемлемыми для дальнейшего использования в исследовательских работах и проведения ТЛМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что метод «высушенной капли крови» является новейшим методом отбора биологических образцов, обладающий рядом существенных преимуществ перед стандартными методами.

При использовании оптимизированной пробоподготовки и разработанные нами новые протоколы взятия, хранения, валидации и методы количественного анализа образцов DBS технология имеет широкое применение в доклинических и клинических исследованиях, терапевтическом и токсикологическом мониторинге лекарственных средств, а также в крупных эпидемиологических исследованиях. При этом данная технология может представлять более экономически-эффективную модель анализа лекарственных средств, а также обеспечить столь необходимые фармакокинетические результаты достаточно эффективным и надежным способом.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова, А.М. Доценко – концепция исследования, планирование статьи, обзор литературных источников, сбор материалов, написание и редактирование статьи;
В.И. Петров, А.В. Стрыгин – разработка дизайна исследования, редактирование и окончательное утверждение статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абаимов Д.А., Сариев А.К., Носкова Т.Ю., Шведков В.В., Ширяева М.В., Стырова Е.Ю., Прохоров Д.И., Сейфулла Р.Д. Современные технологии в терапевтическом лекарственном мониторинге // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2013. – Т. 5, № 2. – С. 31–41.
2. Déglon J., Thomas A., Mangin P., Staub C. Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications // Anal. Bioanal. Chem. – 2012. – Vol. 402, No. 8. – P. 2485–2498. DOI: 10.1007/s00216-011-5161-6
3. Demirev P.A. Dried blood spots: analysis and applications // Anal. Chem. – 2013. – Vol. 85, No. 2. – P. 779–789. DOI: 10.1021/ac303205m
4. Edelbroek P.M., van der Heijden J., Stolk L.M. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls // Ther. Drug. Monit. – 2009. – Vol. 31, No. 3. – P. 327–336. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31819e91ce.
5. Antunes M.V., Charão M.F., Linden R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring // Clin. Biochem. – 2016. – Vol. 49, No. 13–14. – P. 1035–1046. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.05.004
6. Amsterdam P.V., Waldrop C. The application of dried blood spot sampling in global clinical trials // Bioanalysis. – 2010. – Vol. 2, No. 11. – P. 1783–1786. DOI: 10.4155/bio.10.158
7. Jimmerson L.C., Zheng J.H., Bushman L.R., MacBrayne C.E., Anderson P.L., Kiser J.J. Development and validation of a dried blood spot assay for the quantification of ribavirin using liquid chromatography coupled to mass spectrometry // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2014. – Vol. 944. – P. 18–24. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.10.035
8. Timmerman P., White S., Globig S., Lüdtke S., Brunet L., Smeraglia J. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots // Bioanalysis. – 2011. – Vol. 3, No. 14. – P. 1567–1575. DOI: 10.4155/bio.11.132
9. Jager N.G., Rosing H., Schellens J.H., Beijnen J.H. Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: a review // Bioanalysis. – 2014. – Vol. 6, No. 18. – P. 2481–2514. DOI: 10.4155/bio.14.185
10. Capiau S., Veenhof H., Koster R.A., Bergqvist Y., Boettcher M., Halmingh O., Keevil B.G., Koch B.C.P., Linden R., Pistos C., Stolk L.M., Touw D.J., Stove C.P., Alffenaar J.C. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring // Ther. Drug. Monit. – 2019. – Vol. 41, No. 4. – P. 409–430. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000643
11. Martial L.C., Aarnoutse R.E., Schreuder M.F., Henriet S.S., Brüggemann R.J., Joore M.A. Cost Evaluation of Dried Blood Spot Home Sampling as Compared to Conventional Sampling for Therapeutic Drug Monitoring in Children // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, No. 12. – e0167433. DOI: 10.1371/journal.pone.0167433
12. Barfield M. The Application of Dried Blood Spots in Toxicokinetic and Pharmacokinetic Studies. Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements of the University of Lincoln, 2017. – 188 p.
13. Vu D.H., Koster R.A., Alffenaar J.W., Brouwers J.R., Uges D.R. Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC-MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2011. – Vol. 879, No. 15–16. – P. 1063–1070. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.03.017
14. Arpini J., Antunes M.V., Pacheco L.S., Gnatta D., Rodrigues M.F., Keitel E., Linden R. Clinical evaluation of a dried blood spot method for determination of mycophenolic acid in renal transplant patients // Clin. Biochem. – 2013. – Vol. 46, No. 18. – P. 1905–1908. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.10.011.
15. Barco S., Risso F.M., Bruschettini M., Bandettini R., Ramenghi L.A., Tripodi G., Castagnola E., Cangemi G. A validated LC-MS/MS method for the quantification of piperacillin/tazobactam on dried blood spot // Bioanalysis. – 2014. – Vol. 6, No. 21. – P. 2795–2802. DOI: 10.4155/bio.14.205.
16. Al-Ghazawi M., Khaled Daoud Noor E.H., Hadidi K., Alzweiri M., Aburuz S. Determination of vancomycin content in dried blood spots for therapeutic drug monitoring // Acta Poloniae Pharmaceutica. – 2021. – Vol. 78, No. 1. P. 3–10. DOI:10.32383/appdr/132021
17. Hawwa A.F., Albawab A., Rooney M., Wedderburn L.R., Beresford M.W., McElnay J.C. A novel dried blood spot-LCMS method for the quantification of methotrexate polyglutamates as a potential marker for methotrexate use in children // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, No. 2. – e89908. DOI: 10.1371/journal.pone.0089908
18. Wilhelm A.J., den Burger J.C., Chahbouni A., Vos R.M., Sinjewel A. Analysis of mycophenolic acid in dried blood spots using reversed phase high performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2009. – Vol. 877, No. 30. – P. 3916–3919. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.09.037
19. Heinig K., Bucheli F., Hartenbach R., Gajate-Perez A. Determination of mycophenolic acid and its phenyl glucuronide in human plasma, ultrafiltrate, blood, DBS and dried plasma spots // Bioanalysis. – 2010. – Vol. 2, No. 8. – P. 1423–1435. DOI: 10.4155/bio.10.99
20. Scribel L., Zavascki A.P., Matos D., Silveira F., Peralta T., Gonçalves Landgraf N., Lamb Wink P., Cezimbra da Silva A.C., Bordin Andriguetti N., Loss Lisboa L., Venzon Antunes M., Linden R. Vancomycin and creatinine determination in dried blood spots: Analytical validation and clinical assessment // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2020. – Vol. 1137. – Art. ID: 121897. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121897.
21. Koster R.A., Alffenaar J.W., Greijdanus B., Uges D.R. Fast LC-MS/MS analysis of tacrolimus, sirolimus, everolimus and cyclosporin A in dried blood spots and the influence of the hematocrit and immunosuppressant concentration on recovery // Talanta. – 2013. – Vol. 115. – P. 47–54. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.04.027
22. Sadilkova K., Busby B., Dickerson J.A., Rutledge J.C., Jack R.M. Clinical validation and implementation of a multiplexed immunosuppressant assay in dried blood spots by LC-MS/MS // Clin. Chim. Acta. – 2013. – Vol. 421. – P. 152–156. DOI: 10.1016/j.cca.2013.02.009
23. Li Q., Cao D., Huang Y., Xu H., Yu C., Li Z. Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method for determination of tacrolimus on dried blood spots // Biomed. Chromatogr. – 2013. – Vol. 27, No. 3. – P. 327–334. DOI: 10.1002/bmc.2795
24. Egas A.C., Van Maarseveen E.M., Kwakkel-Van Erp J.M. Rapid and combined measurement of cyclosporin a, tacrolimus, sirolimus and everolimus in whole blood and dried blood spot with LC-MSMS // J. Heart. Lung. Transplant. – 2014. – Vol. 33 (Issue 4). – S68. DOI: 10.1016/j.healun.2014.01.217

25. Koop D.R., Bleyle L.A., Munar M., Cherala G., Al-Uzri A. Analysis of tacrolimus and creatinine from a single dried blood spot using liquid chromatography tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2013. – Vol. 926. – P. 54–61. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.02.035
26. Shokati T., Bodenberger N., Gadpaille H., Schniedewind B., Vinks A.A., Jiang W., Alloway R.R., Christians U. Quantification of the Immunosuppressant Tacrolimus on Dried Blood Spots Using LC-MS/MS // J. Vis. Exp. – 2015. – No. 105. – e52424. DOI: 10.3791/52424
27. Zwart T.C., Gokoel S.R.M., van der Boog P.J.M., de Fijter J.W., Kweekel D.M., Swen J.J., Guchelaar H.J., Moes D.J.A.R. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus and mycophenolic acid in outpatient renal transplant recipients using a volumetric dried blood spot sampling device // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2018. – Vol. 84, No. 12. – P. 2889–2902. DOI: 10.1111/bcp.13755
28. Hinchliffe E., Adaway J., Fildes J., Rowan A., Keevil B.G. Therapeutic drug monitoring of ciclosporin A and tacrolimus in heart lung transplant patients using dried blood spots // Ann. Clin. Biochem. – 2014. – Vol. 51(Pt 1). – P. 106–109. DOI: 10.1177/0004563213488759
29. Cohen-Wolkowiez M., Watt K.M., Zhou C., Bloom B.T., Poindexter B., Castro L., Gao J., Capparelli E.V., Benjamin D.K. Jr., Smith P.B. Developmental pharmacokinetics of piperacillin and tazobactam using plasma and dried blood spots from infants // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2014. – Vol. 58, No. 5. – P. 2856–2865. DOI: 10.1128/AAC.02139-13
30. van der Elst K.C., Span L.F., van Hateren K., Vermeulen K.M., van der Werf T.S., Greijdanus B., Kosterink J.G., Uges D.R., Alffenaar J.W. Dried blood spot analysis suitable for therapeutic drug monitoring of voriconazole, fluconazole, and Posaconazole // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2013. – Vol. 57, No. 10. – P. 4999–5004. DOI: 10.1128/AAC.00707-13
31. Wilhelm A.J., den Burger J.C., Vos R.M., Chahbouni A., Sinjewel A. Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2009. – Vol. 877, No. 14–15. – P. 1595–1598. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.03.024
32. Wilhelm A.J., Klijn A., den Burger J.C., Visser O.J., Veldkamp A.I., Janssen J.J., Swart E.L. Clinical validation of dried blood spot sampling in therapeutic drug monitoring of ciclosporin A in allogeneic stem cell transplant recipients: direct comparison between capillary and venous sampling // Ther. Drug. Monit. – 2013. – Vol. 35, No. 1. – P. 92–95. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31827d76ce
33. Hinchliffe E., Adaway J.E., Keevil B.G. Simultaneous measurement of cyclosporin A and tacrolimus from dried blood spots by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2012. – Vol. 883–884. – P. 102–107. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.05.016
34. Antunes M.V., Charão M.F., Linden R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring // Clin. Biochem. – 2016. – Vol. 49, No. 13–14. – P. 1035–1046. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.05.004
35. Hoffman J.T., Rossi S.S., Espina-Quinto R., Letendre S., Capparelli E.V. Determination of efavirenz in human dried blood spots by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection // Ther. Drug. Monit. – 2013. – Vol. 35, No. 2. – P. 203–208. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31827fb72b
36. Li W., Lee M.S. Dried Blood Spots: Applications and Techniques. Wiley. – 2014. – 376 p.
37. Chermont A.G., Falcão L.F., de Souza Silva E.H., de Cássia Xavier Balda R., Guinsburg R. Skin-to-skin contact and/or oral 25% dextrose for procedural pain relief for term newborn infants // Pediatrics. – 2009. – Vol. 124, No. 6. – P. 1101–1107. DOI: 10.1542/peds.2009-0993
38. Hummel P., Puchalski M., Creech S.D., Weiss M.G. Clinical reliability and validity of the N-PASS: neonatal pain, agitation and sedation scale with prolonged pain // J. Perinatol. – 2008. – Vol. 28, No. 1. – P. 55–60. DOI: 10.1038/sj.jp.7211861
39. Киреев С.С. Боль и стресс у новорожденных (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. – 2016 – Т. 23, № 4. – С. 328–342. DOI: 10.12737/issn.1609-2163
40. Streit F., William Armstrong V., Oellerich M. Rapid Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Routine Method for Simultaneous Determination of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus, and Cyclosporin A in Whole Blood // Clinical Chemistry. – 2002. – Vol. 48 (Issue 6). – P. 955–958. DOI: 10.1093/clinchem/48.6.955
41. Tsao J.C., Evans S., Meldrum M., Altman T., Zeltzer L.K. A Review of CAM for Procedural Pain in Infancy: Part I. Sucrose and Non-nutritive Sucking // Evid. Based. Complement. Alternat. Med. – 2008. – Vol. 5, No. 4. – P. 371–381. DOI: 10.1093/ecam/nem084
42. Freeman J.D., Rosman L.M., Ratcliff J.D., Strickland P.T., Graham D.R., Silbergeld E.K. State of the Science in Dried Blood Spots // Clin. Chem. – 2018. – Vol. 64, No. 4. – P. 656–679. DOI: 10.1373/clinchem.2017.275966
43. Zakaria R., Allen K.J., Koplin J.J., Roche P., Greaves R.F. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process // EJIFCC. – 2016. – Vol. 27, No. 4. – P. 288–317.
44. Linder C. Possibilities of Dried Blood Spots As a Matrix in Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Children. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. 2019. – 61 p.
45. Murphy S.C., Daza G., Chang M., Coombs R. Laser cutting eliminates nucleic acid cross-contamination in dried-blood-spot processing // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50, No. 12. – P. 4128–4130. DOI: 10.1128/JCM.02549-12
46. Li Y., Henion J., Abbott R., Wang P. Dried blood spots as a sampling technique for the quantitative determination of guanfacine in clinical studies // Bioanalysis. – 2011. – Vol. 3, No. 22. – P. 2501–2514. DOI: 10.4155/bio.11.262
47. Klak A., Pauwels S., Vermeersch P. Preanalytical considerations in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants with dried blood spots // Diagnosis (Berl). – 2019. – Vol. 6, No. 1. – P. 57–68. DOI: 10.1515/dx-2018-0034
48. Knapen L.M., Beera Y., Brüggemannc R.M., Stolkab L.M., Vries F., Vivianne C.G., et al. Development and validation of an analytical method using UPLC–MS/MS to quantify everolimus in dried blood spots in the oncology setting // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – Vol. 149. – P. 106–113. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.10.039
49. Börsch-Supan A., Börsch-Supan M., Weiss L.M. Dried blood spot samples and their validation // Health and socio-economic status over the life course. – 2019. – P. 349–358. DOI: 10.1515/9783110617245-036

АВТОРЫ

Петров Владимир Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; директор НЦИЛС ВолгГМУ, главный внештатный специалист – клинический фармаколог Министерства здравоохранения РФ, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный врач РФ. ORCID ID: 0000-0002-0258-4092. E-mail: brain@sprintnet.ru

Аникеев Иван Сергеевич – аспирант кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заведующий лабораторией фармакокинетики НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9384-4338. E-mail: anikeivan@yandex.ru

Заячникова Татьяна Евгеньевна – кандидат медицинских наук, доцент, профессор кафедры педиатрии и неонатологии Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6758-4686. E-mail: guz5deti@mail.ru

Стрыгин Андрей Валерьевич – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заместитель директора НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заведующий лабораторией геномных и протеомных исследований ГБУ ВМНЦ. ORCID ID: 0000-0002-6997-1601. E-mail: drumsav@mail.ru

Доценко Анна Михайловна – ассистент кафедры фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; младший научный сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований ГБУ ВМНЦ. ORCID ID: 0000-0003-3324-3351. E-mail: ev8278@mail.ru

Scientific and Practical Journal
PHARMACY & PHARMACOLOGY

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-343-353

УДК 547.814.5:582.71:.651.224(470.638)

ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ПОЛИФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ ЛИСТЬЕВ ГЕМИПАРАЗИТА *VISCUM ALBUM* L.

С.Л. Аджиахметова, Д.И. Поздняков, Н.М. Червонная, Е.О. Куличенко, Э.Т. Оганесян

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-т Калинина, д. 11

E-mail: similla503@mail.ru

Получена 20.12.2021 После рецензирования 12.06.2022 Принята к печати 01.07.2022

Антиоксидантные средства находят широкое применение в практической медицине. Актуальным является не только поиск новых растительных антиоксидантов, но и изучение факторов, влияющих на их накопление в растениях.

Цель. Изучение взаимосвязи активности митохондриальных ферментов и антиоксидантной активности вторичных метаболитов полифенольной природы листьев гемипаразита *Viscum album* L.

Материалы и методы. В качестве исследуемого материала выступали листья омелы белой, собранные зимой с дерева-носителя – яблони обыкновенной. Экстракцию биологически активных веществ проводили спиртом этиловым различной концентрации (90%, 70% и 50%) или водой очищенной. Количество суммы антиоксидантов оценивали амперометрическим методом. Количество суммы фенолов оценивали в реакции с реактивом Фолина-Чокальтеу. Концентрацию суммы флавоноидов оценивали по изменению оптической плотности комплекса рутина с алюминия (III) хлоридом. Антиоксидантные свойства анализируемых извлечений определяли *in vitro* в тесте индуцированного перекисного окисления липидов. Активность аконитазы оценивали путем сопряженной аконитаза – изоцитратдегидрогеназной реакции; цитратсинтазы – по изменению интенсивности окраски раствора реактива Эллмана; сукцинатдегидрогеназы определяли в реакции сукцинат-зависимого окисления 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Результаты. Проведенное исследование показало, что максимальное количество суммы фенолов (2,39±0,05%), наблюдается в 50% этанольном извлечении из листьев омелы белой, при содержании суммы флавоноидов 1,83±0,04% и антиоксидантов 0,503±0,007 мг/г (эквивалент кверцетина) и 0,322±0,006 мг/г (эквивалент галловой кислоты). 50% этанольное извлечение подавляло перекисное окисление липидов в модельной смеси с IC_{50}=106,3±1,09 мкг/мл. В листьях омелы белой отмечена высокая активность аконитазы, сильно коррелировавшая (r=0,88416) с изменением концентрации флавоноидов.

Заключение. Оптимальным экстрагентом для получения извлечений с высокой антиоксидантной активностью является спирт этиловый 50%. Анализ активности митохондриальных ферментов показал, что в листьях омелы белой, собранных зимой, отмечена высокая активность аконитазы, сильно коррелировавшая с изменением концентрации флавоноидов (r=0,88416).

Ключевые слова: антиоксиданты; флавоноиды; аконитаза; сукцинатдегидрогеназа; цитратсинтаза; *Viscum album* L.; корреляционный анализ; растения гемипаразиты; митохондриальные ферменты

Список сокращений: ПОЛ – перекисное окисление липидов; ДМСО – диметилсульфоксид; ТБК – тиобарбитуровая кислота; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия; НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный; НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид фосфат; ФАЛ – фенилаланин-аммиак лиаза; ЕД – единицы действия; АФК – активные формы кислорода.

Для цитирования: С.Л. Аджиахметова, Д.И. Поздняков, Н.М. Червонная, Е.О. Куличенко, Э.Т. Оганесян. Взаимосвязь активности митохондриальных ферментов и антиоксидантной активности вторичных метаболитов полифенольной природы листьев гемипаразита *Viscum album* L. *Фармация и фармакология.* 2022;10(4):343-353. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-343-353

For citation: S.L. Adjiakhmetova, D.I. Pozdnyakov, N.M. Chervonnaya, E.O. Kulichenko, E.T. Oganesyan. Interrelation between mitochondrial enzyme activity and antioxidant activity of secondary polyphenol nature metabolites in hemiparasite *Viscum album* L. leaves. *Pharmacy & Pharmacology.* 2022;10(4):343-353. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-343-353

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

INTERRELATION BETWEEN MITOCHONDRIAL ENZYME ACTIVITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SECONDARY POLYPHENOL NATURE METABOLITES IN HEMIPARASITE *VISCUM ALBUM* L. LEAVES

S.L. Adjiakhmetova, D.I. Pozdnyakov, N.M. Chervonnaya, E.O. Kulichenko, E.T. Oganesyan

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

E-mail: similla503@mail.ru

Received 20 Dec 2021 After peer review 12 June 2022 Accepted 01 July 2022

Antioxidants are widely used in practical medicine. Not only the search for new plant antioxidants, but also the study of the factors affecting their accumulation in plants, are relevant.

The aim is to study the interrelation between the activity of mitochondrial enzymes and the antioxidant activity of the secondary polyphenolic nature metabolites in hemiparasite *Viscum Album* L. leaves.

Materials and methods. The sampling material was *Viscum album* L. leaves, collected in winter from a host tree, *Malus domestica* Borkh. The extraction of biologically active substances was carried out with ethyl alcohol of various concentrations (90%, 70% and 50%), or purified water. The amount of total antioxidants was estimated by the amperometric method. The amount of total phenols was evaluated in the reaction with the Folin-Ciocalteu reagent. The concentration of total flavonoids was estimated by the change in the optical density of the rutin with aluminum (III) chloride complex. The antioxidant properties of the analyzed extracts were determined *in vitro* in the induced lipid peroxidation test. The activity of aconitase was assessed by a conjugated aconitase-isocitrate dehydrogenase reaction, citrate synthase – by changing the color intensity of the Ellman reagent solution, succinate dehydrogenase were determined in the reaction of succinate-dependent oxidation of 2,6-dichlorophenolindophenol.

Results. The carried out study showed that the maximum amount of total phenols (2.39±0.05%) is observed in a 50% ethanol extract from *Viscum album* L. leaves, with the content of total flavonoids equal to 1.83±0.04%, and the antioxidants equal to 0.503±0.007 mg/g (a quercetin equivalent) and 0.322±0.006 mg/g (a gallic acid equivalent). A 50% ethanol extract suppressed lipid peroxidation in the model mixture with IC_{50}=106.3±1.09 μg/ml. In *Viscum album* L. leaves, a high activity of aconitase which strongly correlated (r=0.88416) with changes in the concentration of flavonoids, has been notified.

Conclusion. The optimal extractant for obtaining extracts with a high antioxidant activity is 50% ethyl alcohol. The analysis of the mitochondrial enzymes activity showed that in *Viscum album* L. leaves collected in winter, a high activity of aconitase strongly correlated with changes in the concentration of flavonoids (r=0.88416).

Keywords: antioxidants; flavonoids; aconitase; succinate dehydrogenase; citrate synthase; *Viscum album* L.; correlation analysis; plants-hemiparasites; mitochondrial enzymes

Abbreviations: LPO – lipid peroxidation; DMSO – dimethyl sulfoxide; TBA – thiobarbituric acid; EDTA – ethylene diamine tetraacetatic acid; NADH – nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form; NADP – nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate; PAL – phenylalanine ammonia lyase; AU(s) – unit(s) of activity; ROS – reactive oxygen spiecies.

ВВЕДЕНИЕ

К роду Омела принадлежат около 100 видов вечнозеленых полупаразитных растений, из которых в России распространены только омела белая (*Viscum album* L.) и омела окрашенная (*Viscum coloratum* (Kom.) Nacai). Омела белая представляет собой вечнозеленый кустарник полушаровидной формы с вильчатым ветвлением, который произрастает на стволах и ветвях многих лиственных деревьев как паразитическая форма. Корни омелы белой образуют разветвления, проникающие под кору и в древесину дерева-хозяина, образуя в ней многочисленные специальные органы прикрепления – гаустории[1,2].

По таксономическому положению омела белая по классификации, предложенной Тахтаджяном А.Е и Гиляровой М.С. отнесена к семейству омеловые (*Viscaceae* Miers.) порядок санталовые (*Santalales).* По классификации Еленевской А.Г. и др. – к семейству лорантовые (*Loranthaceae* Juss.); согласно Цицину Н.В. – к семейству ремнецветные (*Loranthaceae* Juss.)[3,4].

Одним из отличий омелы от других растений паразитов является то, что для получения питательных веществ омела не разрушает клетки хозяина, а связывается с сосудистой системой дерева-хозяина. Для своей вегетации омела использует значительную часть питательных веществ дерева-носителя, что приводит к потере ресурсов, повышая тем самым его восприимчивость к различным заболеваниям.

[1] Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейства Rutaceae – Elaeagnaceae / АН СССР, Ботан. ин-т им. В. Л. Комарова; [Составители И. Б. Сандина и др.]; Отв. ред. П. Д. Соколов. – Л.: Наука: Ленингр. отд-ние, 1988. – 356 с.

[2] Лях Ю.Г., Юрель В.А. Омела белая (*Viscum album*) и ее экологическое значение в Республике Беларусь // Сахаровские чтения 2018 года: экологические проблемы XXI века: материалы 18-й междунар. науч. конф. – Минск, 2018. – Т. 2. – С. 152–154.

[3] Там же.

[4] Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Rutaceae – Elaegnaceae, 1988.

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-343-353

Возникающие морфологические нарушения уменьшают защитные функции дерева-хозяина, что приводит к гипертрофическим процессам, в результате чего часть дерева отмирает[5].

В омеле белой содержатся разнообразные по структуре биологически активные соединения – лектины, вискотоксины, висцерин, флавоноиды, азотсодержащие вещества, олеаноловая и урсоловая кислоты, спирты, амины и другие действующие соединения, которые определяют её уникальные терапевтические свойства [1, 2].

Исследованы три лектина из омелы белой, из которых наиболее изученным является белок-иммуномодулятор лектин ML-1, который повышает активность иммунной системы, при чем терапевтические эффекты проявляются в крайне малых дозах [3]. Избирательно взаимодействуя с иммунным клеткам (моноциты, лимфоциты), лектин стимулирует выделение клетками белков интерферона, интерлейкинов и фактора некроза опухоли. [4–6]. Кроме лектинов из экстрактов омелы белой выделены вискотоксины, их действие в больших дозах цитотоксично, что является предпосылкой к противораковой активности [1, 5].

Обнаруженные в омеле белой флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты характеризуются антиоксидантной активностью, которым присуще структурное многообразие, высокая биологическая активность и низкая токсичность [6].

Одними из самых эффективных антиоксидантов являются: жирорастворимые полифенолы (токоферол и его производные, убихиноны, некоторые стероидные гормоны), фенольные соединения (флавоноиды, фенолокислоты). Данные вещества по своему химическому строению и механизму действия близки к наиболее активным антиокислителям синтетического происхождения: гидрохинон, агидол, нафтолы [6–9].

Особую роль в инициации перекисных процессов играют ионы металлов, при этом в ряду металлов с переменной валентностью, железо и медь чаще всего принимают участие в реакциях окисления-восстановления. Ионизированное железо является компонентом активных центров многих ферментативных систем, например, аконитазы, пролин-гидроксилазы или энзима антиоксидантной защиты – каталазы. Биологическая роль железа связана с его способностью акцептировать и отдавать электроны с высокой скоростью реакции, превращаясь, соответственно, в двухвалентную (Fe^{2+}) или трехвалентную (Fe^{3+}) формы [6, 11].

Флавоноиды, являясь вторичными метаболитами растений, выполняют многие жизненно важные биологические функции, предлагая ценную метаболическую и генетическую модель для изучения транскрипционного контроля экспрессии генов. Биосинтез флавоноидов включает множество хорошо охарактеризованных ферментативных и регуляторных белков, которые контролируют биосинтез флавоноидов путем активации ранних стадий биосинтеза [12, 13].

ЦЕЛЬ. Изучение взаимосвязи активности митохондриальных ферментов и антиоксидантной активности вторичных метаболитов полифенольной природы листьев гемипаразита *Viscum album L.* (омела белая).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализируемые объекты

Объектом исследования явились листья омелы белой (*Viscum album* L.), произрастающей на яблоне домашней (*Malus domestica* Borkh.), собранные в окрестностях г. Ставрополя, Россия. Сырье собранно в зимний период (21.01.2022 г.). Выбор времени заготовки сырья основан на результатах предварительных исследований сравнительного анализа накопления активных компонентов в листьях омелы белой в зависимости от сезона заготовки сырья, в которых показано, что зимой отмечается максимальное содержание биологически активных соединений.

Определение суммарного содержания антиоксидантов

Суммарное содержание антиоксидантов определяли амперометрическим методом на жидкостном хроматографе Цвет Яуза 01-АА (НПО «Химавтоматика», Россия), используя градуировочный график зависимости выходного сигнала от концентрации кверцетина и галловой кислоты [14, 15].

Получение анализируемых извлечений: точную навеску высушенного воздушно-теневым методом и измельченного канцелярскими ножницами сырья (1 г) помещали в колбу вместимостью 100 мл, добавляли 30 мл спирта этилового соответствующей концентрации (50%, 70% и 90%) или воды очищенной, кипятили на водяной бане в течение 60 минут. Содержимое колбы фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию указанным выше способом повторяли еще 2 раза, фильтр промывали соответствующим экстрагентом и доводили объем фильтрата до метки. В случае необходимости пробу разбавляли [14–17].

Суммарное содержание антиоксидантов (мг/г) определяли по формуле 1:

$$X = \frac{X_Г \cdot V_п \cdot N}{m_п \cdot 1000}, \quad (1)$$

где: $X_Г$ – массовая концентрация антиоксидантов, найденная по градуировочному графику, мг/л; $V_п$ – объем извлечения, мл; $m_п$ – навеска сырья, г; N – кратность разбавления.

[5] Турова А.Д. Лекарственные растения и их применение. – М.: Медицина, 2013. – 203 с.

Оценка антиоксидантной активности анализируемых извлечения на модели железо (II) – индуцированного перекисного окисления липидов

Антиокислительное действие изучаемых извлечений было изучено *in vitro* на модели Fe^{2+}-индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ). В качестве модельной среды ПОЛ выступали лецитиновые липосомы. Об интенсивности ПОЛ липосом свидетельствует изменение концентрации продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов). Содержание липидных липосом в анализируемой среде составляло 40 мг/мл [18–20].

Антиоксидантную активность оценивали после предварительного упаривания извлечения на водяной бане и высушивания в сушильном шкафу при температуре не выше 60°С [18–22].

Реакцию Fe^{2+}-индуцированного ПОЛ проводили на водяной бане при 37°С с непрерывным барботированием. Исследуемые высушенные извлечения предварительно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавляли к суспензии липосом и раствору двухвалентного железа. Инкубировали 15 мин. После добавляли 0,5 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты и центрифугировали при 3 тыс об/мин в течение 15 минут. Далее к надосадочной жидкости добавляли 1 мл 0,5% раствора тиобарбитуровой кислоты и нагревали на водяной бане 15 минут при 100°С. Содержание ТБК-активных продуктов измеряли на спектрофотометре СФ-102 («Аквилон», Россия) при 532 нм [23]. Процент торможения ПОЛ рассчитывали по отношению к контрольной пробе (растворитель) по формуле 2 [24]:

$$AOA = \frac{\Delta A_к - \Delta A_{оп}}{\Delta A_к} \cdot 100\%, \qquad (2)$$

$$\Delta A_к = A_{к15} - A_к;\ \Delta A_{оп} = A_{оп15} - A_{оп}$$

где: АОА – антиоксидантная активность, %; $A_к$ и $A_{оп}$ – оптическая плотность до инкубации; $A_{к15}$ и $A_{оп15}$ – оптическая плотность после 15 мин инкубации.

Критериальным показателем, позволяющим судить об уровне антиоксидантной активности исследуемых извлечений, в данной работе выступал коэффициент полуингибиции (IC_{50}) ПОЛ, который рассчитывали методом регрессионного анализа [18–20].

Определение суммарного содержания фенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу

В анализируемых растворах концентрацию фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту определяли по градуировочному графику, а содержание в процентах (Х) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле 3:

$$X = \frac{C \cdot W_1 \cdot W_2 \cdot 100}{a \cdot V_a \cdot (100 - W)}, \qquad (3)$$

где: C – концентрация фенольных соединений в исследуемом извлечении, найденная по градуировочному графику, г/100 мл; a – навеска сырья, г; V_a – объем аликвоты, мл; W_1, W_2 – объемы мерных колб, мл; W – потеря в массе при высушивании сырья, % [25–27].

Количественное определение флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-102. При расчете содержания суммы флавоноидов использовали величину удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом, потому что извлечения из листьев *Viscum album* L. в присутствии 2% спиртового раствора алюминия (III) хлорида, имеют максимальное поглощение при длине волны 415±2 нм[6].

Содержание суммы флавоноидов в процентах (Х) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле 4:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)}, \qquad (4)$$

где: A – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415±2 нм, равный 248; a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, % [35].

Подготовка растительного материала для определения активности митохондриальных ферментов

Активность митохондриальных ферментов оценивали в обогащённой митохондриями цитозольной фракции, для получения которой 1,0 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в коническую колбу 50 мл и заливали 10 мл буферной системы (состав: 50 мМ/л HEPES + 2 мМ/л магния (II) хлорида + 40 мМ/л калия хлорида + 1 мМ/л ЭДТА + 0,1% бычий сывороточный альбумин + 1% поливинилпирролидона 40000 + 10% глицерина + 50 мкг/мл трипсина и гидроксид калия до pH 7,8). Полученную смесь выдерживали при температуре 37°С в течении 30 минут. Затем фильтровали через стеклянный фильтр и фильтрат центрифугировали при 1800 g 10 минут. Полученный супернатант отбирали в стерильные пробирки «Эппендорф» и наслаивали 10% раствор перколла и повторно центрифугировали при 18 000 g 10 минут. Вторичный супернатант удаляли для проведения анализа [28].

[6] Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. М.: МЗ РФ, 2018. – Т. 2, 4. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-343-353

Оценка активности аконитазы

Активность аконитазы оценивали спектрофометрическим методом с помощью спектрофотометра ПРОМЭКОЛАБ ПЭ-5300В (Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd., Китай) в ходе сопряженной аконитаза – изоцитратдегидрогеназной реакции, путем детекции НАДФН при 340 нм. Ход анализа: к среде, содержащей изоцитратдегидрогеназу 0,03 Ед/л, НАДФ 0,32 мг/мл, 55 µл фосфатно-солевого буфера и 50 µл исследуемого биоматериала добавляли раствор цитрата натрия 0,1 мг/мл (10 µл). Изменение оптической плотности полученных растворов регистрировали против смеси реагентов без исследуемого биоматериала в течении 2-х минут. Активность аконитазы рассчитывали по изменению оптической плотности, используя коэффициент экстинкции 0,0313µМ$^{-1}$. Активность фермента была выражена в ЕД/мг белка. Содержание белка в анализируемых пробах определяли по методу Бредфорда [29].

Оценка активности цитратсинтазы

Активность цитратсинтазы оценивали в среде, состоящей из раствора 5,5'-ди-тиобис-2-нитробензойной кислоты (реактив Эллмана) 100 мм Трис-HCl буфер с pH от 7,8; ацетил-CoA 100 мм; 0,1% Тритон-х 100 µл и 4 µл исследуемого биоматериала. Реакцию начинали добавлением 100 µл оксалоацетата. Через 3 минут оценивали изменение оптической плотности среды при 412 нм. Активность цитратсинтазы выражали также в ЕД/мг белка. Содержание белка в анализируемых пробах определяли по методу Бредфорда [30].

Оценка активности сукцинатдегидрогеназы

Активность сукцинатдегидрогеназы оценивали спектрофотометрически (спектрофотометр ПРОМЭКОЛАБ ПЭ-5300В) в реакции сукцинатзависимого окисления 2,6-дихлорфенолиндофенола при 600 нм. Во время анализа использовались стандартные наборы от Abcam.

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с применением программного пакета STATISTICA 6.0. Результаты выражались в виде M ± SEM (среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения). Дальнейший анализ выполнен методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с пост-процессингом Ньюмена-Кейлса в случае наличия распределения Гаусса и тестом Краскелла-Уоллиса при отсутствии распределения Гаусса. Нормальность распределения проверялась с помощью теста Шапиро-Уилка. Различия между исследуемыми группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Корреляционный анализ выполнен с использованием критерия Спирмена в интерпретации по шкале Чеддока.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка суммарного количества антиоксидантов в анализируемых объектах

Суммарное содержание антиоксидантов в водно-спиртовых и водных извлечениях из листьев омелы белой выражали в эквиваленте кверцетина и галловой кислоты. Результаты представлены в таблице 1.

Применяя амперометрический метод установлено, что максимальное количество антиоксидантов в извлечениях из листьев омелы белой отмечено при использовании 50% этанола в качестве эктрагента, которое составило 0,503±0,007 мг/г в пересчете на кверцетин и 0,322±0,006 мг/г в пересчете на галловую кислоту.

Определение антиоксидантного действия на модели F^{e2+}-индуцированного ПОЛ

В анализируемую среду добавляли исследуемые извлечения из листьев омелы белой в виде водно-спиртовых и водных растворов в конечных концентрациях двукратных разведений: 200 мкг/мл – 12,5 мкг/мл.

Наибольшую антиоксидантную активность проявляет извлечение из листьев омелы белой, полученное экстракцией 50% этанолом.

Максимальное снижение ПОЛ наблюдается в извлечениях из листьев омелы белой (экстрагент – спирт этиловый 50%), собранных зимой при концентрации 200 мкг/мл и составляет 73,64±1,43%. Более близкий результат у кверцетина наблюдался при концентрации 25 мкг/мл.

Рассчитанные показатели IC_{50}, численно равные концентрации веществ в анализируемой среде, вызывающей 50% снижение интенсивности ПОЛ, составили: для кверцетина 19,27±0,97 мкг/мл и 106,3±1,09 мкг/мл для исследуемого 50% спиртового извлечения из листьев омелы белой.

Полученные данные при определении суммарного содержания антиоксидантов на жидкостном хроматографе Цвет Яуза 01-АА амперометрическим методом согласуются с данными, полученными при определении антиоксидантного действия извлечений из листьев омелы белой на Fe^{2+}-индуцированном ПОЛ в липосомальной системе.

Определение суммы фенольных соединений с использованием реактива Фолина-Чокальтеу

Для количественного определения фенольных соединений использовали уравнение градуировочного графика: y = 1746x+0,002. Результаты определения общего содержания фенольных соединений представлены на рисунке 1 и в таблице 3.

Таблица 1 – Суммарное количество антиоксидантов в извлечениях из листьев *Viscum album* L.

Используемое сырье	Экстрагенты	Кратность разбавления	Содержание антиоксидантов, мг/г в пересчете на:	
			Кверцетин (n=6)	Галловую кислоту (n=6)
Листья омелы белой (*Viscum album* L.), собранные зимой	этанол 90%	–	0,127±0,002	0,078±0,001
	этанол 70%	–	0,374±0,003	0,244±0,003
	этанол 50%	**2**	**0,503±0,007**	**0,322±0,006**
	вода очищенная	–	0,261±0,003	0,167±0,002

Таблица 2 – Влияние извлечений из листьев *Viscum album* L. на Fe^{2+}-индуцированного ПОЛ в системе липосом

Конечная концентрация, мкг/мл	% снижения ПОЛ, n=3			
	Экстрагенты			
	Этанол 90%	Этанол 70%	**Этанол 50%**	Вода очищенная
12,5	8,22±1,28	9,05±1,05	**12,08±1,36**	11,28±1,27
25	10,16±1,89	17,45±1,24	**22,48±1,23**	22,17±2,89
50	29,75±1,76	39,53±1,49	**41,77±2,19**	37,04±1,54
100	41,17±2,35	51,61±2,32	**55,71±2,04**	44,71±2,77
200	56,01±1,63	68,71±1,77	**73,64±1,43**	62,26±2,69
IC_{50}	160,52±2,26	120,07±1,94	**106,30±1,09**	137,02±2,16

Примечание: в качестве референта использовали 95% спиртовой раствор кверцетина, который добавляли в конечных концентрациях двукратных разведений: 3,125 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл. Снижение накопления продуктов ПОЛ составило 13,89±1,56%, 31,04±2,41%, 47,04±2,21%, 69,91±2,07%, 88,97±1,37%.

Таблица 3 – Сумма фенольных соединений из листьев *Viscum album* L.

Название сырья	Листья омелы белой (*Viscum album* L.)	
Используемые экстрагенты	Соотношение пробы извлечения и реактива Фолина-Чокальтеу	Содержание фенольных соединений, % (n=6)
Этанол 90%	1:1	1,74±0,03
Этанол 70%	1:2	2,02±0,05
Этанол 50%	**1:1**	**2,39±0,05**
Вода очищенная	1:1	1,75±0,04

Примечание: при определении общего содержания фенольных соединений использовали V_a=0,5 мл для извлечений из омелы белой.

Таблица 4 – Стабильность комплексов 50% этанольного извлечения с реактивом Фолина-Чокальтеу в динамике

Сырье	Время экспозиции, мин											
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	**60**
Оптическая плотность	0,613	0,664	0,686	0,704	0,710	0,713	0,716	0,720	0,733	0,762	0,767	**0,770**
Содержание фенолов	1,902	2,061	2,129	2,185	2,204	2,219	2,223	2,235	2,275	2,366	2,381	**2,391**

Таблица 5 – Суммарное содержание фенольных соединений из листьев омелы белой

Название сырья	Листья омелы белой (*Viscum album* L.)	
Экстрагенты	Время (мин) стабилизации оптической плотности,	Содержание флавоноидов, % (n=6)
Этанол 90%	30	0,327±0,004
Этанол 70%	35	1,46±0,03
Этанол 50%	**30**	**1,83±0,05**
Вода очищенная	35	0,282±0,003

Примечание: при определении общего содержания фенольных соединений использовали V_a=5,0 мл для извлечений из омелы белой, произрастающей на яблоне домашней.

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-343-353

Таблица 6 – Изучение стабильности окраски комплексов 50% этанольного извлечения с 2% спиртовым раствором алюминия (III) хлорида в динамике

Сырье	Время экспозиции, мин								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Оптическая плотность	0,796	0,811	0,820	0,823	0,832	**0,833**	0,832	0,818	0,816
Содержание фенолов	1,744	1,777	1,80	1,804	1,823	**1,825**	1,823	1,793	1,788

Таблица 7 – Изменение активности митохондриальных ферментов в листьях *Viscum album* L.

Показатель	Листья омелы белой, собранные зимой
Аконитаза, ЕД/г белка	3,36±0,14
Цитратсинтаза, ЕД/г белка	0,54±0,07*
Сукцинатдегидрогеназа, Ед/г белка	1,12±0,06*

Примечание: * – статистически достоверно относительно активности аконитазы (тест Краскелла-Уоллиса, p <0,05).

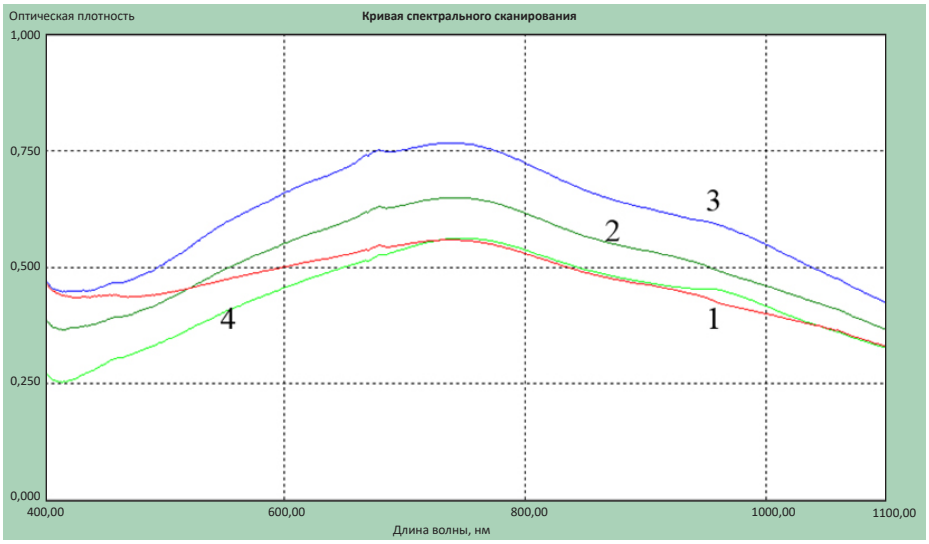


Рисунок 1 – УФ-спектры поглощения комплексов извлечений из листьев *Viscum album* L. с реактивом Фолина-Чокальтеу

Примечание: 1 – извлечение, полученное экстракцией 90% этанолом; 2 – извлечение, полученное экстракцией 70% этанолом; 3 – извлечение, полученное экстракцией 50% этанолом; 4 – извлечение, полученное экстракцией водой очищенной.

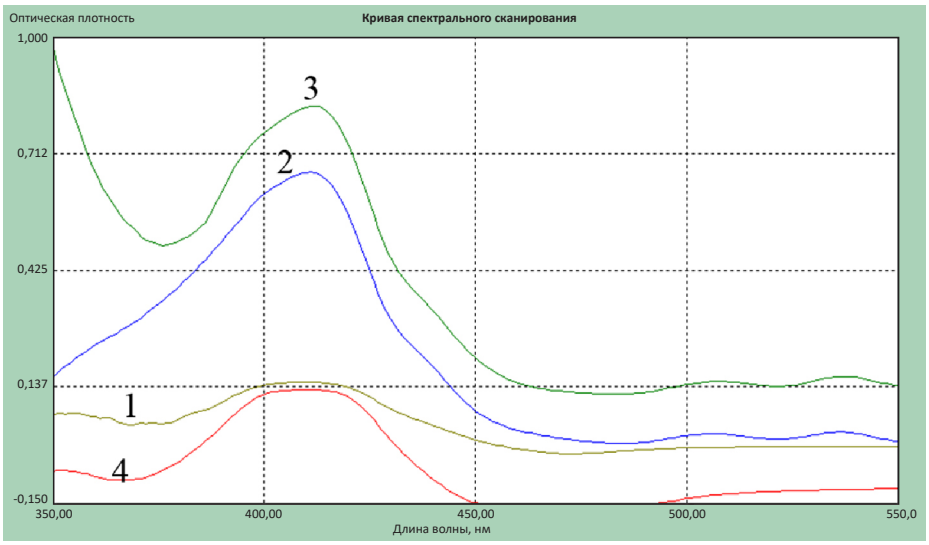


Рисунок 2 – УФ-спектры поглощения комплексов извлечений из листьев *Viscum album* L. с 2% спиртовым раствором алюминия (III) хлорида

Примечание: 1 – извлечение, полученное экстракцией 90% этанолом; 2 – извлечение, полученное экстракцией 70% этанолом; 3 – извлечение, полученное экстракцией 50% этанолом; 4 – извлечение, полученное экстракцией водой очищенной.

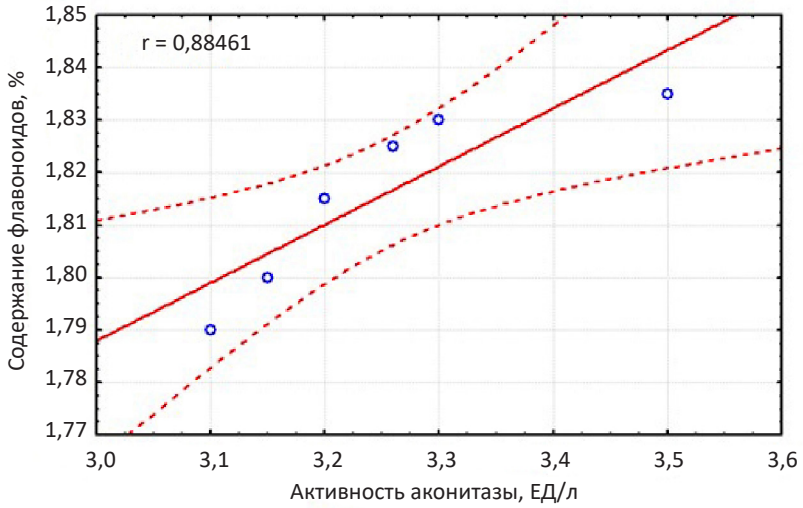


Рисунок 3 – Зависимость изменения концентрации флавоноидов от активности аконитазы в листьях *Viscum album* L.

Примечание: на рисунке показаны определяемые показатели (выделены синим); линия тренда корреляционной зависимости (сплошная линия); границы разброса данных (пунктирная линия).

Максимальное количество суммы фенолов отмечено в извлечении из листьев омелы белой, полученном экстракцией 50% спиртом этиловым и составляет 2,39±0,05%. Время стабилизации оптической плотности 60 мин.

В связи с тем, что реакция развивается в динамике, нами установлено, что величина оптической плотности стабилизируется в течение 60 мин, что является оптимальной для проведения анализа.

Качественный и количественный анализ флавоноидов

Количественное определение флавоноидов проводили в пересчете на рутин в 6 повторностях. Результаты определения общего содержания флавоноидов приведены на рисунке 2 и в таблице 5.

Из данных таблицы 5 следует, что максимальное содержание суммы флавоноидов в извлечениях из листьев омелы белой, наблюдается при экстракции сырья 50% спиртом этиловым и составляет 1,83±0,04%. Время стабилизации оптической плотности анализируемых растворов от 30 до 35 мин.

В связи с тем, что реакция развивается во времени, то нами установлено, что величина оптической плотности стабилизируется в течение 30 мин, что является оптимальной для проведения анализа [26].

Оценка изменения активности митохондриальных ферментов в листьях омелы белой

Изучение изменения активности ферментов митохондриального происхождения в листьях омелы белой показала, что активность аконитазы была выше, чем активность цитратсинтазы и сукцинатдегидрогеназы в 6,2 раза ($p < 0,05$) и 3,0 раза ($p < 0,05$) соответственно.

В результате корреляционного анализа было установлено, что содержание флавоноидов, как основных полифенольных антиоксидантов, в листьях омелы белой сильно коррелирует с изменением активности аконитазы с коэффициентом корреляции r=0,88416 (рис. 2). В случае оценки зависимости изменения концентрации флавоноидов от активности цитратсинтазы и сукцинатдегидрогеназы отмечена слабая корреляционная зависимость (r=0,23681 и r=0,33984).

ОБСУЖДЕНИЕ

Флавоноиды представляют собой класс структурно разнообразных вторичных метаболитов, которые выполняют в растениях множество функций. Например, установлена ведущая роль флавоноидов в регуляции роста, биосинтезе пигментов, передаче внутриклеточных сигналов, защите растения от ультрафиолетового излучения и действия активных форм кислорода. На сегодняшний флавоноиды являются одной из самых изучаемых групп соединений природного происхождения, при этом большинство проводимых исследований направлены на оценку их фармакологической активности. В тоже время особенности биосинтеза и накопления флавоноидов также представляют определенный научный интерес [31].

Биосинтез всех вторичных метаболитов в растениях представляет собой контролируемый и детерминируемый процесс, основу которого составляет строго определенная последовательность ферментативных реакций. В то время, как пути

синтеза углеводов, жиров, белков и нуклеиновых кислот или просто первичных метаболитов, по существу, одинаковы, во всех живых организмах для вторичных метаболитов существует большое разнообразие механизмов синтеза. Понимание этих метаболических процессов имеет решающее значение для регулирования биосинтеза искомых фитохимических соединений и их потенциального использования в пищевой или медицинской промышленности. Ферментативный контроль реакций биосинтеза флавоноидов подразумевает интенсификацию синтеза в определенных условиях, которые применительно к растению зависят от условий произрастания и времени года [32].

Поскольку большинство вторичных метаболитов, включая флавоноиды, прежде всего, выполняют в растениях защитную функцию и их синтез активируется при действии неблагоприятных внешних факторов в связи с этим в данном исследовании было оценено содержание вторичных метаболитов полифенольной структуры в листьях омелы белой, собранных зимой, т.е. в условиях максимально предрасполагающих к их синтезу в больших количествах. В итоге было показано, что максимальная экстракция флавоноидов отмечена при использовании спирта этилового 50%, при этом содержание искомых веществ составило 1,83±0,05%. Высокое содержание данных веществ в листьях омелы белой, собранных зимой, может объясняться тем фактом, что низкие температуры стимулируют экспрессию генов ферментов, ответственных за синтез флавоноидов: FAL (ФАЛ, фенилаланин-аммиак лиазы), халконсинтазы, флаванон-3-гидроксилазы, дигидрофлавонол-4-редуктазы, антоцианидинсинтазы, флавоноид-3-О-глюкозилтрансферазы, лейкоантоцианидинредуктазы [12, 13], что приводит к повышению синтеза и накопления флавоноидов и других полифенолов. Также отмечена сильная корреляция между изменением содержания флавоноидов и активностью аконитазы (r=0,88416) в листьях омелы белой, тогда как зависимость по отношению к цитратсинтазе (r=0,23681) и сукцинатдегидрогеназе (r=0,33984) носила слабый характер.

Аконитаза, также известная как аконитатгидратаза представляет собой фермент, железосерный кластерный белок, который катализирует обратимую изомеризацию цитрата в изоцитрат через цис-аконитат в цикле трикарбоновых кислот. У млекопитающих фермент находится в двухклеточных компартментах – митохондрии и цитоплазма. В цикле Кребса непосредственно участвует митохондриальная изоформа, тогда как роль цитоплазматического изофермента сводится к регуляции стабильности определенных транскриптов при отщеплении железосерного кластера (в данном случае аконитаза выступает в роли РНК-связывающего белка) [33].

У растений цитоплазматический и митохондриальный фермент имеют сходные характеристики и не могут быть дифференцированы с высокой степенью селективности. Аконитаза растений участвует в реакциях глиоксилатного цикла и метаболизма сахарозы, а также в нескольких важных физиологических процессах, включая инактивацию пероксидов и нитроксилов. Недавние исследования показали важную роль аконитазы в биосинтезе вторичных метаболитов, в том числе флавоноидов. Так некоторые гибриды, демонстрирующие пониженную концентрацию флавоноидов по сравнению с материнской линией, имеют дефицитный фенотип аконитазы [34].

Цитратсинтаза также играет значимую роль в синтезе вторичных метаболитов растений. Zhao H. и соавт., в своем исследовании показали, что митохондриальная цитратсинтаза является ключевым регулятором синтеза антоцианов *Petunia hybrida hort. ex E. Vilm* [35]. В свою очередь сукцинатдегидрогеназа отвечает за синтез органических кислот в клетках растений [36]. По всей видимости различная роль митохондриальных ферментов в биосинтезе вторичных метаболитов растений может объяснить установленные в данном исследовании корреляционные взаимосвязи.

Таким образом, можно предположить, что в условиях температурного стресса в листьях омелы белой происходит активация защитных ферментативных и неферментативных механизмов (аконитаза и повышенный синтез флавоноидов соответственно), действие которых направлено на поддержание жизнеспособности клетки. Установлено, что воздействие низких температур, как сильного стрессора, на растительную клетку приводит к накоплению активных формы кислорода (АФК): гидроксильные радикалы, супероксид-анион, синглетный кислород и перекись водорода. Высокие уровни АФК оказывают пагубное влияние на структуры клетки, приводя к повреждению ДНК, перекисному окислению липидов, денатурации белков, снижению фотосинтеза, нарушению активности ферментов и гибели клеток. Следовательно, поддержание умеренного уровня АФК необходимо для защиты от разнообразных абиотических и биотических стрессов, и именно с активацией окислительного стресса может быть связана повышенная экспрессия аконитазы листьев омелы белой и интенсификация синтеза вторичных метаболитов [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено содержание антиоксидантов, фенолов, флавоноидов в листьях омелы белой (*Viscum album* L.), произрастающей на яблоне домашней (*Malus domestica* Borkh.). Оптимальным экстрагентом является спирт этиловый 50%. Анализ активности митохондриальных ферментов показал, что в листьях омелы, собранных зимой,

отмечена высокая активность аконитазы, сильно коррелировавшая с изменением концентрации флавоноидов (r=0,88416), тогда как зависимостей между активностью сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и содержанием флавоноидов в листьях омелы белой не установлено.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.Л. Аджиахметова – разработка концепции исследования, получение анализируемых извлечений, проведение *in vitro* исследования, подготовка окончательного варианта рукописи; Д.И. Поздняков – разработка концепции исследования, оценка активности митохондриальных ферментов, статистическая обработка результатов исследования, подготовка окончательного варианта рукописи; Н.М. Червонная – разработка концепции исследования, получение анализируемых извлечений, проведение *in vitro* исследования, подготовка окончательного варианта рукописи; Е.О. Куличенко – определение антиоксидантного действия, анализ литературы; Э.Т. Оганесян – разработка концепции исследования, анализ литературы, подготовка окончательного варианта рукописи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Корман Д.Б. Противоопухолевые свойства лектинов омелы белой // Вопросы онкологии. – 2011. – Т. 57, № 6. – С. 689–698.
2. Саякова Г.М., Хамитова А.Е., Олатаева З.Н. Создание новых лекарственных форм из отечественного растительного сырья софоры толстоплодной (*Sophora pachycarpa*) и омелы белой (*Viscum album*), как перспективных источников БАВ // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2018. – № 4. – С. 217–220.
3. Franz H. Mistletoe lectins and their A and B chains // Oncology. – 1986. – Vol. 43 (Suppl 1). – P. 23–34. DOI: 10.1159/000226417
4. Stener-Vogt M.K., Bonkowsky V., Ambrosch P., Scholz M., Neiss A., Strutz J., Hennig M., Lenarz T., Arnold W. The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomized controlled clinical trial // Eur. J. Cancer. – 2001. – Vol. 37, No. 1. – P. 23–31. DOI: 10.1016/s0959-8049(00)00360-9
5. Hajtó T., Fodor K., Perjési P., Németh P. Difficulties and perspectives of immunomodulatory therapy with mistletoe lectins and standardized mistletoe extracts in evidence-based medicine // Evid. Based Complement Alternat. Med. – 2011. – Vol. 2011. – Art. ID: 298972. DOI: 10.1093/ecam/nep191
6. Jäger S., Beffert M., Hoppe K., Nadberezny D., Frank B., Scheffler A. Preparation of herbal tea as infusion or by maceration at room temperature using mistletoe tea as an example // Sci. Pharm. – 2011. – Vol. 79, No. 1. – P. 145–155. DOI: 10.3797/scipharm.1006-06
7. Узбеков М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. Сообщение I // Социальная и клиническая психиатрия. – 2014. – Т. 24, № 4. – С. 97–103.
8. Узбеков М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. Сообщение II // Социальная и клиническая психиатрия. – 2015. – Т. 25, № 4. – С. 92–101.
9. Jomova K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human diseases // Toxicology. – 2011. – Vol. 283, No. 2–3. – P. 65–87. DOI: 10.1016/j.tox.2011.03.001
10. Minotti G., Aust S.D. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262, No. 3. – P. 1098–1104.
11. Vashchenko G., MacGillivary T.A. Multi-copper oxidases and human iron metabolism // Nutrients. – 2013. – Vol. 5, No. 7. – P. 2289–2313. DOI: 10.3390/nu5072289
12. Li S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex // Plant Signal Behav. – 2014. – Vol. 9, No. 1. – Art ID: e27522. DOI: 10.4161/psb.27522
13. Catala R., Ouyang J., Abreu I.A., Hu Y., Seo H., Zhang X., Chua N.H. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses // Plant Cell. – 2007. – Vol. 19, No. 9. – P. 2952–2966. DOI: 10.1105/tpc.106.049981
14. Пат. 2238554 Российская Федерация, МКИ G01 N33/15 N27/26. Способ определения суммарной антиоксидантной активности биологически активных веществ / В.П. Пахомов [и др.] (РФ). – № 2003123072/15; заявл. 25.07.03; опубл. 20.10.04, Бюл. – № 15. – 3 с.
15. Яшин А.Я., Яшин Я.И. Прибор для определения антиоксидантной активности растительных лекарственных экстрактов и напитков // Журн. междунар. информационная система по резонансным технологиям. – 2004. – № 34. – С.10–14.
16. Яшин А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках // Рос. хим. журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. – 2008. – № 2. – С.130–135.
17. Аджиахметова С.Л. Антиоксидантная активность экстрактов из листьев, плодов и стеблей крыжовника отклоненного (*Grossularia reclinata* (L.) Mill.) // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10(6). – С. 1297–1301. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.rae.ru/fs/pdf/2013/10-6/32535.
18. Мельянцева Л.П., Крейнес В.М., Мельникова В.М., Гладштейн А.И. Влияние фосфатидилхолин холестериновых липосом на рост некоторых бактериальных культур // Журн. микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 1994. – № 2. – С. 14–17.
19. Куличенко Е.О., Андреева О.А., Сергеева Е.О., Сигарева С.С., Терехов А.Ю., Оганесян Э.Т., Сидорская С.Ю. Фармакологическая активность извлечений растений вида *Cosmos bipinnatus* Cav. // Фармация

и фармакология. – 2022. – Т. 10, № 1. – С. 82–92. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-82-92

20. Бжихатлова М.А., Андреева О.А., Оганесян Э.Т., Воронков А.В., Геращенко А.Д. Фенольные соединения листьев кампсиса укореняющегося // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – 2 (Часть 2). – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22562
21. Кодониди И.П., Сочнев В.С., Терехов А.Ю., Сергеева Е.О., Рябухин И.Ю. Синтез и изучение противовоспалительной активности 2-виниленпроизводных 4-(2,6-диметил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-бензсульфамида // Современные проблемы науки и образования. – 2021. – № 4. – С. 101. DOI: 10.17513/ spno.31053. 21
22. Кобин А.А., Доркина Е.Г. Определение антиоксидантной активности сухого экстракта форзиции поникшей на модели Fe^{2+}аскорбатиндуцированного перекисного окисления липидов // Современная наука и инновации. – 2015. – Вып. 1. – С. 124–126.
23. Aguilar Diaz De Leon J., Borges C.R. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay // J. Vis. Exp. – 2020. – No. 159. DOI: 10.3791/61122
24. Потапова А.А., Доркина Е.Г., Сергеева Е.О., Кобин А.А., Саджая Л.А. Изучение мембраностабилизирующего и антиоксидантного действия байкалина // Современная наука и инновации. 2016. – Вып. 1. – С. 148–152.
25. Денисенко Т.А., Вишникин А.Б., Цыганок Л.П. Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу // Аналитика и контроль. – 2015. – Т. 19, № 4. – С. 373–380. DOI: 10.15826/analitika.2015.19.4.012
26. Аджиахметова С.Л., Червонная Н.М., Поздняков Д.И., Оганесян Э.Т. Содержание фенолов (в том числе флавоноидов) и антиоксидантов в листьях *Viscum album* L. и *Pyrus communis* L. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 2. – С. 15–22. DOI: 10.29296/25877313-2021-02-03
27. Макарова Н.В., Валиулина Д.Ф., Азаров О.И., Кузнецов А.А. Сравнительное исследование содержания фенольных соединений, флавоноидов и антиоксидантной активности яблок разных сортов Химия растительного сырья. – 2018. – № 2. – С. 115–122. DOI: 10.14258/jcprm.2018022205
28. Pascual J., Rahikainen M., Angeleri M., Alegre S., Gossens R., Shapiguzov A., Heinonen A., Trotta A., Durian G., Winter Z., Sinkkonen J., Kangasjärvi J., Whelan J., Kangasjärvi S. ACONITASE 3 is part of the ANAC017 transcription factor-dependent mitochondrial dysfunction response // Plant Physiol. – 2021. – Vol. 186, No. 4. – P. 1859–1877. DOI: 10.1093/plphys/kiab225
29. Ternette N., Yang M., Laroyia M., Kitagawa M., O'Flaherty L., Wolhulter K., Igarashi K., Saito K., Kato K., Fischer R., Berquand A., Kessler B.M., Lappin T., Frizzell N., Soga T., Adam J., Pollard P.J. Inhibition of mitochondrial aconitase by succination in fumarate hydratase deficiency // Cell Rep. – 2013. – Vol. 3, No. 3. – P. 689–700. DOI: 10.1016/j.celrep.
30. Shepherd D., Garland P.B. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria // Biochem J. – 1969. – Vol. 114, No. 3. – P. 597–610. DOI: 10.1042/bj1140597
31. Agati G., Brunetti C., Fini A., Gori A., Guidi L., Landi M., Sebastiani F., Tattini M. Are Flavonoids Effective Antioxidants in Plants? Twenty Years of Our Investigation // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9, No. 11. – Art. ID: 1098. DOI: 10.3390/antiox9111098
32. Nabavi S.M., Šamec D., Tomczyk M., Milella L., Russo D., Habtemariam S., Suntar I., Rastrelli L., Daglia M., Xiao J., Giampieri F., Battino M., Sobarzo-Sanchez E., Nabavi S.F., Yousefi B., Jeandet P., Xu S., Shirooie S. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering // Biotechnol Adv. – 2020. – Vol. 38. – Art. ID: 107316. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.005
33. De Bellis L., Luvisi A., Alpi A. Aconitase: To Be or not to Be Inside Plant Glyoxysomes, That Is the Question // Biology (Basel). – 2020. – Vol. 9, No. 7. – Art. ID: 162. DOI: 10.3390/biology9070162.
34. Kumari A., Pathak P.K., Bulle M., Igamberdiev A.U., Gupta K.J. Alternative oxidase is an important player in the regulation of nitric oxide levels under normoxic and hypoxic conditions in plants // J. Exp. Bot. – 2019. – Vol. 70, No. 17. – P. 4345–4354. DOI: 10.1093/jxb/erz160
35. Zhao H., Chen G., Sang L., Deng Y., Gao L., Yu Y., Liu J. Mitochondrial citrate synthase plays important roles in anthocyanin synthesis in petunia // Plant Sci. – 2021. – Vol. 305. – Art. ID: 110835. DOI: 10.1016/j.plantsci.2021.110835
36. Jardim-Messeder D., Caverzan A., Rauber R., de Souza Ferreira E., Margis-Pinheiro M., Galina A. Succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) is a source of reactive oxygen species in plants and regulates development and stress responses // New Phytol. – 2015. – Vol. 208, No. 3. – P. 776–789. DOI: 10.1111/nph.13515
37. Liu T., Hu X., Zhang J., Zhang J., Du Q., Li J. H_2O_2 mediates ALA-induced glutathione and ascorbate accumulation in the perception and resistance to oxidative stress in Solanum lycopersicum at low temperatures // BMC Plant Biol. – 2018. – Vol. 18, No. 1. – Art. ID: 34. DOI: 10.1186/s12870-018-1254-0

АВТОРЫ

Аджиахметова Симилла Леонтьевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры органической химии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6924-8563. E-mail: similla503@mail.ru

Поздняков Дмитрий Игоревич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5595-8182. E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Червонная Надежда Михайловна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры органической химии ПМФИ – филиала ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID:0000-0001-6924-8563. E-mail: nadezhda.chervonnaya@yandex.ru

Куличенко Евгения Олеговна – аспирант кафедры органической химии, старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии с курсом биологической химии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0727-6689. E-mail: evgenia.kuli4encko@yandex.ru

Оганесян Эдуард Тоникович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой органической химии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-2756-9382. E-mail: edwardov@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 615.275.4

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ БИОАНАЛОГА РОМИПЛОСТИМА

А.Н. Афанасьева[1], В.Б. Сапарова[1,2], Д.Д. Карал-оглы[3], Е.И. Мухаметзянова[3], Д.В. Куркин[4], А.В. Калатанова[1], И.Е. Макаренко[1,2], А.Л. Хохлов[5], И.А. Луговик[1]

[1] Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг»,
198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34-А
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20/1
[3] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»,
354376, Россия, г. Сочи, с. Весёлое, ул. Мира, стр. 177
[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1
[5] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
150000, Россия, Ярославская область, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

E-mail: Alina.Afanaseva@geropharm.com

Получена 04.07.2022 После рецензирования 20.08.2022 Принята к печати 26.08.2022

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура – это хроническое аутоиммунное гематологическое заболевание, обусловленное повышенным разрушением тромбоцитов и ассоциированной тромбоцитопенией, для лечения которого применяется импортный препарат ромиплостим. Создание биоаналога данного препарата может поспособствовать снижению стоимости терапии и доступности большему числу пациентов к лечению.

Цель. Сравнение показателей безопасности референтного препарата и его биоаналога в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. В *in vitro* исследовании сформирована модель «комплемент-зависимой цитотоксичности», индуцированного комплементом, на клеточной линии 32D hTPOR clone 63, с последующим измерением жизнеспособности клеток набором CellTitter Glo®. *In vivo* часть исследования была проведена на макаках яванских (*Macaca fascicularis*). В ходе эксперимента оценивали клиническое состояние, смертность, аппетит животных, массу тела, температуру тела, частоту дыхательных движений, также смотрели клинические показатели крови и мочи животных, дополнительно измерялись показатели гемостаза.

Результаты. В эксперименте *in vitro* оригинальный препарат ромиплостим и его биоаналог GP40141 сравнивали по значениям EC_{50}, которые не показали комплемент-зависимой цитотоксичности. По результатам *in vivo* не было зафиксировано отклонений в клиническом статусе животных и потреблении ими корма, летальности в группах не зафиксировано. По всем исследуемым показателям (масса и температура тела, частота дыхательных движений, клинический анализ мочи, клинический и биохимический анализы крови, коагуляционный гемостаз) GP40141 и ромиплостим, при введении их в дозах эквивалентных 10 ТД, оказывали сопоставимые эффекты.

Заключение. При сравнении показателей безопасности *in vitro* и *in vivo* оригинальный препарат ромиплостим и его биоаналог GP40141 показали аналогичные результаты.

Ключевые слова: ромиплостим; биоаналог GP40141; Энплейт®; комплемент-зависимая цитотоксичность; исследования безопасности препаратов; *in vivo*; *in vitro*; идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура; токсикологический профиль; тромбопоэтиновый рецептор; TPO-R

Список сокращений: ИТП – идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура; TPO – тропмбопоэтин; TPO-R – тромбопоэтиновый рецептор; КЗЦ – комплемент-зависимая цитотоксичность; СК – система комплемента;

Для цитирования: А.Н. Афанасьева, В.Б. Сапарова, Д.Д. Карал-оглы, Е.И. Мухаметзянова, Д.В. Куркин, А.В. Калатанова, И.Е. Макаренко, А.Л. Хохлов, И.А. Луговик. Исследование безопасности биоаналога ромиплостима. *Фармация и фармакология.* 2022;10(4):354-370. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-354-370

For citation: A.N. Afanasyeva, V.B. Saparova, D.D. Karal-ogly, E.I. Mukhametzyanova, D.V. Kurkin, A.V. Kalatanova, I.E. Makarenko, A.L. Khokhlov, I.A. Lugovik. Safety study of romiplostim biosimilar. *Pharmacy & Pharmacology.* 2022;10(4):354-370. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-354-370

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-354-370

КП – классический путь; БА – биологическая активность; СО – стандартный образец; ВКО – внутренний контрольный образец; ОИ – объект испытания; EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация; IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования; МАТ – моноклональные антитела; ЛП – лекарственный препарат; ЧДД – частота дыхательных движений; плотность – удельный вес; pH – водородный показатель; TP – общий белок; GLU – глюкоза; BIL – билирубин (в моче); UBG – уробилиноген; KET – кетоновые тела; RBC – количество эритроцитов; MCV – средний объем эритроцита; Hgb – гемоглобин; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; Hct – гематокрит; Plt – количество тромбоцитов; PCT– тромбокрит; MPV – средний объем тромбоцитов; PDW – относительная ширина распределения тромбоцитов по объему; WBC – лейкоциты; MON – моноциты; LYM – лимфоциты; NE – нейтрофилы; EO – эозинофилы; BA – базофилы; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ПВ – протромбиновое время; ALP – щелочная фосфатаза; ALT – аланинаминотрансфераза; AST – аспартатаминотрансфераза; LDH – лактатдегидрогеназа; TB – общий билирубин (крови); UREA – мочевина; CRE – креатинин; CHOL – холестерин; TG – триглицериды; ; ALB – альбумин; GLB – глобулин; ALB/GLB – альбумин/глобулиновое соотношение; Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; Т-тест – t-критерий Стьюдента; Me – медианна; Q1 – 1 квартиль; Q3 – 3 квартиль; U-критерий – U-критерий Манна-Уитни.

SAFETY STUDY OF ROMIPLOSTIM BIOSIMILAR

A.N. Afanasyeva[1], V.B. Saparova[1,2], D.D. Karal-ogly[3], E.I. Mukhametzyanova[3], D.V. Kurkin[4], A.V. Kalatanova[1], I.E. Makarenko[1,2], A.L. Khokhlov[5], I.A. Lugovik[1]

[1] Closed Joint-Stock Company “Farm-Holding”,
Bld. A, 34, Svyaz Str., Strelna Vil., St. Petersburg, Russia, 198515
[2] A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
Bld. 1, 20, Delegatskaya Str., Moscow, Russia, 127473
[3] Scientific Research Institute of Medical Primatology,
Bld. 177, Mir Str., Vesyoloye Vil., Sochi, Russia, 354376
[4] Volgograd State Medical University,
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131
[5] Yaroslavl State Medical University,
5, Revolutsionnaya Str., Yaroslavl, Russia, 150000

E-mail: Alina.Afanaseva@geropharm.com

Received 04 July 2022 After peer review 20 Aug 2022 Accepted 26 Aug 2022

Idiopathic thrombocytopenic purpura is a chronic autoimmune hematological disease caused by an increased destruction of platelets and associated thrombocytopenia, for the treatment of which the imported drug romiplostim is used. Creation of the drug biosimilar provides a reduction in the cost of therapy and an access for the treatment to more patients.
The aim of the study was to compare the safety indicators of the reference drug and its biosimilar *in vivo* and in *vitro.*
Materials and methods. In the *in vitro* study, a model of “complement-dependent cytotoxicity” induced by the complement was formed on the 32D hTPOR clone 63-cell line, followed by a cell viability measurement with the CellTitter Glo® kit. *An in vivo* part of the study was carried out on Javanese macaque monkeys *(Macaca fascicularis).* During the experiment, the clinical condition, mortality, appetite of the animals, their body weight, body temperature, respiratory rate were assessed, the clinical parameters of blood and urine of the animals were also monitored, and the hemostasis indicators were additionally measured.
Results. In the *in vitro* experiment, the original drug romiplostim and its biosimilar GP40141 were compared in terms of EC50 values. The indicatirs did not show complement-dependent cytotoxicity. According to the *in vivo* results, no deviations were recorded in the clinical status of the animals and their feed intake, and no lethality was fixed out in the groups either. For all the parameters studied (body weight and temperature, respiratory rate, clinical urinalysis, clinical and biochemical blood tests, coagulation hemostasis), GP40141 and romiplostim, when administered at the doses equivalent to 10 toxic doses (TDs), had comparable effects.
Conclusion. In the comparison of safety performance both *in vitro* and *in vivo*, the original drug romiplostim and its biosimilar GP40141 showed similar results.
Keywords: romiplostim; biosimilar GP40141; Nplate®; complement-dependent cytotoxicity; drug safety studies; *in vivo; in vitro;* idiopathic thrombocytopenic purpura; toxicological profile; thrombopoietin receptor; TPO-R
Abbreviations: ITP – idiopathic thrombocytopenic purpura; TPO – tropmbopoetin; TPO-R – tropmbopoetin receptor; CDC – complement-dependent cytotoxicity; CS – complement system; CP – classical pathway; BA – biological activity; RS – reference standard; ICS – internal control sample; TO – test object; EC_{50} – half maximal effective concentration; IC_{50} – half-maximal inhibitory concentration; MABs – monoclonal antibodies; MP – medicinal preparation; RR – respiratory rate; Density – specific density; pH – pH value; TP – Total protein; GLU – glucose; BIL – bilirubin (in urine); UBG – urobilinogen; KET – ketone bodies; RBC – red blood cell count; MCV – mean cell volume; Hgb – hemoglobin; MCH – mean cell hemoglobin; MCHC – mean

corpuscular hemoglobin concentration; HCT – hematocrit; PLT CNT – platelet count; PCT – plateletcrit; MPV – mean platelet volume; PDW – platelet distribution width; WBCs – white blood cells/leucocytes; MON – monocytes; LYM – lymphocytes; NEU – neutrophils; EOS – eosinophils; BA – basophils; APTT – activated partial thromboplastin time; PT – prothrombin time; AP – alkaline phosphatase; ALT – alanine transaminase; AspAT – aspartate aminotransferase; LDH – lactate dehydrogenase; TB – total bilirubin (blood); UREA – urea; CRE – creatinine; CHOL – cholesterine; TG – triglycerides; alb – albumine; GLB – globulin; ALB/GLB – albumin/globulin ratio; SM – statistical mean; SD – standard deviation; t-test – Student's t-test; Me – median; Q1 – quartile 1; Q3 – quartile 3; U-test – Mann-Whitney U-test.

ВВЕДЕНИЕ

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) – это тяжелое заболевание, которое характеризуется тромбоцитопенией (<100×10^9/л) и требует для поддержания свёртываемости крови стимуляторов тромбопоэза [1–3]. В настоящее время на территории Российской Федерации (РФ) зарегистрировано всего 2 препарата, относящихся к этой группе – Энплейт® (Nplate, AMGEN EUROPE, B.V.)[1] и Революйд® (Revolade, NOVARTIS PHARMA, AG)[2]. Действующее вещество препарата Энплейт® – ромиплостим – было многократно проверено на эффективность и показало свою терапевтическую активность при лечении идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Это позволило пациентам получать современную терапию, улучшающую качество жизни [1, 4–6]. Однако этот препарат производится за пределами РФ, что повышает его стоимость для потребителя, а при создании биоаналога используются более новые технологии, что в конечном счёте влияет на стоимость их производства [7]. Поскольку при ИТП приём стимуляторов тромбопоэза требуется постоянно [3, 8], их наличие и экономическая доступность являются жизненно важными для пациентов. Создание биоаналога ромиплостима позволит повысить доступность лечения на территории РФ.

Ромиплостим (Рис. 1) представляет собой пептидное антитело, содержащее четыре связывающих TPO-R (тромбопоэтиновый рецептор, MPL) домена с высокой аффинностью к TPO-R и один домен IgG1 Fc-носителя, которое не имеет гомологии последовательностей с эндогенным тромбопоэтином (TPO) [9–11]. Ромиплостим связывается и активирует TPO-R на предшественниках мегакариоцитов в костном мозге. Он связывается так же, как эндогенный TPO, и может вытеснять TPO из связи с рецептором. Ромиплостим, аналогично TPO, активирует многие из тех же путей, что приводит к устойчивому повышению количества тромбоцитов [9, 12–15]. Гораздо меньше известно об эффектах, опосредованных Fc-областью молекулы ромиплостима. Например, одним из возможных вариантов может быть комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ), поскольку этот механизм реализован в моноклональных антителах (МАТ) посредством связывания Fc-фрагмента для активации системы комплемента [16–18].

Известно, что система комплемента (СК) является неотъемлемой частью как врожденной, так и адаптивной иммунной системы. Этот комплекс состоит из группы белков плазмы, которые взаимодействуют каскадным образом [19]. СК может быть активирована тремя разными путями, один из которых – классический путь (КП) обычно активируется антителами. Он опосредует специфические иммунные реакции и функционирует как часть адаптивного иммунитета. КП запускается тогда, когда молекула комплемента C1q связывается с Fc-частями антигена. Связывание с антителом вызывает конформационные изменения в молекуле C1q, приводящие к активации двух протеаз C1r и дальнейшему распаду двух молекул C1s (другая сериновая протеаза). Комплекс C1 теперь связывается с C2 и C4 и расщепляет их. Продукт C4b ковалентно связывается с клеточной поверхностью и образует комплексы C4bC2. Активированные C1s далее расщепляют C4bC2 и генерируют C4bC2a, которая представляет собой конвертазу C3/C5 КП. Затем, если активация комплемента не ограничена, она переходит к образованию мембранно-атакующего комплекса (МАК) и лизису клетки-мишени [19].

Общепризнано, что (МАТ) могут опосредовать эффекты, которые невозможно полностью выявить с помощью исследований *in vitro*, что обуславливает целесообразность проведения исследований биоэквавалентности на животных[3].

ЦЕЛЬ. Изучение *in vitro* и *in vivo* безопасности биоаналога ромиплостима GP40141 в сравнении с референтным препаратом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

In vitro определение комплемент-зависимой цитотоксичности

КЗЦ для препаратов ромиплостима оценивали в сравнении с показательным методом КЗЦ для препарата ритуксимаб. Этот препарат

[1] Государственный реестр Лекарственных средств Российской Федерации. Энплейт®. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e7a25c3e-1caa-44c0-81fe-5967882a071a.

[2] Государственный реестр Лекарственных средств Российской Федерации. Революйд®. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e021350c-54ad-4b52-b1fe-28b4e4fd0f9e.

[3] Решение ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». 2016. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207925/.

представляет собой химерное МАТ, специфически связывающееся с антигеном CD20 на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов и инициирующее иммунологические реакции, которые опосредуют лизис В-клеток. Один из рабочих механизмов препарата идёт через КЗЦ [20]. В тесте КЗЦ для ромиплостима в качестве тест-системы использовали клеточную линию лимфобластов мыши (*Mus musculus)* со стабильной экспрессией ТРО рецептора человека 32D hTPOR clone 63 (Selvita Group). Эффект комплемент-зависимой цитотоксичности сравнивался для оригинального препарата ромиплостима (AMGEN, Нидерланды) и его биоаналога GP40141 (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия). Концентрацию комплемента подбирали исходя из отсутствия токсичности самого комплемента на клетки, в результате выбрали разбавление 1:14.

В первый день эксперимента проводили рассев клеток и внесение объектов испытания (ОИ) с комплементом сыворотки крови кролика (Cedarlane, CL3441-S50). Для ОИ были подобраны концентрации, которые используются для оценки специфической биологической активности (БА) на клеточной линии 32D-hTPOR clone (63: 10; 3,3; 1,1; 0,4; 0,1; 0,04; 0,005; 0,002; 0,001; 0,0002 нг/мл). Данные концентрации добавлялись в среду для анализа RPMI Basal, состоящей из RPMI 1640 (Биолот, 1.3.4.), 1 мМ ХЕПЕС (Биолот, 1.2.6.1.), 10 мМ пирувата натрия (Биолот, 1.4.004.), до 1,5 г/л бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich, S5761), до 4,5 г/л глюкозы безводной (PanReac AppliChem, 141341), пенициллин-стрептомицин (Биолот, 1.3.18.), к которой добавляли 10% эмбриональной бычьей сыворотки FBS (Capricorn, FBS-11A). После приготовления ОИ подготавливали комплемент сыворотки крови кролика с разбавлением 1:14 и рассевали линию в лунки 96-луночного белого планшета (Corning, 3917) в концентрации 5000 клеток/лунка, подсчёт клеток проводили с помощью счётчика клеток Countess II FL (ThermoFisher Scientific, США). Добавляли к клеткам в разные лунки ОИ с комплементом и ОИ без комплемента. Инкубировали 24±4 ч при 37°С и 5% диоксидом углерода. Затем остужали планшет до комнатной температуры в течение 1 ч и вносили в каждую лунку реагент CellTitter-Glo (Promega, G7571) в эквиобъемном соотношении с культуральной жидкостью. Клетки лизировали механически на орбитальном шейкере в течение 2 мин также при комнатной температуре. Затем инкубировали планшеты в течение 10 мин для стабилизации люминесцентного сигнала, после чего регистрировали люминесценцию на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Настройки на приборе включали Presets Ultra Glo, время интегрирования – 0,4 сек на 1 лунку.

В тесте КЗЦ для ритуксимаба в качестве тест-системы использовали клеточную линию В-лимфобластов человека WIL2-S. В качестве ОИ использовали стандартный образец (СО) ритуксимаба (Mabxience, Испания) и внутренний контрольный образец ритуксимаба (ВКО). В первый день эксперимента аналогично с КЗЦ для ромиплостима, проводили рассев клеток и внесение ОИ с комплементом сыворотки крови кролика. Для КЗЦ ритуксимаба концентрация комплемента была подобрана в соотношении 1:7, в которой отсутствовала токсичность самого комплемента. Для ОИ были подобраны концентрации 5000, 2000, 800, 320, 128, 51, 20, 8, 3, 1.3, и 0,5 нг/мл, разбавление которых проводили в аналогичной с КЗЦ для ромиплостима среде анализа. После приготовления ОИ подготавливали комплемент сыворотки крови кролика и рассевали линию в лунки 96-луночного черного планшета (Corning, 3603, США) в концентрации 10000 клеток/лунка. Инкубировали планшет при 37°С и 5% диоксиде углерода в течение 2 ч, а затем добавляли alamarBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, DAL1100, США) и снова ставили инкубировать до 24 часов. По истечении времени регистрировали флюоресценцию на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar. Анализ данных для двух тестов проводился в интегрированном программном обеспечении MARS Data Analysis, а статистический анализ в программе GraphPad Prism 9.3.1.471, где нормировали данные в процентах относительно нулевого контроля, затем строили четырехпараметрическую кривую зависимости доза-реакция для подсчета величины EC_{50} (полумаксимальная эффективная концентрация).

In vivo исследование безопасности

Исследование проводилось на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт приматологии» (г. Сочи, Россия) в строгом соответствии со стандартами Rus-LASA[4,5] [20]. Проведение исследования было одобрено независимым локальным этическим комитетом (выписка из протокола № 61 от 09.02.2021).

В качестве тест системы были использованы клинически здоровые макаки яванские (*Macaca fascicularis*). ОИ филогенетически достаточно близки человеку и, при этом, в рамках доклинических исследований безопасности оригинального препарата у них не отмечалось образования нейтрализующих антител к ромиплостиму, в отличии от крыс, мышей и макак-резусов в исследованиях аналогичной продолжительности, что позволяет в

[4] ГОСТ 33218-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за нечеловекообразными приматами, 2014.

[5] ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур, 2014.

наибольшей степени предсказать риски, связанные с первичной фармакодинамикой у людей[6]. Все это позволило рассматривать данных животных как наиболее релевантных для сравнительного исследования безопасности.

В соответствии с решением Совета ЕЭК 8,9 при формировании экспериментальных групп необходимо придерживаться гибкого подхода – допустимо использовать животных только одного пола и только одну дозу препаратов – что позволяет в полной мере следовать принципу Reduce (сокращение числа используемых животных) из основополагающих принципов гуманности 3R[7]. Однако применение подобных способов сокращения количества животных требует обоснования. Животные одного пола были использованы в силу того, что токсикологический профиль оригинального препарата ромиплостим не различался между самцами и самками в рамках многочисленных токсикологических экспериментов, что указывает на отсутствие специфических токсических проявлений, связанных с полом[8]. Из этого следует, что введение животных двух полов не приведет к получению дополнительной информации о безопасности вещества и противоречит биоэтическому принципу Reduce. Следующим шагом к сокращению количества животных стало упразднение контрольной группы. Согласно Решению Директивы ЕС 89, допустимо проводить исследование с измененным дизайном (используя лишь одну дозу биоаналогичного (биоподобного) лекарственного препарата (ЛП) и оригинального (референтного) ЛП. Для того, чтобы сравнивать динамику показателей животных, проводилось снятие всех основных лабораторных и функциональных показателей до начала дозирования для того, чтобы исходные данные животных выступали некоторым контролем последующих точек измерения.

В связи с этим, для эксперимента отобрали 12 половозрелых самцов массой 2,65–3,95 кг. Животных делили на группы по уровню тромбоцитов, который был измерен за 7 дней до введения препаратов, после чего, для устранения предпочтений исследователя, экспериментальные группы были составлены путем рандомизации животных из сформированных групп. Животные были разделены на 2 группы, по 6 самцов в каждой. Группа 1 получала биоаналог GP40141, группа 2 – оригинальный препарат ромиплостим (табл. 1).

При подборе доз в рамках исследований безопасности критически важной точкой является выбор дозировки и кратности введения объекта испытаний и контрольного образца, так как, с одной стороны, они должны позволить в полной мере оценить потенциальные неблагоприятные последствия и этим самым обезопасить участников клинических исследований, а, с другой стороны, не быть излишними, не допуская напрасных страданий животных в рамках исследований[9,10,11]. В связи с этим, в качестве разумного компромисса, была выбрана дозировка 100 мкг/кг, так как она позволяет значительно (в 10 раз) превысить терапевтическую дозу для клинического применения[12] и использовалась в более ранних исследованиях безопасности оригинального препарата ромиплостим[13]. Данная доза была напрямую экстраполирована из клинической практики на животных, коэффициент пересчета доз не применялся.

Препараты вводили многократно, на протяжение 28 дней с кратностью 1 раз в 72 ч, так как данная кратность введения повторяет дизайн исследования оригинального препарата ромиплостим и позволяет добиться стабильной системной экспозиции в плазме животных[14]. Содержимое флакона с объектами испытания и СО представляло собой порошок, разведенный в 0,72 мл стерильной водой для инъекций с целью получения концентрации 250 мкг/0,5 мл (500 мкг/мл) сразу после приготовления. Препараты конкретному животному вводились в одно и то же место на протяжении всего исследования (28 дней).

Кормление и содержание животных осуществлялось в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. На протяжении всего эксперимента животные содержались в индивидуальных клетках, на которых указывались инвентарный номер животного, группа и пол. Клетки были оборудованы центральным водопроводом. Температура окружающего воздуха была 21–28°C, относительная влажность 40–70%, естественная продолжительность светового дня (г. Сочи). Рацион животных состоял из гранулированного корма, яиц, сухофруктов, свежих фруктов и хлеба. Кормление осуществляли в три этапа: 8–9 ч гранулированная кормовая смесь; 11–12 ч сочные корма, рисовая каша

[6] CHMP assessment report for Nplate. Procedure No. EMEA/H/C/942. EMEA/654269/2008. 2022. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/nplate-epar-public-assessment-report_en.pdf.

[7] Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ%3AL%3A2010%3A276%3A0033%3A0079%3Aen%3APDF

[8] Решение ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

[9] Там же.

[10] Product monograph including patient medication information Nplate® romiplostim for injection. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.amgen.ca/-/media/Themes/CorporateAffairs/amgen-ca/amgen-ca/documents/products/en/nplate_pm.pdf.

[11] CHMP assessment report for Nplate. Procedure No. EMEA/H/C/942. EMEA/654269/2008, 2022.

[12] Решение ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

[13] Там же.

[14] Там же.

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-354-370

и печенье; 14–15 ч гранулированная кормовая смесь. Вода предоставлялась *ad libitum* и соответствовала требованиям СанПиН 2.1.4.1074-01, ГН 2.1.5.1315-03, ГН 2.1.5.2280-07[15,16,17].

В ходе исследования ежедневно оценивались смертность, внешний вид (кожа, шерсть, глаза, нос, дыхание, стул, слизистые оболочки, положение тела, поведение и координация) и потребление корма. Масса, температура тела, частота дыхательных движений (ЧДД) оценивались в 0, 15 и 29 сутки вместе с отбором проб мочи и крови животных.

Отбор проб мочи осуществляли с поддона клетки в пробирки. Анализировали следующие показатели: цвет, прозрачность, удельный вес (плотность), водородный показатель pH, белок (UP), глюкоза (GLU), билирубин (BIL), кетоновые тела (KET), эритроциты (ERY), лейкоциты (LEY), уробилиноген (UBG). Анализ проводили на анализаторе DocUReader 2 PRO с использованием тест-полосок этой же фирмы.

Отбор проб крови для клинического анализа осуществляли в капиллярные пробирки Microvette Sarstedt, 200 мкл, с К3-ЭДТА. В образцах крови экспериментальных животных определяли следующие показатели: гемоглобин (Hgb), количество эритроцитов (RBC), количество лейкоцитов (WBC), лейкоцитарную формулу (LYM), моноциты (MON), нейтрофилы (NE), эозинофилы (EO), базофилы (BA), количество тромбоцитов (Plt), гематокрит (Hct), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), тромбокрит (PCT), средний объем тромбоцитов (MPV), относительная ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW). Анализ проводился на автоматическом гематологическом анализаторе MEK 7300K (ООО «ЭКО-МЕД-С М», Россия). Для анализа использовались реагенты для гематологического анализатора фирмы Nihon Kohden (Firenze S.r.l.Ю Италия). Подсчет количества клеток производился методом объемного сопротивления; концентрация гемоглобина определялась спектрофотометрическим методом; гематокрит, тромбокрит, ширина распределения эритроцитов и тромбоцитов вычислялись по гистограммам.

Для определения биохимических показателей за 18 ч до отбора проб крови животных лишали корма, сохраняя свободный доступ к воде. Взятие крови осуществляли в пробирки для получения сыворотки с активатором сгустка и гелем VACUETTE (5 или 8 мл) из левой паховой вены. Из крови получали сыворотку обычным методом: инкубация при комнатной температуре 30 мин, центрифугирование – при 3500 об/мин. Оценивали следующие параметры: аланинаминотрансфераза (ALT), аспартатаминотрансфераза (AST), коэффициент де Ритиса, общий белок (TP), альбумин (ALB), глобулин (GLB), соотношение альбумин/глобулин (ALB/GLB), щелочная фосфатаза (ALP), билирубин общий (TB), общий холестерин (CHOL), креатинин (CRE), глюкоза (GLU), лактатдегидрогеназа (LDH), триглицериды (TG), натрий (Na^+), калий (K^+), мочевина (UREA). Биохимический анализ крови проводился на биохимическом анализаторе BioLit-8020 (URIT Medical Electronic Group Co., Ltd, Китай). Для анализа использовались реагенты производства фирмы DAC, Молдова. Используемый метод измерения – колориметрия (кинетика, конечная точка).

Для проведения коагулометрического анализа кровь отбирали в вакуумные пробирки S-Monovette® (Германия) с поршнем объемом 1,4 мл. Для исследования влияния на свертывающую систему крови анализировали активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), фибриноген. Анализ на коагуляционный гемостаз проводился на коагулометре TS 4000 Plus (Россия). Метод определения ПВ-клоттинговый, основан на определении времени свертывания цитратной плазмы крови под действием смеси тромбопластина и ионов кальция. Метод определения АЧТВ: к исследуемой плазме крови последовательно добавляют реагент, представляющий собой водный раствор эллаговой кислоты в комплексе с соевыми фосфолипидами, и кальций хлористый. В процессе измерения АЧТВ регистровали время от момента добавления ионов кальция до момента образования сгустка. Фибриноген определяли методом Клаусса.

Статистическая обработка результатов анализа

Статистическая обработка данных *in vivo* части проводилась с помощью пакетов программного обеспечения R версии 3.5.2. Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверяли на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk`s W-test). В случае нормального распределения рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение, которые вместе со значением n (количество наблюдений) представлены в итоговых таблицах. В случае несоответствия данных закону нормального распределения рассчитывали медиану и квартильный размах. При выявлении межгрупповых отличий в данных с признаками нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента, а в данных с признаками ненормального распределения U-критерий Манна-Уитни.

[15] СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://docs.cntd.ru/document/901798042

[16] ГП 2.1.5.1315-03 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-литьевого и культурно-бытового водопользования. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294815/4294815336.pdf

[17] ГН 2.1.5.2280-07 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://pravo.gov.ru.

Таблица 1 – Схема распределения экспериментальных животных по группам

№ группы	Животные		Объект испытаний/ контрольный образец	Способ введения	Доза, мкг/кг	Продолжительность введения
	Пол	Количество в группе				
1	♂	6	GP40141	подкожно	100	28 дней, 1 раз в 72 часа
2	♂	6	Ромиплостим		100	

Примечание. ♂ – мужской пол.

Таблица 2 – Показатели относительной активности КЗЦ для ромиплостима

Образец	EC_{50}, нг/мл	R^2	Относительная активность, %
GP40141 (нг/мл) + комплемент (1:14)	0,128	0,995	72%
GP40141 (нг/мл)	0,093	0,989	n/a
Ромиплостим (нг/мл) + комплемент (1:14)	0,084	0,994	87%
Ромиплостим (нг/мл)	0,073	0,992	n/a
Образец	**IC_{50}, нг/мл**	**R^2**	**Относительная активность, %**
Ритуксимаб RM-RX-03 + комлемент (1:7)	125,6	0,951	n/a
Ритуксимаб RM-RX-02 + комлемент (1:7)	121,7	0,948	n/a

Примечание: n/a – не применимо, R^2 – коэффициент детерминации, EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация, IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования. Подсчёт EC_{50} и IC_{50} проводился по 11 концентрационным точкам в 3-х повторностях.

Таблица 3 – Динамика изменения среднего веса (г) экспериментальных животных по группам, n=6

Группа	Параметр	День измерений		
		0	15	29
GP40141 (группа 1)	Mean±SD	3483±397,1	3525±248,5	3600±249,0
	Т-тест, p Фон /День	n/a	0,83	0,56
Ромиплостим (группа 2)	Mean±SD	3150±405,0	3116,7±469,8	3158±453,2
	Т-тест, p Фон /День	n/a	0,90	0,97
	Т-тест, p, гр. 1/гр. 2	0,07	0,06	0,05

Примечание: Mean – среднее статистическое, SD – стандартное отклонение, Т-тест – t-критерий Стьюдента.

Таблица 4 – Динамика изменения средней температуры тела экспериментальных животных по группам, n=6

Группа	Параметр	День измерений		
		0	15	29
GP40141 (группа 1)	Mean±SD	38,68±0,24	38,80±0,18	38,63±0,26
	Т-тест, p Фон/День	n/a	0,36	0,74
Ромиплостим (группа 2)	Mean±SD	38,68±0,35	38,60±0,27	38,50±0,36
	Т-тест, p Фон/День	n/a	0,79	0,39
	Т-тест, p, гр. 1/гр. 2	1,0	0,24	0,48

Примечание: Mean – среднее статистическое, SD – стандартное отклонение, Т-тест – t-критерий Стьюдента.

Таблица 5 – Динамика изменения средней ЧДД/мин экспериментальных животных по группам, n=6

Группа	Параметр	День измерений		
		0	15	29
GP40141 (группа 1)	Mean±SD	39,00±4,10	34,83±4,83	32,17±2,48
	Т-тест, p Фон/День	n/a	0,14	0,006
Ромиплостим (группа 2)	Mean±SD	34,17±2,71	33,50±3,02	32,83±2,14
	Т-тест, p Фон/День	n/a	0,70	0,37
	Т-тест, p, гр. 1/гр. 2	0,04	0,58	0,63

Примечание: Mean – среднее статистическое, SD – стандартное отклонение, Т-тест – t-критерий Стьюдента.

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-354-370

Таблица 6 – Динамика показателей общего анализа мочи, n=6

Гр.	Дата	Параметр	Показатели							
			Плотность, г/мл	pH	UP, мг/дл	GLU, мл/дл	LEY, кл/мкл	BIL, мл/дл	UBG, мг/дл	KET, мг/дл
GP40141 (группа 1)	Фон	Me (Q_1; Q_3)	1 (1;1)	8,0 (7,0; 8,6)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
	15 дней	Me (Q_1; Q_3)	1 (1;1)	9,0 (8,9; 9,0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
	29 дней	Me (Q_1; Q_3)	1 (1;1)	8,25 (7,5; 8,5)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
		Критерий Фридмана, p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Me (Q_1; Q_3)	1 (1;1)	8,0 (7,4; 9,0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
	15 дней	Me (Q_1; Q_3)	1 (1;1)	8,5 (8,4; 9,0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
		U-критерий, p 1 гр./2 гр.	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	29 дней	Me (Q_1; Q_3)	1 (1;1)	8,25 (6,9; 8,6)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
		Критерий Фридмана, p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		U-критерий, p 1 гр./2 гр.	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примечание: Me – медиана; Q1 – 1 квартиль; Q3 тест – 3 квартиль; U-критерий – U-критерий Манна-Уитни; TP – Общий белок; GLU – глюкоза; LEY – лейкоциты; BIL – билирубин; UBG – уробилиноген; KET – кетоновые тела.

Таблица 7 – Частота проявления эритроцитов в моче (5–10 клеток/мкл), по результатам общего анализа мочи, n=6

День измерений	GP40141 (группа 1)	Ромиплостим (группа 2)	Точный критерий Фишера (межгрупповой анализ), p
Фон	1/6	1/6	>0,05
15 сутки	1	1/6	>0,05
29 сутки	1	1	>0,05
Точный критерий Фишера (внутригрупповой анализ), фон/15 сутки, p	>0,05	>0,05	–
Точный критерий Фишера (внутригрупповой анализ), фон/29 сутки, p	>0,05	>0,05	–

Таблица 8 – Внутрилабораторные нормы для показателей общего анализа мочи

Показатель, единица измерений	Диапазон значений
Удельный вес (плотность), г/мл	1,0–1,030
Водородный показатель (pH)	5–9
Общий белок (TP), мг/дл	0–15
Глюкоза (GLU), мл/дл	0–40
Эритроциты (ERY), кл/мкл	0–10
Лейкоциты (LEY), кл/мкл	0–20
Билирубин (BIL), мл/дл	0–0,5
Уробилиноген (UBG), мг/дл	0–1,8
Кетоновые тела (KET), мг/дл	0–50

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Таблица 9 – Гематологические показатели экспериментальных животных по группам, n=6

Гр.	Дата	Параметр	Показатели									
			RBC, 10^{12}/л	MCV, фл	Hgb, г/л	MCH, пг	MCHC, г/л	Hct, %	Plt, $\times 10^9$ /л	PCT, %	MPV, фл	PDW, %
GP40141 (группа 1)	Фон	Mean±SD	6,6±0,56	63,7±4,55	126±4,4	19,3±1,70	303±6,9	41,5±1,24	309±68,0	0,2±0,04	8,0±0,75	16,5±0,36
	15 дней	Mean±SD	6,1±0,62	63,8±4,86	115±2,1	18,9±1,73	297±7,7	38,7±1,57	757±183,2	0,5±0,09	7,0±0,66	17,8±0,74
		Т-тест, p Фон/15 дней	0,24	0,97	0,0003	0,71	0,21	0,006	0,0002	<0,0001	0,03	0,003
	29 дней	Mean±SD	5,8±0,28	62,7±4,83	109±7,0	19,0±1,70	303±7,1	36,2±2,06	717±153,6	0,5±0,07	6,4±0,66	17,3±0,72
		Т-тест, p Фон/29 дней	0,01	0,74	0,0007	0,73	0,84	0,0003	0,0001	0,0001	0,002	0,04
		Т-тест, p 15/29 дней	0,25	0,77	0,10	0,97	0,29	0,04	0,68	0,16	0,13	0,25
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean±SD	6,6±0,53	63,2±2,45	123±4,4	18,8±1,02	298±6,7	41,4±2,24	308±99,5	0,2±0,06	7,7±0,75	16,9±0,93
	15 дней	Mean±SD	6,4±0,57	63,0±2,93	120±7,6	18,7±1,22	297±8,5	40,4±2,91	818±249,5	0,6±0,16	7,0±0,39	17,8±0,85
		Т-тест, p Фон/15 дней	0,65	0,93	0,35	0,90	0,82	0,51	0,0009	0,0006	0,09	0,11
		Т-тест, p, гр.1/гр.2	0,41	0,82	0,18	0,79	0,86	0,24	0,64	0,54	0,96	0,94
	29 дней	Mean±SD	5,6±0,48	62,3±2,71	105±5,3	18,7±1,24	300±10,5	35,0±2,62	661±194,3	0,5±0,12	7,0±0,42	17,5±0,98
		Т-тест, p Фон/ 29 дней	0,009	0,56	<0,0001	0,92	0,66	0,001	0,003	0,002	0,08	0,34
		Т-тест, p 15/29 дней	0,03	0,66	0,003	0,98	0,56	0,007	0,25	0,19	0,89	0,52
		Т-тест, p, гр. 1/гр. 2	0,50	0,84	0,22	0,78	0,66	0,39	0,59	0,91	0,08	0,69

Примечание: Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; Т-тест – t-критерий Стьюдента; RBC – количество эритроцитов; MCV – средний объём эритроцитов; Hgb – гемоглобин; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; Hct– гематокрит; Plt– количество тромбоцитов; PCT– тромбокрит; MPV – средний объем тромбоцитов; PDW– относительная ширина распределения тромбоцитов по объему.

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-354-370

Таблица 10 – Лейкоцитарная формула экспериментальных животных по группам, n=6

Гр	Дата	Параметр	WBC, ×10⁹/л	MON, %	LYM, %	NE, %	EO, %	BA, %
GP40141 (группа 1)	Фон	Mean±SD	9,5±2,91	4,2±1,13	34,4±6,42	59,0±6,89	1,9±1,38	0,6±0,41
	15 дней	Mean±SD	11,0±2,53	4,4±0,83	33,7±6,00	59,0±6,66	2,4±1,41	0,6±0,27
		Т-тест, р Фон/15 дней	0,34	0,82	0,85	0,98	0,59	1,00
	29 дней	Mean±SD	11,8±2,65	4,7±1,84	30,1±5,87	63,0±4,33	1,4±0,67	0,8±0,32
		Т-тест, р Фон/29 дней	0,17	0,57	0,25	0,25	0,47	0,41
		Т-тест, р 15/29 дней	0,60	0,65	0,32	0,25	0,18	0,31
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean±SD	9,2±1,73	4,2±1,06	35,4±8,41	58,0±7,60	1,6±1,28	0,8±0,27
	15 дней	Mean±SD	11,3±2,25	3,9±0,99	32,1±10,08	61,9±11,38	1,5±0,96	0,6±0,37
		Т-тест, р Фон/15 дней	0,10	0,62	0,55	0,50	0,88	0,39
		Т-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,87	0,43	0,75	0,61	0,26	0,93
	29 дней	Mean±SD	14,2±5,53	5,2±1,47	24,5±14,08	67,4±15,58	2,0±2,87	0,9±0,29
		Т-тест, р Фон/29 дней	0,06	0,21	0,13	0,21	0,75	0,43
		Т-тест, р 15/29 дней	0,26	0,11	0,31	0,50	0,68	0,15
		Т-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,37	0,64	0,39	0,52	0,63	0,58

Примечание: Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; Т-тест – t-критерий Стьюдента; WBC – лейкоциты; MON – моноциты; LYM – лимфоциты; NE – нейтрофилы; EO – эозинофилы; BA – базофилы.

Таблица 11 – Биохимические параметры крови животных (часть 1), n=6

Гр.	Дата	Параметр	Показатели							
			GLU ммоль/л	ALP Ед/л	ALT Ед/л	AST Ед/л	КдР	LDH Ед/л	TB ммоль/л	UREA ммоль/л
GP40141 (группа 1)	Фон	Mean±SD	4,0±0,96	1064±322,3	26,7±5,99	37,0±8,85	0,8±0,29	579±197,3	4,7±1,30	6,1±0,37
	15 дней	Mean±SD	4,3±0,55	1238±141,3	31,2±4,49	45,7±12,31	0,7±0,16	651±165,2	7,5±2,99	6,2±0,37
		Т-тест, р Фон/15 дней	0,54	0,053	0,17	0,19	0,90	0,51	0,06	0,60
	29 дней	Mean±SD	4,5±1,64	1142±365,3	28,5±5,82	41,2±16,74	0,8±0,19	543±314,0	4,6±1,93	6,2±0,57
		Т-тест, р Фон/29 дней	0,48	0,71	0,60	0,60	1,00	0,82	0,96	0,68
		Т-тест, р 15/29 дней	0,70	0,15	0,40	0,61	0,87	0,47	0,07	1,00
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean±SD	5,7±1,29	1294±245,9	29,2±9,93	39,0±17,33	0,8±0,15	693±96,4	4,9±1,11	8,8±1,13
	15 дней	Mean±SD	4,0±1,39	1363±133,1	31,3±7,94	36,0±10,26	0,9±0,12	675±83,7	6,9±1,31	8,8±0,97
		Т-тест, р Фон/15 дней	0,06	0,56	0,69	0,72	0,31	0,73	0,02	0,98
		Т-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,67	0,75	0,97	0,17	0,14	0,76	0,64	0,0001
	29 дней	Mean±SD	4,7±1,24	1322±159,0	35,5±12,60	37,5±15,14	1,0±0,23	699±141,5	5,1±1,35	9,0±1,16
		Т-тест, р Фон/29 дней	0,22	0,82	0,36	0,88	0,08	0,93	0,73	0,77
		Т-тест, р 15/29 дней	0,37	0,64	0,51	0,84	0,23	0,72	0,04	0,77
		Т-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,85	0,29	0,24	0,70	0,06	0,29	0,61	0,0003

Примечание: Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; Т-тест – t-критерий Стьюдента; GLU – глюкоза; ALP – щелочная фосфатаза; ALT – аланинаминотрансфераза; AST – аспартатаминотрансфераза; LDH – лактатдегидрогеназа; TB – общий белок; UREA – мочевина; КдР - коэффициент де Ритиса.

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Таблица 12 – Биохимические параметры крови животных (часть 2), n=6

Гр.	Дата	Параметр	Показатели								
			CRE ммоль/л	CHOL ммоль/л	TG ммоль/л	TP г/л	ALB г/л	GLB г/л	ALB/ GLB	K^+ ммоль/л	Na^+ ммоль/л
GP40141 (группа 1)	Фон	Mean±SD	144±25,2	3,5±1,18	0,4±0,09	71,7±15,00	41,7±9,14	30,0±7,4	1,4±0,29	4,2±0,90	118±2,4
	15 дней	Mean±SD	164±18,9	3,9±0,81	0,5±0,23	79,2±11,58	49,2±3,87	30,0±12,8	2,1±1,41	5,2±0,86	115±2,7
		Т-тест, p Фон/15 дней	0,16	0,47	0,18	0,36	0,09	1,00	0,26	0,07	0,07
	29 дней	Mean±SD	138±28,6	5,1±0,71	0,5±0,26	70,8±10,63	40,3±6,80	30,5±3,94	1,32±0,09	4,23±1,04	116±10,3
		Т-тест, p Фон/29 дней	0,71	0,34	0,25	0,91	0,78	0,89	0,41	0,89	0,63
		Т-тест, p 15/29 дней	0,10	0,35	0,95	0,22	0,02	0,93	0,19	0,12	0,85
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean±SD	143±9,5	4,1±0,84	0,3±0,18	83,0±4,29	45,2±1,72	37,8±3,92	1,2±0,13	4,7±0,50	144±9,6
	15 дней	Mean±SD	148±16,6	4,6±1,02	0,5±0,14	84,5±5,28	47,3±3,67	37,2±5,42	1,3±0,29	5,2±0,71	150±5,1
		Т-тест, p Фон/15 дней	0,54	0,42	0,11	0,60	0,22	0,81	0,45	0,15	0,22
		Т-тест, p, гр. 1/гр. 2	0,14	0,23	0,92	0,33	0,42	0,23	0,19	0,91	<0,0001
	29 дней	Mean±SD	140±9,3	3,9±0,38	0,4±0,32	84,5±5,54	46,5±3,83	38,0±3,95	1,2±0,17	4,9±0,55	148±4,1
		Т-тест, p Фон/29 дней	0,59	0,61	0,70	0,61	0,46	0,94	0,73	0,40	0,39
		Т-тест, p 15/29 дней	0,33	0,17	0,49	1,00	0,71	0,77	0,62	0,46	0,47
		Т-тест, p, гр. 1/гр. 2	0,93	0,35	0,55	0,02	0,08	0,01	0,31	0,17	<0,0001

Примечание: Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; Т-тест – t-критерий Стьюдента; CRE – креатинин; CHOL – холестерин; TG – триглицериды; TP – общий билирубин; ALB – альбумин; GLB – глобулин; ALB/ GLB – альбумин/глобулиновое соотношение.

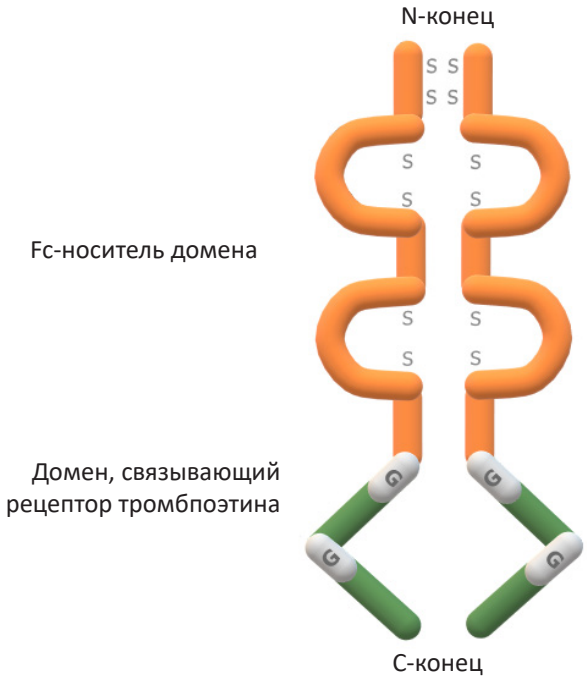


Рисунок 1 – Химическая структура ромиплостима

Примечание: ромиплостим представляет собой рекомбинантный белок, состоящий из домена рецептора Fc на N-конце, слитого с доменом связывания рецептора тромбопоэтина на C-конце.

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-354-370

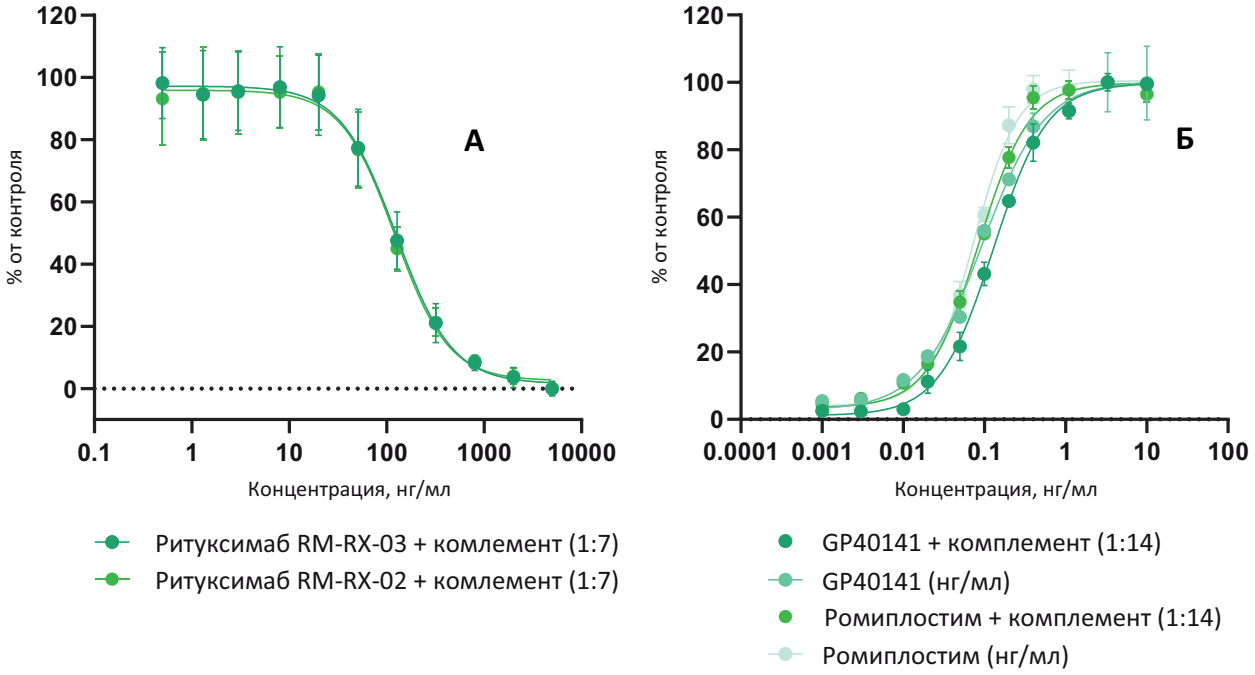


Рисунок 2 – Графики комплемент-зависимой цитотоксичности
Примечание: А – КЗЦ ритуксимаб, Б – КЗЦ ромиплостим.

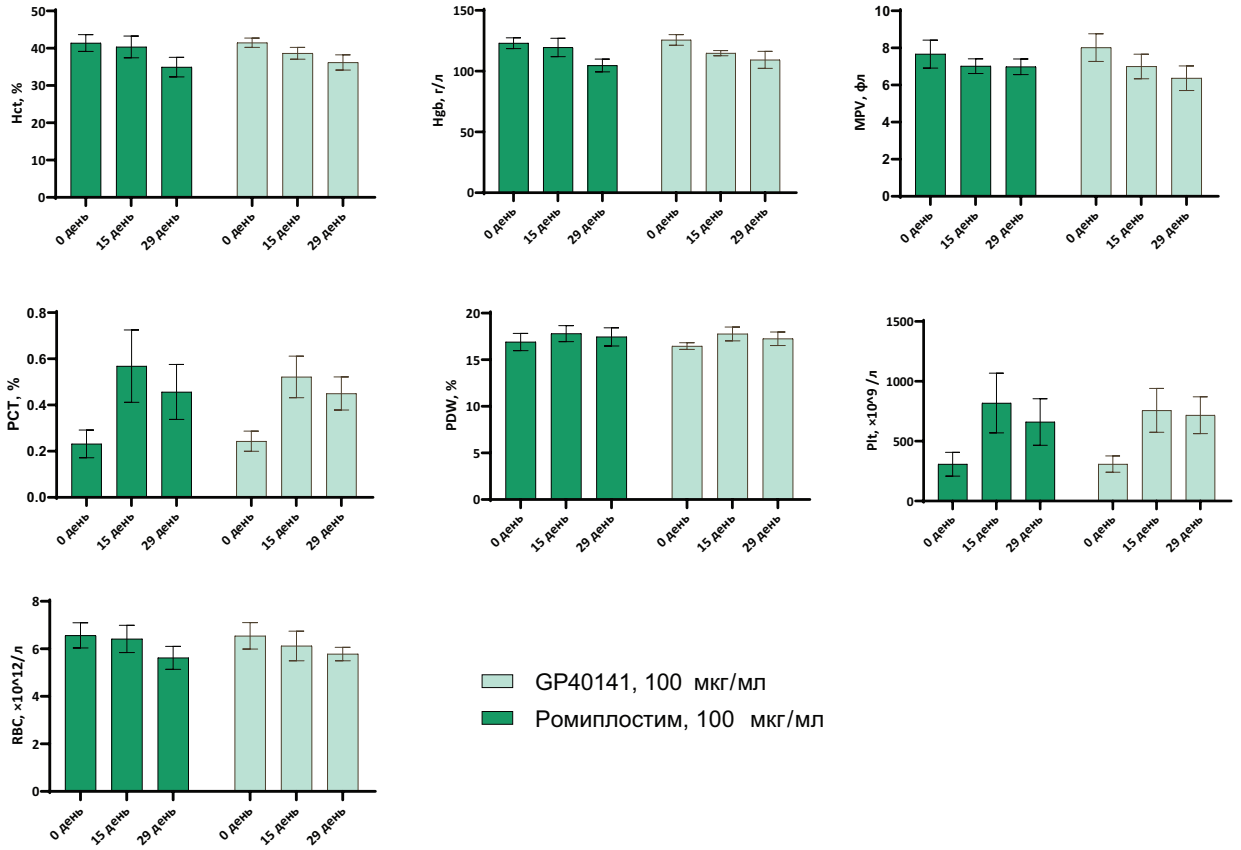


Рисунок 3 – Показатели гематологического анализа

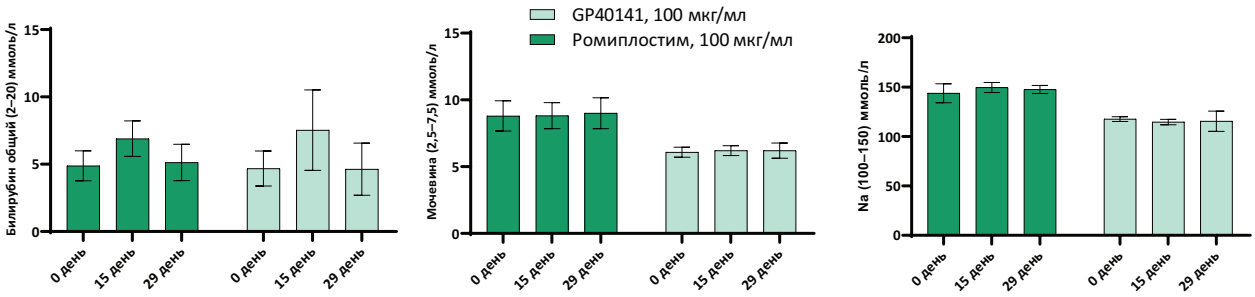


Рисунок 4 – Показатели биохимического анализа крови

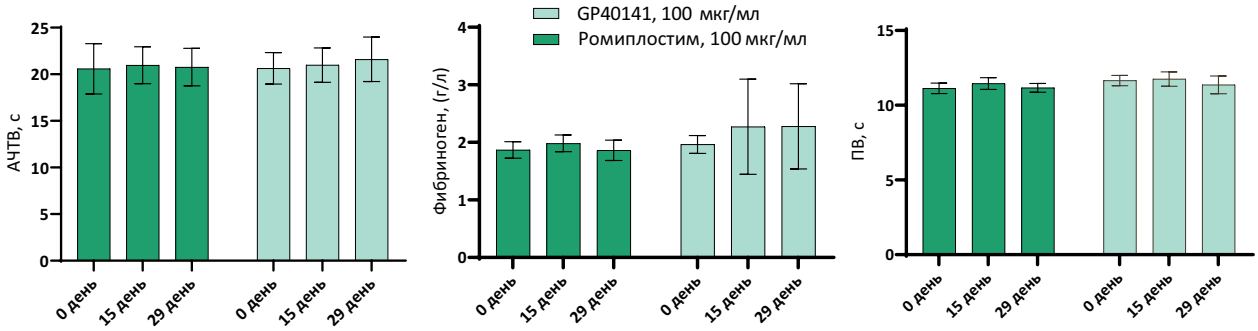


Рисунок 5 – Показатели коагуляционного гемостаза

В случаях где применимо, при межгрупповых и внутригрупповых сравнениях сопоставлялись показатели, полученные для животных в различные сроки проведения эксперимента. Для оценки внутригрупповой динамики в данных с признаками нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента, а в данных с признаками ненормального распределения – критерий Фридмана. Для анализа частот проявления некоторых параметров (уровень эритроцитов в моче) применялся точный критерий Фишера.

Результаты сравнения считались статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$. Графическое представление данных проводилось в программе GraphPad Prism 9.3.1.471.

РЕЗУЛЬТАТЫ

In vitro комплемент-зависимая цитотоксичность

Для оценки КЗЦ были проанализированы серии 1107017А оригинального препарата ромиплостим и его биоаналога GP40141, данные представлены на рисунке 2 и в таблице 2. Тест КЗЦ ритуксимаб рассматривался как эталонный пример комплемент-зависимой цитотоксичности (Рис. 2А). Для теста КЗЦ ромиплостима рассчитывали EC_{50} относительно контроля без внесения ОИ и комплемента. С этой целью в программе GraphPad Prism 9 сначала нормировали значения, а затем строили кривую логарифмической реакции, которая имеет симметричную сигмоидальную форму, её также называют четырехпараметрической кривой доза-реакцией. Аналогичным образом рассчитывали и для КЗЦ ритуксимаб.

Основной механизм действия ритуксимаба реализуется через комплемент-зависимую цитотоксичность [21–24]. На рисунке 2А показана дозозависимость этого действия, где с увеличением концентрации ритуксимаба уменьшается сигнал жизнеспособных клеток. В отличие от ритуксимаба, для ромиплостима (рис. 2Б), наоборот, с увеличением концентрации препарата увеличивается сигнал жизнеспособных клеток, что является следствием его прямого биологического действия – связывание с рецепторами тромбопоэтина и индуцирование пролиферации клеток. Чтобы отличить пролиферацию от КЗЦ дополнительно смотрели образцы с и без комплемента между которыми нет различий и нет явного снижения сигнала для образцов в присутствии комплемента.

Для полученных значений EC_{50} рассчитывали относительную активность, сравнивая показатели для препарата без комплемента относительно препарата с комплементом в процентах. Для оригинального препарата ромиплостим и GP40141 получали схожие значения в 87% и 72%, которые можно считать незначительными из-за отсутствия снижения сигнала жизнеспособности клеток при стимуляции препарата совместно с комплементом.

In vivo исследование безопасности

Результаты сравнительной безопасности оригинального препарата ромиплостим и его

бионаналога GP40141 на 12 самцах яванских макак представлены в таблицах 3–5 и рисунках 3–5.

Влияние на общее состояние животных

На протяжении всего срока эксперимента отклонений в клиническом статусе животных и потреблении ими корма ни в одной из экспериментальных групп выявлено не было, летальности в группах не зафиксировано.

Влияние на динамику массы тела

Данные массы тела экспериментальных животных и статистической обработки представлены в таблице 3.

По результатам статистической обработки не выявлено достоверных отличий между средним весом экспериментальных животных до начала эксперимента с последующими днями наблюдения внутри групп (15-й и 29-й дни). Межгрупповые различия на 29-й день обусловлены тем, что один из самцов продемонстрировал выраженное увеличение массы тела (11%), что привело к уменьшению SD и возникновению статистически значимых различий между группами при отсутствии разницы в динамике прироста массы тела. Данные отличия не связаны с действием препаратов, а обусловлено индивидуальной динамикой роста данного животного.

Влияние на температуру тела

Значения температуры тела и результаты статистической обработки приведены в таблице 4.

Температура тела экспериментальных животных в исследованных временных точках оставалась в пределах нормы и значимо не изменялась относительно фоновых значений.

Влияние на ЧДД

ЧДД измеряли путем подсчета дыхательных движений животных до введения препарата, а также на 15-й и 29-й дни. Результаты статистической обработки приведены в таблице 5.

Из результатов статистической обработки следует, что у обезьян обеих групп фоновые значения ЧДД были выше, чем в последующие дни: динамика изменений была одинаковой. Достоверное отличие в первой группе, относительно исходных значений через 29 дней после введения объекта испытаний, обусловлено высокими фоновыми значениями у некоторых (2 из 6) животных. Достоверное отличие в фоновых значениях между группами обезьян также является следствием большой вариабельности ЧДД у обезьян 1 группы. Учитывая это, можно говорить о том, что препараты оказали соотносимое действие на показатель ЧДД у животных.

Влияние на показатели общего анализа мочи

Анализ проводили в динамике – до начала введения объектов, на 15-й и на 29-й дни. У всех животных на протяжении всего эксперимента моча была желтая и прозрачная. Основные результаты клинического анализа мочи представлены в таблице 6.

В таблице 7 отдельно представлены результаты по показателям эритроцитов в моче животных. Это связано с тем, что на протяжении эксперимента у некоторых животных было зафиксировано количество эритроцитов, равное 5–10 клеток/мкл. Для сравнения был применен точный критерий Фишера. По результатам сравнения было выявлено, что отличий в динамике групп или между группами на схожих временных точках не отмечалось.

Также на протяжении всего эксперимента показатели мочи не выходили за пределы внутрилабораторных норм (табл. 8). Все это позволяет заключить, что исследуемые препараты не повлияли на показали мочи животных.

Влияние на показатели клинического анализа крови

Анализ проводили в динамике – до начала введения объектов, на 15-й и на 29-й дни. Результаты клинического анализа представлены в таблицах 9 и 10. Данные показателей клинического анализа крови, по которым наблюдались межгрупповые отличия, представлены на рисунке 3.

Ни по одному показателю клинического анализа крови группы не различались между собой. Однако при анализе различий динамики внутри групп наблюдалось увеличение количества тромбоцитов (Plt), тромбокрита (PCT), а также снижение количества эритроцитов (RBC), уровня гемоглобина (Hgb) и гематокрита (Hct) в обеих группах. В первой группе эти показатели значимо отличались в 15-й и 29-й день от фона ($p < 0,05$), в группе 2 они отличались в 29-й день относительно фона и 15-го дня ($p < 0,05$). Также отмечалось увеличение индекса распределения тромбоцитов (PDW) в группе 1 и аналогичная тенденция в группе 2, а также снижение среднего объема тромбоцитов (MPV) внутри групп на 15-й и 29-й дни относительно исходных значений (Рис. 6). Так как данные показатели имели аналогичную динамику (относительно исходных значений) в группах, получавших GP40141 и ромиплостим, с высокой степенью вероятности, можно утверждать, что они оказывали сопоставимые эффекты на гематологические показатели. Подобные изменения отмечались при исследованиях оригинального препарата и, наиболее вероятно, связаны с его первичной фармакодинамикой[18,19].

[18] CHMP assessment report for Nplate. Procedure No. EMEA/H/C/942. EMEA/654269/2008.

[19] Product monograph including patient medication information Nplate® romiplostim for injection.

Влияние на показатели биохимического анализа крови

Анализ проводили в динамике – до начала введения объектов, на 15-й и на 29-й дни. Данные показателей биохимического анализа крови по всем показателям представлены в таблицах 11 и 12, а показатели, по которым наблюдались межгрупповые отличия, представлены на рисунке 4.

Оценка внутригрупповой динамики показала только увеличение уровня билирубина на 15-й день, по сравнению с исходными значениями в обеих группах ($p < 0,05$). При оценке межгрупповой динамики отмечалось, что на протяжении всего эксперимента группы 1 и 2 не различались между собой ни по одному показателю, кроме содержания мочевины и натрия в крови ($p < 0,05$).

Влияние на свёртывающую систему крови

В динамике – на 0, 15 и 29-й дни – у экспериментальных животных производили забор крови для оценки параметров коагуляционного гемостаза. Данные полученных результатов представлены на рисунке 5.

Введение оригинального препарата ромиплостим и GP40141 не приводило к изменениям показателей коагуляционного гемостаза, не было выявлено достоверных отличий ни между группами обезьян, ни между фоновыми значениями и результатами на 15-й и 29-й день после введения объектов.

ОБСУЖДЕНИЕ

КЗЦ для оригинального препарата ромиплостим так же, как и для его аналога GP40141, не была отмечена для линии 32D hTPOR clone 63. Основной механизм действия ромиплостима связан с активацией сигнальных путей, которые способствуют жизнеспособности клеток, их росту, эндомитозу мегакариоцитов, созреванию мегакариоцитов и, что важно, продукции тромбоцитов [9]. Fc-область молекулы ромиплостим не связывается специфически с белками комплемента и соответственно не вызывает иммунной реакции.

Согласно результатам *in vivo* исследования оригинальный препарат ромиплостим и его биоаналог GP40141 можно считать сопоставимыми по профилю безопасности. За время исследования не было зафиксировано отклонений в клиническом статусе животных, летальность в группах также не отмечена. Масса тела и ЧДД имели схожую динамику на протяжении всего эксперимента. Также не отмечалось различий по показателям коагуляционного гемостаза и общего анализа мочи, динамика по данным показателям была аналогичной. Значения большинства показателей клинического анализа крови оставались стабильными по сравнению с исходными значениями. Исключением являлось увеличение количества тромбоцитов и тромбокрита, а также снижение уровня эритроцитов, гемоглобина и гематокрита, межгрупповых отличий, при этом, не отмечалось ни по одному из показателей. Анализ биохимических показателей крови выявил только увеличение уровня билирубина на 15-й день, по сравнению с исходными значениями в обеих группах, а при оценке межгрупповой динамики отмечалось, что на протяжении всего эксперимента группы 1 и 2 не различались между собой ни по одному показателю, кроме содержания мочевины и натрия в крови. Учитывая, что отличия наблюдались в каждой точке измерения (до введения, 15-й и 29-й день), при этом динамика показателей не отличалась между группами, можно сказать, что эти различия обусловлены не действием препаратов, а отображают изначальную разницу в группах. Все это указывает на то, что исследуемые препараты оказали сопоставимое влияние на биохимические показатели крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение профилей безопасности для оригинального препарата ромиплостим и его биоаналога GP40141 как *in vitro*, так и *in vivo*, показало схожие результаты. Для *in vitro* в тесте КЗЦ препараты при добавлении комплемента показали пролиферативную активность, гибели клеток не наблюдалось. На основании данных, полученных в результате *in vivo* исследования, можно заключить, что GP40141 (объект испытаний) и ромиплостим (СО) переносились животными удовлетворительно, не было отмечено отклонений в потреблении пищи, не было зафиксировано отклонений в клиническом статусе и летальных случаев. Введение объекта испытаний и стандартного объекта не приводило к значительному изменению веса и температуры тела экспериментальных животных по сравнению с исходными значениями. Также не отмечалось отличий по показателям мочи и параметрам гемостаза на протяжении всего исследования. Выявленные изменения по гематологическим параметрам носили однонаправленный характер в обеих группах и были связаны с первичной фармакодинамикой GP40141 (объект испытаний) и ромиплостима (СО). Изменения в биохимических параметрах крови также носили однонаправленный характер в обеих группах. По результатам проведенного *in vivo* исследования можно заключить, что токсикологический профиль для препаратов схож и они являются сопоставимыми по профилю безопасности.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ».
Спонсор не оказывал влияние на выбор материала для публикации, анализ и интерпретацию данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Исследование *in vitro* и *in vivo* было организовано ЗАО «Фарм-Холдинг» входит в группу компаний ООО «ГЕРОФАРМ». *In vitro* исследование проводилось в ЗАО «Фарм-Холдинг» по договору финансирования ООО «ГЕРОФАРМ». *In vivo* исследование проводилось в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» по договору финансирования ООО «ГЕРОФАРМ».
Производителем препарата GP40141 биоаналога ромиплостима является ООО «ГЕРОФАРМ».

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Н. Афанасьева – написание и редактирование текста, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*, проведение исследования *in vitro*; В.Б. Сапарова – разработка дизайна исследования *in vitro*, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*, редактирование текста; Д.Д. Карал-Оглы – проведение исследования *in vivo*, редактирование текста; Е.И. Мухаметзянова – проведение исследования *in vivo*; Д.В. Куркин – интерпретация результатов исследования *in vitro* и *in vivo*, утверждение текста; А.В. Калатанова – разработка дизайна исследования *in vivo*, интерпретация результатов *in vivo*; И.Е. Макаренко – разработка дизайна исследования, критический пересмотр содержания статьи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; А.Л. Хохлов – интерпретация результатов исследования *in vitro* и *in vivo*, утверждение текста; И.А. Луговик – разработка дизайна исследования *in vivo*, написание и редактирование текста *in vivo*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Kuter D.J., Newland A., Chong B.H., Rodeghiero F., Romero M.T., Pabinger I., Chen Y., Wang K., Mehta B., Eisen M. Romiplostim in adult patients with newly diagnosed or persistent immune thrombocytopenia (ITP) for up to 1 year and in those with chronic ITP for more than 1 year: a subgroup analysis of integrated data from completed romiplostim studies // Br. J. Haematol. – 2019. – Vol. 185, No. 3. – P. 503–513. DOI: 10.1111/bjh.15803
2. Birocchi S., Podda G.M., Manzoni M., Casazza G., Cattaneo M. Thrombopoietin receptor agonists for the treatment of primary immune thrombocytopenia: a meta-analysis and systematic review // Platelets. – 2021. – Vol. 32, No. 2. – P. 216–226. DOI: 10.1080/09537104.2020.1745168
3. Pietras N.M., Pearson-Shaver A.L. Immune Thrombocytopenic Purpura. 2022 May 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2022.
4. Newland A., Godeau B., Priego V., Viallard J.F., López Fernández M.F., Orejudos A., Eisen M. Remission and platelet responses with romiplostim in primary immune thrombocytopenia: final results from a phase 2 study // Br. J. Haematol. – 2016. – Vol. 172, No. 2. – P. 262–273. DOI: 10.1111/bjh.13827
5. Pasquet M., Aladjidi N., Guiton C., Courcoux M.F., Munzer M., Auvrignon A., Lutz P., Ducassou S., Leroy G., Munzer C., Leverger G.; Centre de Référence National des Cytopénies Auto-immunes de l'Enfant (CEREVANCE). Romiplostim in children with chronic immune thrombocytopenia (ITP): the French experience // Br. J. Haematol. – 2014. – Vol. 164, No. 2. – P. 266–271. DOI: 10.1111/bjh.12609
6. Vishnu P., Aboulafia D.M. Long-term safety and efficacy of romiplostim for treatment of immune thrombocytopenia // J. Blood Med. – 2016. – Vol. 7. – P. 99–106. DOI: 10.2147/JBM.S80646.
7. Wolff-Holz E., Tiitso K., Vleminckx C., Weise M. Evolution of the EU Biosimilar Framework: Past and Future // BioDrugs. – 2019. – Vol. 33, No. 6. – P. 621–634. DOI: 10.1007/s40259-019-00377-y
8. Сунцова Е.В., Чиквина И.И., Садовская М.Н., Коцкая Н.Н., Хачатрян Л.А., Байдильдина Д.Д., Калинина И.И., Петрова У.Н., Пшонкин А.В., Лутфуллин И.Я., Лемазина Е.Н., Осипова И.В., Галеева А.В., Наумова О.С., Фисюн И.В., Быкова Г.В., Казарян Г.Р., Масчан А.А., Новичкова Г.А. Применение ромиплостима при впервые выявленной иммунной тромбоцитопении у детей // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2020. – Т. 19, № 1. – С. 18–26. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-18-26
9. Bussel J.B., Soff G., Balduzzi A., Cooper N., Lawrence T., Semple J.W. A Review of Romiplostim Mechanism of Action and Clinical Applicability // Drug Des. Devel. Ther. – 2021. – Vol. 15. – P. 2243–2268. DOI: 10.2147/DDDT.S299591
10. Yang A.S. Development of romiplostim: a novel engineered peptibody // Semin. Hematol. – 2015. – Vol. 52, No. 1. – P. 12–15. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2014.10.007
11. Kuter D.J. Romiplostim // Cancer Treat. Res. – 2011. – Vol. 157. P. 267–288. DOI: 10.1007/978-1-4419-7073-2_16.
12. Bussel J.B., Kuter D.J., George J.N., McMillan R., Aledort L.M., Conklin G.T., Lichtin A.E., Lyons R.M., Nieva J., Wasser J.S., Wiznitzer I., Kelly R., Chen C.F., Nichol J.L. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 355, No. 16. – P. 1672–1681. DOI: 10.1056/NEJMoa054626. Erratum in: N Engl J Med. – 2006. – Vol. 355, No. 19. – Art. No. 2054.
13. Kuter D.J., Bussel J.B., Lyons R.M., Pullarkat V., Gernsheimer T.B., Senecal F.M., Aledort L.M., George J.N., Kessler C.M., Sanz M.A., Liebman H.A., Slovick F.T., de Wolf J.T., Bourgeois E., Guthrie T.H. Jr., Newland A., Wasser J.S., Hamburg S.I., Grande C., Lefrère F., Lichtin A.E., Tarantino M.D., Terebelo H.R., Viallard J.F., Cuevas F.J., Go R.S., Henry D.H., Redner R.L., Rice L., Schipperus M.R., Guo D.M., Nichol J.L. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial // Lancet. – 2008. – Vol. 371, No. 9610. – P. 395–403. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60203-2
14. Kuter D.J., Rummel M., Boccia R., Macik B.G., Pabinger I., Selleslag D., Rodeghiero F., Chong B.H., Wang X., Berger D.P. Romiplostim or standard of care in patients with immune thrombocytopenia // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 363, No. 20. – P. 1889–1899. DOI: 10.1056/NEJMoa1002625
15. Shirasugi Y., Ando K., Miyazaki K., Tomiyama Y., Okamoto S., Kurokawa M., Kirito K., Yonemura Y., Mori S., Usuki K.,

Iwato K., Hashino S., Wei H., Lizambri R. Romiplostim for the treatment of chronic immune thrombocytopenia in adult Japanese patients: a double-blind, randomized Phase III clinical trial // Int. J. Hematol. – 2011. – Vol. 94, No. 1. – P. 71–80. DOI: 10.1007/s12185-011-0886-8.

16. Beck A., Reichert J.M. Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies // MAbs. 2011. – Vol. 3, No. 5. – P. 415–416. DOI: 10.4161/mabs.3.5.17334
17. Czajkowsky D.M., Hu J., Shao Z., Pleass R.J. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives // EMBO Mol. Med. – 2012. – Vol. 4, No. 10. – P. 1015–1028. DOI: 10.1002/emmm.201201379
18. Lee C.H., Delidakis G. Engineering IgG1 Fc Domains That Activate the Complement System // Methods Mol. Biol. – 2022. – Vol. 2421. – P. 187–200. DOI: 10.1007/978-1-0716-1944-5_13
19. Sommarhem A. Resistance mechanisms of non-Hodgkin lymphomas against Rituximab treatment. Helsinki: University of Helsinki, 2007.
20. Amoroso A., Hafsi S., Militello L., Russo A.E., Soua Z., Mazzarino M.C., Stivala F., Libra M. Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy // Front. Biosci. (Landmark Ed). – 2011. – Vol. 16, No. 2. – P. 770–782. DOI: 10.2741/3719
21. Cerny T., Borisch B., Introna M., Johnson P., Rose A.L. Mechanism of action of rituximab // Anticancer Drugs. – 2002. – Vol. 13 (Suppl 2). – P. 3–10. DOI: 10.1097/00001813-200211002-00002
22. Pescovitz M.D. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action // Am. J. Transplant. – 2006. – Vol. 6(5 Pt 1). – P. 859–866. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01288.x
23. Winkler M.T., Bushey R.T., Gottlin E.B., Campa M.J., Guadalupe E.S., Volkheimer A.D., Weinberg J.B., Patz E.F. Jr. Enhanced CDC of B cell chronic lymphocytic leukemia cells mediated by rituximab combined with a novel anti-complement factor H antibody. // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, No. 6. – e0179841. DOI: 10.1371/journal.pone.0179841
24. Pawluczkowycz A.W., Beurskens F.J., Beum P.V., Lindorfer M.A., van de Winkel J.G., Parren P.W., Taylor R.P. Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX // J. Immunol. – 2009. – Vol. 183, No. 1. – P. 749–758. DOI: 10.4049/jimmunol.0900632

АВТОРЫ

Афанасьева Алина Николаевна – младший научный сотрудник, ЗАО «Фарм-Холдинг». ORCID ID: 0000-0002-1443-4294. E-mail: Alina.Afanaseva@geropharm.com

Сапарова Валерия Бяшимовна – руководитель лаборатории фармакологии, ЗАО «Фарм-Холдинг»; научный сотрудник ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8445-1129. E-mail: Valeriya.Saparova@geropharm.com

Карал-Оглы Джина Джинаровна – кандидат биологических наук, заместитель директора по науке, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии». ORCID ID: 0000-0003-3606-1668. E-mail: karal_5@mail.ru

Мухаметзянова Евгения Ильдаровна – научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии». ORCID ID: 0000-0002-1238-7594. E-mail: evg.m89@mail.ru.

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, первый заместитель директора НЦИЛС ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: strannik986@mail.ru

Калатанова Анна Вячеславовна – научный сотрудник, ЗАО «Фарм-Холдинг». ORCID ID: 0000-0003-2623-6014. E-mail: Anna.Kalatanova@geropharm.com

Макаренко Игорь Евгеньевич – кандидат медицинских наук, руководитель медицинского департамента, ЗАО «Фарм-Холдинг»; научный сотрудник ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-2308-0608. E-mail: Igor.Makarenko@geropharm.com

Хохлов Александр Леонидович – академик РАН, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой клинической фармакологии и этики применения лекарств ЮНЕСКО, ректор, ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0032-0341. E-mail: al460935@yandex.ru

Луговик Илья Алексеевич – научный сотрудник, ЗАО «Фарм-Холдинг». ORCID ID: 0000-0003-3840-5049. E-mail: Ilia.Lugovik@geropharm.com

Scientific and Practical Journal
PHARMACY & PHARMACOLOGY

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-371-386

УДК 615.038

СОВРЕМЕННАЯ НАПРАВЛЕННАЯ ПРОТИВОВИРУСНАЯ ТЕРАПИЯ COVID-19: РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЦЕНТРОВОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ФИКСИРОВАННОЙ КОМБИНАЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ НИРМАТРЕЛВИР И РИТОНАВИР

Л.А. Балыкова[1], Н.М. Селезнева[1], Е.И. Горшенина[1], О.И. Шепелева[1], Н.В. Кириченко[2], Е.Н. Симакина[3], К.Б. Колонтарев[4,5], Д.Ю. Пушкарь[4,5], Д.Н. Земсков[1], К.Я. Заславская[1], С.М. Носков[6,7], А.В. Таганов[8], П.А. Белый[4]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», 430005, Россия, г. Саранск, ул. Большевистская, д. 68
[2] Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Ивановская клиническая больница имени Куваевых», 153025, Россия, г. Иваново, ул. Ермака, д. 52/2
[3] Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 1», 214006, Россия, Смоленск, ул. Фрунзе, д. 40
[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1
[5] Городская клиническая больница имени С.И. Спасокукоцкого Департамента здравоохранения города Москвы, 127206, Россия, г. Москва, ул. Вучетича, д. 21
[6] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5
[7] Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 3», 150007, Россия, г. Ярославль, ул. Маяковского, д. 61
[8] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

E-mail: matis87177@yandex.ru

Получена 03.07.2022 После рецензирования 15.08.2022 Принята к печати 30.08.2022

В статье представлены данные открытого двухэтапного многоцентрового исследования по оценке эффективности и безопасности комбинированного препарата (фиксированная комбинация нирматрелвир 300 мг и ритонавир 100 мг) в комплексной терапии у пациентов с COVID-19.
Цель. Оценить безопасность, переносимость и фармакокинетические параметры фиксированной комбинации нирматрелвир 300 мг и ритонавир, 100 мг у здоровых добровольцев, эффективность и безопасность применения препарата в комплексной терапии в сравнении со стандартной терапией у пациентов с COVID-19.
Материал и методы. Открытое двухэтапное многоцентровое клиническое исследование по оценке основных фармакокинетических параметров, безопасности, а также эффективности в отношении COVID-19 лекарственного препарата нирматрелвир 300 мг и ритонавир 100 мг (Скайвира® ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) у взрослой популяции включало 2 этапа. На I этапе оценивалась безопасность, переносимость и фармакокинетические параметры у здоровых добровольцев (старше 18 лет) с целью подтверждения их сопоставимости с литературными данными, известными для набора действующих веществ. На II этапе оценивалась эффективность и безопасность у пациентов

Для цитирования: Л.А. Балыкова, Н.М. Селезнева, Е.И. Горшенина, О.И. Шепелева, Н.В. Кириченко, Е.Н. Симакина, К.Б. Колонтарев, Д.Ю. Пушкарь, Д.Н. Земсков, К.Я. Заславская, С.М. Носков, А.В. Таганов, П.А. Белый. Современная направленная противовирусная терапия COVID-19: результаты многоцентрового клинического исследования эффективности и безопасности фиксированной комбинации, содержащей нирматрелвир и ритонавир. *Фармация и фармакология.* 2022;10(4):. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-

For citation: L.A. Balykova, N.M. Selezneva, E.I. Gorshenina, O.I. Shepeleva, N.V. Kirichenko, E.N. Simakina, K.B. Kolontarev, D.Yu. Pushkar, D.N. Zemskov, K.Ya. Zaslavskaya, S.M. Noskov, A.V. Taganov, P.A. Bely. modern directed antiviral COVID-19 therapy: results of multicenter clinical effectiveness and safety study of fixed nirmatrelvir+ritonavir combination. *Pharmacy & Pharmacology.* 2022;10(4):. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-

с COVID-19. В рамках II этапа в исследовании участвовало 264 пациента (мужчины и женщины в возрасте от 18 до 80 лет), которые были распределены на две группы. Пациенты первой группы (n=132) получали исследуемый препарат (нирматрелвир 300 мг и ритонавир 100 мг) по 1 таблетке 2 раза в день с интервалом 12±2 ч в течение 5 дней в комплексе с патогенетической и симптоматической терапией. Пациенты второй группы (n=132) получали стандартную терапию в соответствии с утвержденными Временными методическими рекомендациями по профилактике и лечению новой коронавирусной инфекции, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации (Версия 15 от 22.02.2022).

Результаты. За время исследования ни у одного пациента из группы (нирматрелвир + ритонавир) не наблюдалось перехода течения COVID-19 в более тяжелую степень в отличие от пациентов группы стандартной терапии. Среди участников исследования были пациенты с сопутствующими заболеваниями (68% от общей популяции), с факторами риска прогрессирования COVID-19 до тяжелого течения и риска госпитализации (75% от общей популяции). В группе исследуемого препарата не было ни одного случая перехода COVID-19 в более тяжелую степень течения. К 6-му дню в группе (нирматрелвир + ритонавир) доля пациентов, достигших полного выздоровления, была больше в 2 раза и составляла 35,61% (p=0,0001), а доля пациентов с отрицательным анализом РНК к SARS-CoV-2 была на 20% выше, чем у группы сравнения и составила 82,58% (p=0,0001). Терапия фиксированной комбинацией (нирматрелвир + ритонавир) характеризуется благоприятным профилем безопасности, сопоставимым со стандартной терапией. Выявленные нежелательные реакции носили транзиторный характер и не требовали отмены терапии или изменения схемы лечения.

Заключение. Фиксированная комбинация (нирматрелвир + ритонавир) характеризуется благоприятным профилем безопасности у пациентов с COVID-19, сопоставимым со стандартной терапией. Полученные данные свидетельствуют о клинической и фармакоэкономической целесообразности включения фиксированной комбинации нирматрелвира с ритонавиром в схему лечения COVID-19.

Ключевые слова: коронавирус; COVID-19; нирматрелвир; ритонавир; Скайвира®; нежелательные явления

Список сокращений: РДС – респираторный дистресс-синдром; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США); САД – систолическое артериальное давление; EMA – Европейское агентство лекарственных средств; НЯ – нежелательное явление; ДАД – диастолическое артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЧДД – частота дыхательных движений; ИМТ – индекс массы тела; СНЯ – серьёзные нежелательные явления; ВМР – Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции»; СЗ – сопутствующие заболевания; МАНК – метод амплификации нуклеиновых кислот; НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты; АЛТ – аланинаминотрансферазы; АСТ – аспартатаминотрансфераза; ВГН – верхняя граница нормы; MedDRA – медицинский словарь терминов международной медицинской терминологии; EPIC-HR – оценка ингибирования протеазы при COVID-19 у пациентов с высоким риском; ДИ – доверительный интервал; SARS-CoV-2 – коронавирус, возбудитель COVID-19; COVID-19 – коронавирусная инфекция; КИ – клинические исследования; IWRS – модуль рандомизации пациентов.

MODERN DIRECTED ANTIVIRAL COVID-19 THERAPY: RESULTS OF MULTICENTER CLINICAL EFFECTIVENESS AND SAFETY STUDY OF FIXED NIRMATRELVIR+RITONAVIR COMBINATION

L.A. Balykova[1], N.M. Selezneva[1], E.I. Gorshenina[1], O.I. Shepeleva[1], N.V. Kirichenko[2], E.N. Simakina[3], K.B. Kolontarev[4,5], D.Yu. Pushkar[4,5], D.N. Zemskov[1], K.Ya. Zaslavskaya[1], S.M. Noskov[6,7], A.V. Taganov[8], P.A. Bely[4]

[1] National Research Ogarev Mordovia State University,
68, Bol'shevistskaya Str., Saransk, Republic of Mordovia, Russia, 430005
[2] Ivanovo Clinical Hospital named after the Kuvaevs,
Bld. 2, 52, Ermak Str., Ivanovo, Russia, 153025
[3] Smolensk clinical hospital No. 1,
40, Frunze Str., Smolensk, Russia, 214006
[4] Evdokimov Moscow State Medical and Dental University,
Bld. 1, 20, Delegatskaya Str., Moscow, Russia, 127473
[5] Spasokukotsky City Clinical Hospital,
21, Vuchetich Str., Moscow, Russia, 127206
[6] Yaroslavl State Medical University,
5, Revolutionary Str., Yaroslavl, Russia, 150000
[7] Clinical Hospital No. 3,
61, Mayakovsky Str., Yaroslavl, Russia, 150007
[8] Peoples' Friendship University of Russia,
6, Miklukho-Maklay Str., Moscow, Russia, 117198

E-mail: matis87177@yandex.ru

Received 03 Jule 2022 After peer review 15 Aug 2022 Accepted 30 Aug 2022

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-371-386

The article presents the data from an open, two-stage, multicenter study on the efficacy and safety evaluation of a combined drug (a fixed combination of nirmatrelvir 300 mg, and ritonavir 100 mg) in the complex therapy in COVID-19 patients.
The aim of the study was to assess the safety, tolerability and pharmacokinetic parameters of the fixed combination of nirmatrelvir 300 mg and ritonavir 100 mg in healthy volunteers, the efficacy and safety assessment of the drug in the combination therapy compared with the standard therapy in COVID-19 patients.
Material and methods. An open two-stage multicenter clinical study to assess the main pharmacokinetic parameters, safety, and efficacy against COVID-19 of the drug nirmatrelvir 300 mg and ritonavir 100 mg combination (Skyvira® PROMOMED RUS LLC, Russia) in the adult population, included 2 stages. At stage 1, safety, tolerability and pharmacokinetic parameters were evaluated in healthy volunteers (over 18 years of age) in order to confirm their comparability with the literature data known for a set of active substances. Phase 2 assessed efficacy and safety in COVID-19 patients. As a part of the second stage, the study involved 264 patients (men and women aged 18 to 80 years), who had been divided into two groups. The first group patients (n=132) received the study drugs (nirmatrelvir 300 mg and ritonavir 100 mg) – 1 tablet twice a day with an interval of 12±2 hours for 5 days in combination with pathogenetic and symptomatic therapy. The second group patients (n=132) received standard therapy in accordance with the approved Temporary Guidelines for the Prevention and Treatment of Novel Coronavirus Infection (Version 15 dated February 22, 2022).
Results. During the study, none of the patients from the (nirmatrelvir + ritonavir) group experienced a transition of the COVID-19 course to a heavier severity level, in contrast to the patients in the standard therapy group. The study participants included patients with comorbidities (68% of the general population), with risk factors for COVID-19 progression to a heavier severity level and the risk of hospitalization (75% of the general population). There were no cases of COVID-19 progression to a heavier severity level in the study drug group. By the 6th day, in the nirmatrelvir + ritonavir group, the proportion of the patients who had achieved a complete recovery was twice more and amounted to 35.61% (p=0.0001), and the proportion of the patients with a negative RNA analysis to SARS-CoV-2 was 20% higher than in the comparison group, and amounted to 82.58% (p=0.0001). The fixed nirmatrelvir + ritonavir combination therapy has a favorable safety profile comparable to the standard therapy. The identified adverse reactions were transient in nature and did not require discontinuation of therapy or changes in the treatment regimen.
Conclusion. The fixed nirmatrelvir + ritonavir combination has a favorable safety profile in COVID-19 patients, comparable to the standard therapy. The data obtained demonstrate a clinical and pharmacoeconomic feasibility of including the fixed (nirmatrelvir + ritonavir) combination in the COVID-19 treatment regimen.
Keywords: coronavirus; COVID-19; nirmatrelvir; ritonavir; Skyvira®; adverse events
Abbreviations: RDS – respiratory distress syndrome; WHO – World Health Organization; FDA – Food and Drug Administration (USA); SBP – systolic blood pressure; EMA – European Medicines Agency; AE – adverse event; DBP – diastolic blood pressure; HR – heart rate; RR – respiratory rate; BMI – body mass index; SAE – serious adverse events; IG – Interim Guidelines "Prevention, diagnosis and treatment of a new coronavirus infection"; Cmbs – comorbidities; NAAT – nucleic acid amplification test; NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs; ALT – alanine aminotransferase; AST – aspartate aminotransferase; ULN – upper limit of normal; MedDRA (Medical Dictionary for Regulatory Activities) – medical dictionary of terms of international medical terminology; EPIC-HR (Evaluation of Protease Inhibition for Covid-19 in High-Risk Patients) – assessment of protease inhibition in COVID-19 in patients at high risk; CI – confidence interval; SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus; COVID-19 – CoronaVIrus Disease 2019; CTs – clinical trials; IWRS – Interactive web randomization system.

ВВЕДЕНИЕ

COVID-19 может протекать по нескольким сценариям – от бессимптомного носительства до пневмонии различной степени тяжести с развитием острого респираторного дистресс-синдрома (РДС). Несмотря на мнимое «ослабление» новых вариантов SARS-CoV-2, медицинское сообщество пришло к консолидированному мнению, что без направленной противовирусной терапии и вакцинации, пандемия COVID-19 может «приблизиться» к масштабам чумы 1894 года (12 миллионов смертей) и пандемии гриппа A (H1N1) 1918 года (50 миллионов смертей) [1].

На сегодняшний день распространение коронавирусной болезни (COVID-19) по-прежнему не удаётся остановить (число подтвержденных случаев и летальных исходов продолжает расти). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сообщила о выявлении заболевших в 216 различных странах, что диктует необходимость поиска новых стратегий лечения, способных противостоять пандемии [2, 3].

Беспрецедентное глобальное распространение SARS-CoV-2 создало серьезные проблемы для системы здравоохранения. Мировое исследовательское сообщество призывает к разработке эффективных протоколов лечения с включением новых лекарств, отличающихся высоким профилем эффективности и безопасности, способных существенно повлиять на сдерживание и ликвидацию пандемии COVID-19 [3, 4].

В настоящее время, наряду со стандартной поддерживающей терапией, терапевтические подходы к лечению COVID-19 включают использование препаратов, которые оказывают воздействие на жизненный цикл SARS-CoV-2 и блокируют репликацию вируса. На данный момент наиболее перспективным, по мнению медицинского сообщества, является комбинация нирматрелвир с ритонавиром. Установлено, что нирматрелвир (PF-07321332) останавливает распространение COVID-19 на животных моделях, а ритонавир замедляет его метаболизм и способствует поддержанию терапевтической концентрации в плазме крови. Несмотря на частые мутации в геноме SARS-CoV-2, нирматрелвир проявляет эффективное противовирусное действие в отношении недавних мутаций и вариантов коронавируса [5].

Все коронавирусы, включая SARS-CoV-2, кодируют две протеазы, необходимые для процессинга полипротеинов PP1A и PP1AB. Основная протеаза 3CL (хемотрипсиноподобная) дает начало образованию белков NSP11/16. Протеаза 3CL была выбрана в качестве одной из возможных терапевтических мишеней для разработки противовирусных препаратов против SARS-CoV-2 из-за ее высококонсервативной последовательности и структуры. Нирматрелвир (PF-00835231) обладает высокой ингибирующей активностью именно в отношении данной протеазы. Противовирусная активность препарата была выявлена еще во время эпидемии SARS-CoV-1 [6, 7].

В дальнейшем была продемонстрирована высокая противовирусная активность комбинации нирматрелвира с ритонавиром в отношении SARS-CoV-2 [8]. Фармакокинетические исследования продемонстрировали значительное усиление системного воздействия нирматрелвира при совместном применении с ингибитором CYP3A4 ритонавиром, что согласуется с преобладающей ролью CYP3A4 в метаболизме нирматрелвира [9, 10].

Далее в ряде клинических исследований была подтверждена эффективность комбинации нирматрелвир + ритонавир, которая продемонстрировала большее снижение риска госпитализации и смерти, чем молнупиравир по сравнению с плацебо. Оба препарата назначались в первые пять дней после появления симптомов [11, 12].

В исследовании EPIC-HR применение комбинации нирматрелвир + ритонавир у пациентов с коронавирусной инфекцией приводило к снижению госпитализации или смертности на 88% среди непривитых амбулаторных пациентов с ранней формой COVID-19. Общий риск госпитализации был на 45% ниже среди пациентов, которым назначали нирматрелвир + ритонавир [13]. Промежуточный анализ продемонстрировал снижение риска госпитализации или смерти по любой причине, связанной с COVID-19, на 89% по сравнению с плацебо у пациентов, начавших лечение в течение трех дней после появления симптомов (первичная конечная точка) [14].

В двойном слепом (рандомизированном) исследовании, не вакцинированным и не госпитализированным взрослым пациентам с высоким риском прогрессирования COVID-19 до тяжелого течения, был назначен нирматрелвир (300 мг) плюс ритонавир (100 мг) каждые 12 часов в течение 5 дней [15–16]. Основная цель исследования заключалась в оценке эффективности комбинации нирматрелвир + ритонавир путем сравнения процента пациентов с госпитализацией или смертью по любой причине, связанной с COVID-19, в течение 28 дней в двух группах.

Всего было рандомизировано 2246 пациентов; 1120 пациентов получали нирматрелвир + ритонавир (группа нирматрелвира) и 1126 пациентов получали плацебо (группа плацебо). Частота госпитализаций или смертей, связанных с COVID-19, к 28 дню в группе нирматрелвира была ниже, чем в группе плацебо на 6,32% (95% доверительный интервал (ДИ), от –9,04 до –3,59; p <0,001; снижение относительного риска госпитализации – 89,1%). Все 13 смертей произошли в группе плацебо.

Частота нежелательных явлений (НЯ), была одинаковой в двух группах (любое НЯ: группа нирматрелвир плюс ритонавир/группа плацебо –22,6%/23,9%; серьезные НЯ – 1,6%/6,6%; НЯ, приводящие к отмене препаратов –2,1%/4,2%). Дисгевзия (5,6% против 0,3%) и диарея (3,1% против 1,6%) чаще возникали при применении нирматрелвира в сочетании с ритонавиром, чем при применении плацебо. Лечение нирматрелвиром в сочетании с ритонавиром приводило к снижению риска прогрессирования до тяжелой формы COVID-19 на 89% по сравнению с плацебо и характеризовалось благоприятным профилем безопасности [15–18].

В исследовании Najjar-Debbiny R. и соавт. (2022), также доказано, что в «эпоху омикрон», нирматрелвир в сочетании с ритонавиром очень эффективно снижал риски тяжелого течения COVID-19 и/или смертности [19].

Важно отметить, что основная мишень (3CL) практически не поддаётся мутациям и модификациям, в связи с чем нирматрелвир в комбинации с ритонавиром будет эффективен вне зависимости от штаммов SARS-CoV-2, что было также доказано в ряде исследований [20, 21].

Комбинация (нирматрелвир/ритонавир) получила условное одобрение на применение в декабре 2021 года в Соединенном Королевстве Великобритании для лечения у взрослых с высоким риском прогрессирования до тяжелой формы COVID-19, которым не требуется дополнительный кислород. В январе 2022 г. комбинация нирматрелвир + ритонавир получила разрешение в Европейском союзе для использования у взрослых и детей с 12-ти лет по одному и тому же показанию, а также разрешена для экстренного применения в США [22, 23].

В связи с быстрым распространением варианта вируса Omicron SARS-CoV-2 по всему миру, Food and Drug Administration (FDA, США) выдало разрешение на экстренное использование комбинации нирматрелвир + ритонавир для амбулаторного лечения пациентов с COVID-19 легкой и средней степени тяжести, которые подвержены риску прогрессирования [15, 24–25]. Нирматрелвир включён в руководство ВОЗ для лечения COVID-19 [26].

ЦЕЛЬ. Оценка безопасности, переносимости и фармакокинетических параметров комбинированного препарата (нирматрелвир + ритонавир) у здоровых добровольцев и оценка эффективности и безопасности применения препарата в комплексной терапии COVID-19 в сравнении со стандартной терапией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено открытое двухэтапное многоцентровое исследование по оценке основных фармакокинетических параметров и безопасности, а также оценке эффективности в отношении COVID-19 лекарственного препарата Скайвира® (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) у взрослой популяции.

Данное исследование проводилось с целью регистрации препарата в РФ и включало в себя оценку основных фармакокинетических параметров, безопасности, а также эффективности в отношении COVID-19[1].

В настоящем исследовании было предусмотрено 2 этапа. На I этапе оценивалась безопасность, переносимость и фармакокинетические параметры препарата у здоровых добровольцев (n=16), на II этапе оценивалась эффективность и безопасность применения препарата у пациентов с COVID-19.

Исследование проведено в соответствии с принципами надлежащей клинической практики с 17.02.2021 г. по 01.06.2022 г. в 8 городах РФ (Москва, Саранск, Киров, Иваново, Смоленск, Санкт-Петербург, Рязань, Ярославль), на базе 12 лечебных учреждений, занимающихся лечением пациентов с новой коронавирусной инфекцией.

Исследовательские центры I этапа клинического исследования:

1. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 3» (г. Ярославль);
2. Аналитическая лаборатория: ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (г. Москва).

Исследовательские центры II этапа клинического исследования:

1. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 3» (г. Ярославль);
2. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени С.И. Спасокукоцкого Департамента здравоохранения города Москвы» (г. Москва);
3. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Саранск);
4. Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 1» (г. Смоленск);
5. Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Ивановская клиническая больница имени Куваевых» (г. Иваново);
6. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Рязань);
7. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Киров);
8. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Смоленск);
9. Общество с ограниченной ответственностью «Аврора МедФорт» (г. Санкт-Петербург);
10. Общество с ограниченной ответственностью «Госпиталь ОрКли» (г. Санкт-Петербург);
11. Общество с ограниченной ответственностью «Уромед» (г. Смоленск).

Задачи исследования

I этап исследования предусматривал нерандомизированный когортный дизайн. Все добровольцы проходили скрининг, а далее госпитализировались покогортно (добровольцы 2 когорты приглашались на госпитализацию после завершения участия в исследовании добровольцев 1 когорты при условии одобрения дальнейшего проведения исследования Экспертным советом по лекарственной безопасности).

На данном этапе исследования у здоровых добровольцев после применения фиксированной комбинации (нирматрелвир + ритонавир) оценивали: переносимость препарата, основные жизненно важные показатели, данные физикального осмотра, ЭКГ, лабораторные показатели (клинический анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи) и частоту и степень тяжести НЯ, а также изучали фармакокинетические параметры действующих веществ (нирматрелвир + ритонавир) после однократного и многократного применения лекарственного препарата.

[1] Открытое двухэтапное многоцентровое исследование по оценке основных фармакокинетических параметров, безопасности, а также эффективности в отношении COVID-19 лекарственного препарата Скайвира® (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) у взрослой популяции, таблетки, покрытые пленочной оболочкой (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия). Спонсор исследования: ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия. Протокол исследования: № NR-012022.Фаза клинической разработки: I–III фаза. I этап – открытое несравнительное когортное. II этап – открытое рандомизированное многоцентровое сравнительное. Даты проведения исследования: 17.02.2021 г. – 01.06.2022 г. Контрактная исследовательская организация: ООО «СОЛЮР-ФАРМ», 121108, г. Москва, ул. Ивана Франко, д. 4, корп. 2, эт. 3, помещение 1, офис 2.

Критерии включения для I этапа:

1. Наличие подписанной и датированной формы информированного согласия, а также способность и желание выполнять все предписания протокола исследования;
2. Мужчины в возрасте от 18 до 45 лет включительно на момент подписания формы информированного согласия;
3. Верифицированный диагноз «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования;
4. Гемодинамические показатели: систолическое артериальное давление (САД) 100–130 мм рт. ст., диастолическое артериальное давление (ДАД) 60–85 мм рт. ст., частота сердечных сокращений (ЧСС) 60–90 уд/мин, частота дыхательных движений (ЧДД) 16–20 в мин;
5. Отрицательные результаты анализов на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), сифилис, гепатит В (HbsAg) и гепатит С (HCV);
6. Отрицательные результаты тестов на употребление алкоголя, наркотических средств и психотропных веществ.
7. Индекс массы тела (ИМТ): 18,5–30 кг/м^2;
8. Готовность отказаться от употребления алкоголя в течение 72 часов до скрининга и в течение периода исследования;
9. Согласие добровольца на использование надежных методов контрацепции в период исследования, в течение 3 недель после его окончания.

Критерии невключения для I этапа:

1. Отягощенный аллергологический анамнез, лекарственная непереносимость. Гиперчувствительность к компонентам исследуемого препарата;
2. Дефицит лактазы, непереносимость лактозы, глюкозо-галактозная мальабсорбция;
3. Невозможность установки венозного катетера для отбора образцов крови;
4. Затруднения при проглатывании таблеток;
5. Донорская сдача или потеря крови (≥450 мл крови или плазмы) менее чем за 3 месяца до скрининга;
6. Острые и хронические заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, эндокринной и нервной системы, в том числе органические заболевания центральной нервной системы (ЦНС), а также заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), печени, почек, крови;
7. Любые отклонения от нормальных значений при лабораторном и/или инструментальном обследовании.
8. Хирургические вмешательства на ЖКТ (за исключением аппендэктомии) в анамнезе;
9. Острые инфекционные заболевания или симптомы ОРВИ менее чем за 4 недели до визита скрининга;
10. Выявление РНК SARS-CoV-2 или антигена SARS-CoV-2 в течение 6 месяцев до скрининга;
11. Наличие как минимум одного из эпидемических признаков:
   - возвращение из зарубежной поездки за 14 дней до скрининга и отсутствие результатов анализа на выявление РНК SARS-CoV-2 или антигена SARS-CoV-2;
   - наличие тесных контактов за последние 14 дней до скрининга с лицом, находящимся под наблюдением по COVID-19, который в последующем заболел;
   - наличие тесных контактов за последние 14 дней до скрининга с лицом, у которого лабораторно подтвержден диагноз COVID-19;
   - наличие профессиональных контактов за последние 14 дней до скрининга с лицами, у которых выявлен подозрительный или подтвержденный случай заболевания COVID-19.
12. Регулярный прием лекарственных препаратов, включая растительные и гомеопатические препараты, витаминов и/или биологически активных добавок (БАД) менее чем за 4 недели до визита скрининга;
13. Прием лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику и/или функцию печени (барбитураты, омепразол, циметидин и т.д.) менее чем за 2 месяца до визита скрининга;
14. Особая диета (например, вегетарианская, с ограничением употребления поваренной соли) менее чем за 2 месяца до визита скрининга;
15. Особый образ жизни (работа в ночное время, экстремальные физические нагрузки) менее чем за 2 месяца до визита скрининга;
16. Прием в анамнезе более чем 10 ед. алкоголя в неделю (1 ед. алкоголя эквивалентна 500 мл пива, 200 мл вина или 50 мл крепких спиртных напитков) или анамнестические сведения/данные об алкоголизме, наркомании, злоупотреблении лекарственными препаратами;
17. Курение более 10 сигарет в сутки на момент визита скрининга;
18. Выполнение процедур пирсинга, нанесение татуажа/тату менее чем за 1 месяц до проведения процедур скрининга и в течение всего исследования;
19. Психические, физические и прочие причины, не позволяющие добровольцу адекватно оценивать свое поведение и правильно выполнять условия Протокола исследования;
20. Участие в другом клиническом исследовании менее чем за 3 месяца до визита скрининга;
21. Другие причины, не позволяющие добровольцу, по мнению врача-исследователя, принять участие в данном исследовании.

Продолжительность I этапа

Общая длительность участия добровольца в исследовании составила не более 11 дней, из которых

DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-371-386

длительность скрининга составила не более 7 дней, длительность пребывания в стационаре – не более 3,5 суток, длительность применения исследуемого препарата – не более 3-х дней.

Оцениваемые показатели безопасности для I этапа:

1. Частота и степень тяжести НЯ, зарегистрированных на основании жалоб, изменения самочувствия добровольцев, по данным отклонений от нормы результатов лабораторных анализов, физикального осмотра, оценки жизненно важных показателей, ЭКГ;
2. Количество случаев досрочного прекращения участия в исследовании из-за развития НЯ и/или СНЯ, в том числе связанных с исследуемым препаратом;
3. Оценка врачом-исследователем общей переносимости исследуемого препарата по шкале Лайкерта.

Способ применения в I этапе

Предполагалось включение 2-х когорт по 8 здоровых добровольцев в каждой: 1 когорта – 300 мг + 100 мг однократно; 2 когорта – 300 мг + 100 мг каждые 12 ч, всего 5 приемов.

Исследование начинали с применения препарата у добровольцев 1 когорты. Прием препарата добровольцами 2 когорты был начат только после оценки безопасности применения препарата у добровольцев 1 когорты.

Решение о возможности перехода к многократному применению препарата в рамках 2 когорты принималось Экспертным советом по лекарственной безопасности на основании оценки НЯ/СНЯ. Переход ко 2 когорте мог быть остановлен в случае выявления в 1 когорте добровольцев, как минимум, одного из следующих критериев остановки: развитие серьезной нежелательной реакции, имеющей возможную, вероятную или определенную связь с применением исследуемого препарата, у ≥1 здоровых добровольцев; развитие нежелательной реакции тяжелой степени выраженности, имеющей возможную, вероятную или определенную связь с применением исследуемого препарата, у ≥2 здоровых добровольцев, независимо от того, относятся они к одному и тому же классу систем-органов или нет.

Рандомизация II этапа исследования

Рандомизацию проводили посредством системы IWRS (Interactive web randomization system), встроенной в электронную индивидуальную регистрационную карту пациента. На II этапе исследования было рандомизировано 264 пациента, которые завершили исследование полностью в соответствии с утвержденным Протоколом.

В группу препарата нирматрелвир + ритонавир (1 группа), было рандомизировано 84 пациента женского пола (63,64%) и 48 пациентов мужского пола (36,36%), в группу стандартной терапии – 82 пациента женского пола (62,12%) и 50 пациентов мужского пола (37,88%). Подгруппа 1-1 (n=33) – без наличия фактора риска развития тяжелого течения COVID-19. Подгруппа 1-2 (n=99) – с наличием как минимум одного фактора риска развития тяжелого течения COVID-19.

Средний возраст пациентов в группе получавших фиксированную комбинацию (нирматрелвир + ритонавир) составил 46,61±15,75 лет (от 19 до 79 лет), средний вес тела оказался равным 80,69±14,31 кг (от 49,0 до 116,0 кг), рост – 170,44±7,78 см (от 152 до 190 см), ИМТ – 27,81±4,89 кг/м^2 (от 18,37 до 40,90 кг/м^2).

Средний возраст пациентов в группе стандартной терапии составил 46,62±15,97 лет (от 18 до 77 лет), средний вес тела оказался равным 79,32±14,57 кг (от 50,0 до 122,0 кг), рост – 170,01±7,74 см (от 148 до 193 см), ИМТ – 27,45±4,81 кг/м^2 (от 17,71 до 43,74 кг/м^2).

Первая группа (n=132) получала исследуемый препарат (нирматрелвир + ритонавир) по 1 таблетке 2 раза в день с интервалом 12±2 часа в течение 5 дней в комплексе с патогенетической и симптоматической терапией, представленной в действующих на момент проведения исследования Временных методических рекомендациях «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции» (ВМР)[2].

Вторая группа (n=132) получала стандартную терапию в соответствии с действующими на момент проведения исследования ВМР[3].

Каждая группа включала 2 подгруппы в зависимости от наличия/отсутствия как минимум одного фактора риска развития тяжелого течения COVID-19 в соотношении 3:1.

Критерии включения для II этапа:

1. Наличие подписанной и датированной пациентом формы информированного согласия;
2. Мужчины и женщины в возрасте от 18 до 80 лет включительно на момент подписания формы информированного согласия;
3. Подтвержденный случай COVID-19 на момент скрининга: положительный результат лабораторного исследования на наличие РНК SARS-CoV-2 с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) или антигена SARS-CoV-2 с применением иммунохроматографического анализа[4];
4. Легкое или среднетяжелое течение инфекции, вызванной SARS-CoV-2;

[2] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), версия 16 (18.08.2022), утв. Минздравом России).

[3] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), версия 15 (22.02.2022), утв. Минздравом России.

[4] Могли быть учтены результаты анализа по определению SARS-CoV-2, полученные в течение не более 5 дней до рандомизации, при наличии подтверждающей документации.

5. Наличие на момент скрининга и рандомизации как минимум одного из следующих симптомов, характерных для COVID-19: заложенность носа или насморк, боль в горле, одышка или затрудненное дыхание при нагрузках, кашель, утомляемость, боль в мышцах или во всем теле, головная боль, озноб, лихорадка (температура тела >38˚С), тошнота, рвота, диарея, потеря обоняния (аносмия), потеря вкусовой чувствительности (агевзия).

6. Начало заболевания (появление первого симптома) не более 5 дней до рандомизации;

7. Пациент согласен и способен принимать пероральные лекарственные препараты;

8. Согласие пациента использовать надежные методы контрацепции на протяжении всего исследования и в течение 3 недель после его окончания;

В исследовании также могли принять участие женщины, неспособные к деторождению (в анамнезе: гистерэктомия, перевязка маточных труб, бесплодие, менопауза более 10 лет), а также мужчины с бесплодием или перенесенной вазэктомией в анамнезе.

Критерии невключения для II этапа:

1. Гиперчувствительность к компонентам исследуемого препарата;

2. Дефицит лактазы, непереносимость лактозы, глюкозо-галактозная мальабсорбция;

3. Применение противовирусных препаратов прямого действия в течение 10 дней до скрининга;

4. Применение на момент скрининга препаратов, клиренс которых сильно зависит от изофермента CYP3A, или которые являются сильными индукторами CYP3A (подробная информация представлена в разделе «Запрещенная терапия»);

5. Потребность в применении препаратов из списка запрещенной терапии;

6. Необходимость оксигенотерапии на момент скрининга;

7. Необходимость госпитализации на момент скрининга или ожидание того, что потребуется госпитализация по поводу COVID-19 в течение 48 ч после рандомизации, за исключением необходимости госпитализации в обсерватор по социальным причинам (например, проживание в общежитии, совместное проживание с людьми, в том числе имеющих факторы риска тяжелого течения COVID-19, у которых после контакта с пациентом отрицательный результат на определение РНК/антигена SARS-CoV-2, и др.);

8. Наличие критериев тяжелого и крайне тяжелого течения заболевания на момент скрининга;

9. Вакцинация в течение менее 4 недель до скрининга;

10. Наличие в течение 6 месяцев до скрининга вероятного или подтвержденного случая COVID-19 среднетяжелого течения;

11. Наличие вероятного или подтвержденного случая COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения в анамнезе;

12. Пациенты с установленным средней и тяжелой почечной недостаточностью (расчетная скорость клубочковой фильтрации (СКФ) <60 мл/мин/1,73м^2 по формуле CKD-EPI) или получающие заместительную почечную терапию на момент скрининга;

13. Тяжелая печеночная недостаточность (класс С по классификации Чайлд-Пью) на момент скрининга или наличие в анамнезе (в течение 6 месяцев до скрининга) уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) и/или аспартатаминотрансферазы (АСТ) ≥2,5 верхней границы нормы (ВГН), и/или общего билирубина ≥2 ВГН (≥3 ВГН при синдроме Жильбера);

14. Положительный результат анализа на наличие ВИЧ, сифилиса, гепатитов В и/или С на скрининге;

15. Алкогольная, фармакологическая и/или наркотическая зависимость в анамнезе и/или на момент скрининга;

16. Шизофрения, шизоаффективное расстройство, биполярное расстройство или другая психическая патология в анамнезе или подозрение на их наличие на момент скрининга;

17. Любые данные анамнеза, которые, по мнению врача-исследователя, могут привести к осложнению интерпретации результатов исследования или создать дополнительный риск для пациента в результате его участия в исследовании;

18. Нежелание или неспособность пациента соблюдать процедуры Протокола (по мнению врача-исследователя);

19. Беременные или кормящие женщины, или женщины, планирующие беременность;

20. Участие в другом клиническом исследовании в течение 3 месяцев до включения в исследование;

21. Прочие условия, которые препятствуют включению пациента в исследование.

Продолжительность II этапа

Общая длительность участия пациента в исследовании составила не более 31 дня (табл. 1).

Критерии оценки безопасности для II этапа:

1. Общее количество НЯ, стратифицированных по тяжести и частоте.

2. Частота нежелательных реакций.

3. Частота СНЯ, в том числе связанных с применением исследуемого препарата/стандартной терапии.

4. Доля пациентов, у которых зарегистрировано как минимум одно НЯ.

5. Доля пациентов, прервавших лечение из-за возникновения НЯ/СНЯ.

Критерии оценки эффективности на II этапе:

Первичный критерий эффективности:

Частота пациентов с переходом течения COVID-19 в более тяжелую степень тяжести по ВМР по сравнению с исходным состоянием к визиту 4 (день 16).

Вторичные критерии эффективности:

1. Динамика клинического статуса по категориальной порядковой шкале клинического улучшения;
2. Частота ухудшения клинического статуса по категориальной порядковой шкале клинического улучшения на ≥1 категорию к визитам 2, 3 и 4;
3. Частота пациентов с категорией 0 по категориальной порядковой шкале клинического улучшения к Визитам 2, 3 и 4;
4. Частота пациентов с отрицательным анализом РНК SARS-CoV-2 к визитам 2, 3 и 4;
5. Оценка выраженности симптомов к визитам 2–6 по шкале оценки основных симптомов COVID-19.

Статистическая обработка результатов исследования

Для статистического анализа использовалось программное обеспечение с валидированными алгоритмами для выполнения статистических анализов и надлежащего документального оформления (StatSoft Statistica 10.0., IBM SPSS Statistics 22 (актуальная версия, лицензия GPL-2/GPL-3).

Описательная статистика представлена для всех собранных в ходе исследования показателей эффективности, безопасности, переносимости, а также фармакокинетических показателей.

Непрерывные (количественные) данные представлены с помощью количества наблюдений, среднего арифметического, 95% доверительного интервала (ДИ) для среднего, стандартного (среднеквадратического) отклонения, медианы, межквартильного размаха (25-го и 75-го центили), минимума и максимума (если не указано иное).

Порядковые, категориальные и качественные данные представлены в виде абсолютных частот (количества наблюдений), относительных частот (процентов) и 95% ДИ (если не указано иное).

Проверка на нормальность распределения проводилась одним из общепринятых методов (критерий Шапиро-Уилка, критерий Колмогорова-Смирнова). В случае не Гауссовского распределения для сравнения показателей использовались непараметрические методы оценки.

Для оценки параметров, представленных порядковыми величинами, использовались непараметрические методы анализа: для сравнения показателей между группами использовался критерий Манна-Уитни, для оценки динамики показателя внутри каждой группы – критерий Фридмана для нескольких зависимых переменных, для сравнения между начальной и конечной точкой внутри каждой группы – критерий Вилкоксона для двух зависимых переменных. Также для анализа могли быть использованы точный тест Фишера или критерий χ^2 («хи-квадрат»), в случае если все ожидаемые значения в ячейках таблицы сопряженности для данного анализа составляли 5 и более.

Для сравнения между группами непрерывных количественных показателей использовался t-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни (в зависимости от принятого заключения о характере распределения), а между начальной и конечной точкой оценки внутри каждой группы – парный t-критерий или критерий Вилкоксона для двух зависимых переменных (в зависимости от принятого заключения о характере распределения).

В случае оценки времени до события (time-to-event) с учетом цензурированных наблюдений в качестве описательных методов анализа могли быть использованы метод Каплан-Мейера и построение таблиц дожития, для сравнительной оценки времени между исследуемыми группами могли быть использованы критерий Гехана-Вилкоксона, критерий Кокса-Ментела или Лог-ранговый критерий.

Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Уровни значимости и доверительные интервалы рассчитывали как двусторонние, статистическая значимость различий являлась по умолчанию двусторонней и относилась к уровню значимости 0,05 (если не указано иное).

Для I и II этапа исследования демографические данные (возраст, пол), данные исходного состояния представлены в виде абсолютных частот (количества наблюдений), относительных частот (процентов) или при помощи среднего арифметического, 95% ДИ для среднего, стандартного (среднеквадратического) отклонения, медианы, межквартильного размаха (25-го и 75-го центили), минимума и максимума в зависимости от типа переменной.

На II этапе для проверки гипотезы об однородности групп исследования проведено тестирование нулевых гипотез (об отсутствии различий между группами) при помощи t-критерия Стьюдента (для интервальных показателей с нормальным распределением в исследуемой популяции), критерия Манна-Уитни (для ординальных показателей или для интервальных показателей с распределением, отличающимся от нормального) или точный критерий Фишера и критерия χ^2 (для качественных признаков).

В случае нахождения статистически значимых различий между группами производилась оценка величины различий между группами исследования при помощи ДИ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты I этапа исследования

В рамках первого этапа исследования была первично подтверждена безопасность исследуемой комбинации и изучен ее фармакокинетический профиль (Рис. 1, 2).

Таблица 1 – График визитов пациентов II этапа исследования

№ визита	Интервал (часы/дни)	Статус исследования
0	не более 48 ч	скрининг
1	1 день *	рандомизация
2	6–7 день	–
3	11–12 день	–
4	14–15день**	–
5	21±1 день**	–
6	28±1 день**	завершение

Примечание: * – визит 1 мог совпадать с визитом 0. Если визит 1 и визит 0 совпадали, то физикальный осмотр, оценка жизненно важных показателей, регистрация сопутствующей терапии, пульсоксиметрия с измерением SpO_2, оценка выраженности симптомов по шкале симптомов COVID-19 повторно не проводились, оценка критериев включения и невключения проводилась непосредственно перед рандомизацией, а критерии исключения оценивались после применения препарата. ** – визит мог быть проведен как очно, так и посредством телефонного звонка. В случае проведения визита посредством телефонного звонка и при наличии положительного анализа РНК SARS-CoV-2 на предыдущем визите, осуществлялся выезд медицинского персонала для отбора мазка из носоглотки и/или ротоглотки для проведения анализа РНК SARS-CoV-2.

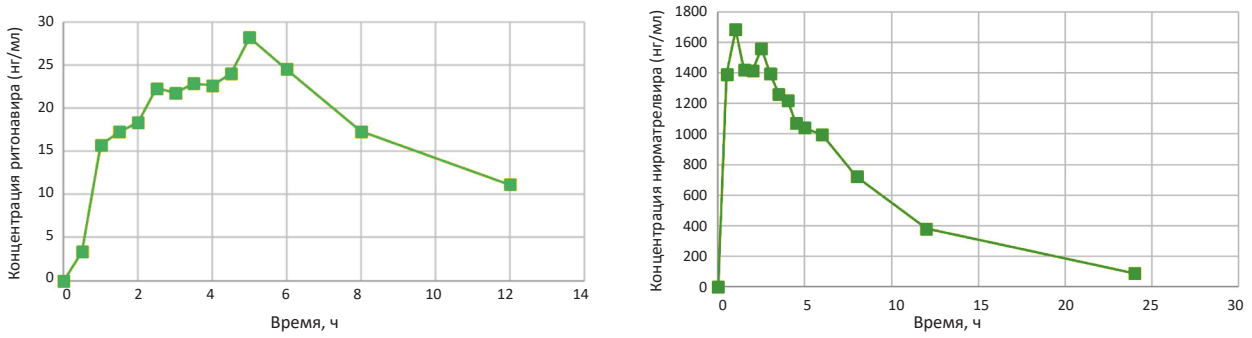
Таблица 2 – Факторы риска у пациентов в группе исследуемого препарата и стандартной терапии

Факторы риска	Основная группа (n=132)	Группа сравнения (n=132)
ИМТ 30 и более кг/м2	36,36%	37,12%
заболевания сердца	31,06%	30,30%
возраст более 60 лет	22,73%	21,97%
хронические заболевания почек	3,03%	6,82%
хронические заболевания легких	2,27%	6,82%
сахарный диабет	0,76%	1,52%
активное злокачественное новообразование	0,76%	–

Таблица 3 – Анализ частоты нежелательных реакций по классификации ВОЗ связанные с приемом комбинации нирматрелвир + ритонавир

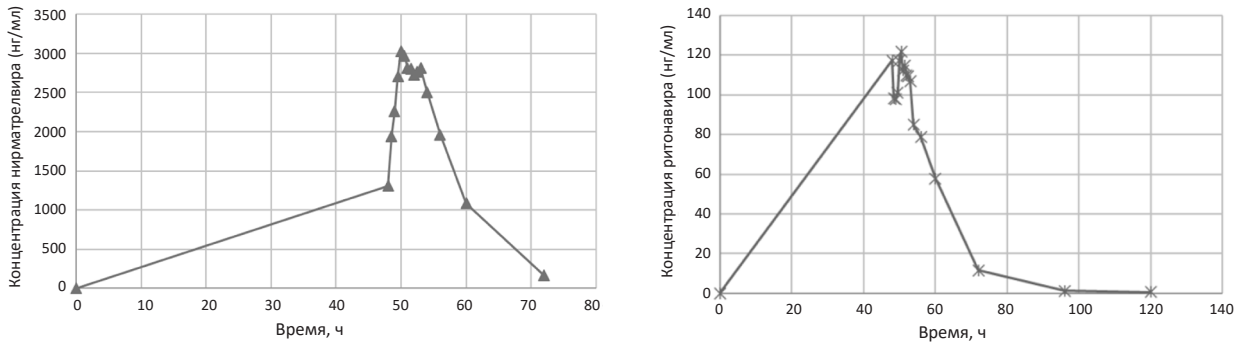
Системно-органный класс и предпочтительный термин MedDRA	Количество событий (абс/%)		Значение p (критерий Фишера)
	Нирматрелвир + ритонавир (n=132)	Стандартная терапия (n=132)	
Желудочно-кишечные нарушения			
Диарея	1 (0,8%) (нечастые)	1 (0,8%) (нечастые)	1,0000
Сухость во рту	1 (0,8%) (нечастые)	Не наблюдалось	1,0000
Тошнота	Не наблюдалось	2 (1,5%) (частые)	0,4981
Лабораторные и инструментальные данные			
Повышение уровня АЛТ	3 (2,3%) (частые)	2 (1,5%) (частые)	1,0000
Повышение уровня АСТ	3 (2,3%) (частые)	2 (1,5%) (частые)	1,0000
Нарушения со стороны кожи и подкожной клетчатки			
Эритема	Не наблюдалось	1 (0,8%) (нечастые)	1,0000
Нарушения со стороны нервной системы			
Дисгевзия	3 (2,3%) (частые)	Не наблюдалось	0,2472

Примечание: Частота встречаемости нежелательных реакций определяется следующим образом: очень часто (≥1/10), часто (≥1/100, но <1/10), нечасто (≥1/1000, но <1/100), редко (≥1/10 000, но <1/1000), очень редко (<1/10 000), неизвестно (не может быть установлена на основании имеющихся данных). АЛТ – аланинаминотрансферазы, АСТ – аспартатаминотрансфераза.



а) б)

Рисунок 1 – Фармакокинетический профиль усредненных значений концентраций нирматрелвира а) и ритонавира б) во времени (в линейном преобразовании) после однократного приема исследуемого препарата



а) б)

Рисунок 2 – Фармакокинетический профиль усредненных значений концентраций нирматрелвира а) и ритонавира б) во времени (в линейном преобразовании) после многократного приема исследуемого препарата

В ходе проведения I этапа исследования была показана сопоставимость основных фармакокинетических параметров изучаемой фиксированной комбинации с литературными данными [8, 9, 16] как по нирматрелвиру, так и по ритонавиру, причем как при однократном, так и при многократном введении.

Нирматрелвир

Когорта 1 (однократное введение): значение медианы времени достижения максимальной концентрации (C_{max} = 1988,92±1109,65 нг/мл) нирматрелвира составило T_{max} = 1,75 часа. Нирматрелвир элиминировался из плазмы крови со средним значением $T_{1/2}$ = 5,80±1,96 ч. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} составили 15354,88±6258,84 нг×ч/мл и 13105,22±5656,34 нг×ч/мл соответственно. Общий клиренс (Cl) – 23,18±11,21 л/ч. Объем распределения лекарственного средства соответствовал значению V_d = 189,08±98,03 л. Значение среднего времени удержания лекарственного вещества в плазме крови составило MRT = 8,82±3,00 ч.

Когорта 2 (многократное введение): значение максимальной концентрации нирматрелвира в плазме крови добровольцев составило $C_{max,\ ma}$ = 3442,52±1078,88 нг/мл. Значение минимальной концентрации нирматрелвира в плазме крови добровольцев составило $C_{min,\ ma}$ = 246,30±174,85 нг/мл. Значение $AUC_{48-\tau}$ составило 33334,03±9770,52 нг×ч/мл.

Ритонавир

Когорта 1 (однократное введение): значение медианы времени достижения максимальной концентрации (C_{max} = 25,74±20,98 нг/мл) ритонавира составило T_{max} = 5 часов. Ритонавир элиминировался из плазмы крови со средним значением $T_{1/2}$ = 8,13±3,08 ч. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} составили 652,80±264,85 нг×ч/мл и 183,89±206,42 нг×ч/мл соответственно. Общий клиренс (Cl) – 173,84±78,32 л/ч. Объем распределения лекарственного средства соответствует значению V_d = 1991,30±1049,61 л. Значение среднего времени удержания лекарственного вещества в плазме крови составило MRT = 13,39±4,12 ч.

Когорта 1 (многократное введение): значение максимальной концентрации ритонавира в плазме крови добровольцев составило $C_{max,\ ma}$ = 148,15± 92,80 нг/мл. Значение минимальной концентрации ритонавира в плазме крови добровольцев составило $C_{min,\ ma}$ = 16,78±9,48 нг/мл. Значение $AUC_{48-\tau}$ составило 1542,89±1207,18 нг×ч/мл.

Поскольку результаты I этапа клинических исследований (КИ) показали благоприятный профиль безопасности и хорошую переносимость

при однократном и многократном пероральном приеме комбинации в виде таблеток, покрытых пленочной оболочкой (нирматрелвир 300 мг и ритонавир 100 мг), в ходе I этапа исследования не было выявлено критериев остановки КИ, а также была продемонстрирована сопоставимость полученных фармакокинетических данных для нирматрелвира и ритонавира с имеющимися литературными данными. Этический комитет Минздрава России[5] счел возможным переход ко второму этапу исследования. Стоит отметить, что полученные данные подтверждают возможность и целесообразность объединения действующих веществ в форму фиксированной комбинации, что снижает полипрагмазию и повышает удобство применения для пациентов.

Результаты II этапа исследования

У 182 из 264 пациентов (68,94%) были выявлены сопутствующие заболевания, классифицированные по MedDRA.

Наиболее частотными сопутствующими заболеваниями (СЗ) были ожирение (36,32%) и гипертензия (32,48%), заболевания почек (15%), другие СЗ (11%), заболевания органов дыхания (7%) и др. Группы были сопоставимы по наличию СЗ. Интересно отметить наличие в группе исследуемого препарата пациентов с онкологическими заболеваниями и фибрилляцией предсердий в анамнезе, то есть пациентов, для которых особенно важен высокий профиль безопасности препарата.

Всего в исследовании (II этап) наблюдалось 264 пациента, из них 198 пациентов с факторами риска (по 99 (75%) пациентов в каждой группе). Из них с фактором риска «возраст более 60 лет» – 30 пациентов (22,73%) в группе исследуемого препарата и 29 пациентов (21,97%) в группе препарата сравнения; с фактором риска «ожирение (ИМТ 30 и более кг/м^2)» – 48 пациентов (36,36%) в группе исследуемого препарата и 49 пациентов (37,12%) в группе препарата сравнения; с фактором риска «сахарный диабет» – 1 пациент (0,76%) в группе исследуемого препарата и 2 пациента (1,52%) в группе препарата сравнения; с фактором риска «заболевания сердца» – 41 пациент (31,06%) в группе исследуемого препарата и 40 пациентов (30,30%) в группе препарата сравнения; с фактором риска «хронические заболевания легких» – 3 пациента (2,27%) в группе исследуемого препарата и 9 пациентов (6,82%) в группе препарата сравнения; с фактором риска «хронические заболевания почек» – 4 пациента (3,03%) в группе исследуемого препарата и 9 пациентов (6,82%) в группе препарата сравнения; с фактором риска «активное злокачественное новообразование» – 1 пациент (0,76%) в группе исследуемого препарата. Сведения о частоте встречаемости факторов риска у пациентов в группе исследуемого препарата и стандартной терапии представлены в таблице 2.

Межгрупповой анализ показал, что исследуемые группы были сопоставимы по демографическим и клиническим характеристикам.

За время исследования ни у одного пациента из группы нирматрелвир + ритонавир не наблюдалось перехода течения COVID-19 в более тяжелую степень тяжести, в отличие от пациентов группы стандартной терапии.

В группе препарата (нирматрелвир + ритонавир) доля пациентов с переходом течения COVID-19 в более тяжелую степень тяжести по сравнению с исходным состоянием к 16 дню составила 0,00% (0/132), 95% ДИ [0,0000; 0,0352], в группе стандартной терапии – 6,06% (8/132), 95% ДИ [0,0285; 0,1198]. Разница в долях между группами препарата (нирматрелвир + ритонавир) и группой стандартной терапии составила 0,0606 (6,06%), 95% ДИ [0,0129; 0,1198]. Тестирование гипотезы для итогового статистического анализа осуществлялось при одностороннем уровне значимости 0,0275. В результате сравнительного анализа по частоте пациентов с переходом течения COVID-19 в более тяжелую степень тяжести по сравнению с исходным состоянием к 16 дню были выявлены статистически значимые различия между группой препарата (нирматрелвир + ритонавир) и группой стандартной терапии ($p=0,0035$, т.е. $p<0,0275$).

Таким образом, гипотезу превосходства терапии препаратом нирматрелвир + ритонавир над стандартной терапией можно считать доказанной. Также сделан вывод о том, что терапия фиксированной комбинацией снижает риск ухудшения клинического состояния пациентов и улучшает прогноз течения заболевания.

В связи с тем, что среди участников исследования были пациенты с СЗ (68% от общей популяции), с факторами риска прогрессирования COVID-19 до тяжелого течения и риска госпитализации (75% от общей популяции), можно сделать вывод о высокой эффективности проведенной терапии (нирматрелвир + ритонавир) вне зависимости от наличия факторов риска отягощенного течения заболевания.

Таким образом, рассматриваемая терапия является обоснованной, клинически и фармакоэкономически эффективной.

Динамика среднего значения (Mean ± SD) клинического статуса по категориальной порядковой шкале клинического улучшения в группе исследуемого препарата (нирматрелвир и ритонавир) на 6-й день наблюдения составила 1,30±1,01 балла по сравнению со стандартной терапией 1,76±0,79 ($p=0,0001$). Это свидетельствует о преимуществе фиксированной комбинации перед стандартной схемой терапии в

[5] Протокол исследования: № NR-012022. Контрактная исследовательская организация: ООО «СОЛЮР-ФАРМ», 121108, Россия, г. Москва, ул. Ивана Франко, д. 4, корп. 2, эт. 3, пом. 1, офис 2. Даты проведения исследования: 17.02.2021 г. – 01.06.2022 г.

отношении уменьшения степени тяжести симптомов COVID-19 и улучшения клинического состояния пациентов и ускорения выздоровления.

Частота пациентов с категорией 0 по категориальной порядковой шкале клинического улучшения уже к 6-му дню наблюдения в группе (нирматрелвир и ритонавир) была больше в 2 раза и составила 35,61% (47/132), по сравнению с группой стандартной терапии – 14,39% (19/132) (p=0,0001). Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности применения фиксированной комбинации (нирматрелвир + ритонавир) и её значимых преимуществах перед группой сравнения в отношении скорости улучшения клинического статуса пациентов и сокращения сроков выздоровления.

Частота пациентов с отрицательным анализом РНК SARS-CoV-2 уже к 6-му дню в группе исследуемого препарата была больше на 20%, чем у группы сравнения (82,58% пациентов (109/132) и 61,36% пациентов (81/132), соответственно), что свидетельствует об эффективном противовирусном действии фиксированной комбинации (нирматрелвир + ритонавир), характеризующейся сокращением сроков элиминации вируса SARS-CoV-2 по сравнению со стандартной терапией, что приводит к более быстрому исчезновению симптомов инфекционного заболевания и снижает риски развития осложнений COVID-19.

В результате сравнительного анализа частоты пациентов с различной степенью тяжести симптомов к 6 дню были выявлены статистически значимые различия между группой (нирматрелвир и ритонавир) и группой стандартной терапии по симптомам: заложенность носа или насморк (p=0,0027), боль в горле (p=0,0016), кашель (p=0,0424), утомляемость (p=0,0003), а также к визиту 4 по симптому кашель (p=0,0016), что свидетельствует об эффективности фиксированной комбинации у пациентов с COVID-19.

Оценка суммарного балла по шкале основных симптомов COVID-19 показывает, что среднее значение суммарного балла по всем симптомам в группе, принимавшей комбинацию нирматрелвир + ритонавир (Mean ± SD), к 6-му дню (p <0,0001) составила 1,39±1,45 балла (на скрининге – 5,43±2,16), в группе стандартной терапии – 2,21±1,77 балла (на скрининге 5,80±2,46). То есть в группе исследуемого препарата положительная динамика по всем симптомам наступала на 60% быстрее, чем в группе сравнения, причем изменения были более выражены. Таким образом, применение рассматриваемой комбинации обеспечивает улучшение общего состояния и облегчение основных симптомов заболевания.

Дополнительно был проведен анализ частоты нежелательных реакций по классификации ВОЗ, включающие НЯ с определенной, вероятной и возможной связью с препаратом нирматрелвир + ритонавир (табл. 3).

Результаты сравнительного анализа также показали, что прием исследуемого препарата способствовал более эффективному снижению температуры тела, что приводило к снижению потребности в приеме НПВП и повышению безопасности терапии в целом.

Частота пациентов группы исследуемого препарата с зарегистрированными случаями НЯ составила 7,58% (10/132). Всего у 10 пациентов группы нирматрелвир + ритонавир отмечалось 14 НЯ. Среди зарегистрированных НЯ – 92,86% (13/14) были легкой степени тяжести, 7,14% (1/14) – средней степени тяжести. По оценке врачей-исследователей, причинно-следственная связь с терапией исследуемым препаратом была оценена как «возможная» – в 71,43% (10/14) случаев, как «не связано» в 14,29% (2/14) случаев, как «вероятная» в 7,14% (1/14) случаев, как «сомнительная» в 7,14% (1/14) случаев. Анализ частоты исходов НЯ у пациентов показал, что в группе пациентов, получавших исследуемый препарат, «выздоровление без последствий» отмечалось в 100% (14/14) случаев.

Частота пациентов группы стандартной терапии с зарегистрированными случаями НЯ составила 6,06% (8/132). Всего у 8 пациентов группы стандартной терапии отмечалось 10 НЯ. Среди зарегистрированных НЯ 90,00% (9/10) были легкой степени тяжести, 10,00% (1/10) – средней степени тяжести.

По оценке врачей-исследователей, причинно-следственная связь со стандартной терапией была оценена как «возможная» – в 70,00% (7/10) случаев, как «не связано» в 10,00% (1/10) случаев, как «вероятная» в 10,00% (1/10) случаев, как «сомнительная» в 10,00% (1/10) случаев.

В результате сравнительного анализа НЯ по их наличию, степени тяжести, причинно-следственной связи с проводимой терапией и исходу не было выявлено статистически значимых различий между группами наблюдения. Было показано, что прием исследуемого препарата не оказывает негативного влияния на показатели ЭКГ и других жизненно-важных функций (АД, ЧСС и т.п.). В ходе исследования не было зарегистрировано ни одного серьезного НЯ, включая летальные случаи.

В группе нирматрелвир + ритонавир выявлены следующие нежелательные реакции, классифицированные по частоте: повышение уровня АЛТ – 3 (2,3%), повышение уровня АСТ – 3 (2,3%), дисгевзия – 3 (2,3%), диарея – 1 (0,8%), сухость во рту – 1 (0,8%). В группе стандартной терапии выявлены следующие нежелательные реакции: тошнота 2 (1,5%), повышение уровня АЛТ – 3 (2,3%), повышение уровня АСТ – 3 (2,3%), диарея 1 (0,8%), эритема – 1 (0,8%).

Проведенный анализ нежелательных реакций в группах терапии показал отсутствие статистически значимых различий между группой (нирматрелвир + ритонавир) и группой стандартной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно утверждать, что терапия фиксированной комбинацией нирматрелвира с ритонавиром характеризуется благоприятным профилем безопасности, сопоставимым со стандартной терапией. Выявленные нежелательные реакции носили транзиторный характер и не требовали отмены терапии или изменения схемы лечения.

Разработанная в Российской Федерации уникальная технология, позволившая объединить оба действующих вещества в одну фиксированную лекарственную форму, позволяет снизить количество применяемых таблеток в 6 раз по сравнению с американским аналогом, что обеспечивает снижение полипрагмазии и повышает приверженность и безопасность терапии в целом [27].

В результате проведенного клинического исследования «Открытое двухэтапное многоцентровое исследование по оценке основных фармакокинетических параметров, безопасности, а также эффективности в отношении COVID-19 лекарственного препарата Скайвира® у взрослой популяции» было продемонстрировано преимущество терапии фиксированной комбинацией (нирматрелвир 300 мг + ритонавир 100 мг) над стандартной терапией у пациентов с COVID-19, а также сопоставимость фармакокинетического профиля препарата с имеющимися данными по компонентам.

Было продемонстрировано преимущество терапии препаратом Скайвира® над стандартной терапией у пациентов с COVID-19 в отношении снижения риска ухудшения степени тяжести заболевания и госпитализации, скорости элиминации вируса, динамики уменьшения степени выраженности симптомов инфекционного заболевания, улучшения общего состояния пациентов и их клинического статуса, уменьшения рисков развития осложнений течения COVID-19 как у пациентов без, так и имеющих факторы риска прогрессирования COVID-19 до тяжелого течения.

Результаты исследования продемонстрировали высокий профиль эффективности и безопасности лекарственного препарата Скайвира (фиксированная комбинация: нирматрелвир 300 мг + ритонавир 100 мг) у пациентов с COVID-19. Полученные данные свидетельствуют о клинической и фармакоэкономической целесообразности проводимой терапии.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Клиническое исследование проводилось при поддержке компании ООО «ПРОМОМЕД РУС».
Спонсор не оказывал влияния на выбор материала для публикации, анализ и интерпретацию данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Л.А. Балыкова – разработка и реализация дизайна исследования, написание и редактирование текста; Н.М. Селезнева – реализация дизайна исследования, обработка данных; Горшенина Е.И. – реализация дизайна исследования, обработка данных, Шепелева О.И. – реализация дизайна исследования, обработка данных Н.В. Кириченко – реализация дизайна исследования, обработка полученных данных; Е.Н. Симакина – реализация дизайна исследования, обработка полученных данных; К.Б. Колонтарев – разработка и реализация дизайна исследования, редактирование текста; Д.Ю. Пушкарь – разработка и реализация дизайна исследования, анализ результатов, редактирование текста; Д.Н. Земсков – анализ литературных источников, анализ результатов; К.Я. Заславская – разработка дизайна исследования, редактирование текста, анализ литературных источников; С.М. Носков – реализация дизайна исследования, обработка полученных данных; А.В. Таганов – обработка данных исследования, анализ результатов; П.А. Белый – разработка дизайна исследования, редактирование текста.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. To K.K., Sridhar S., Chiu K.H., Hung D.L., Li X., Hung I.F., Tam A.R., Chung T.W., Chan J.F., Zhang A.J., Cheng V.C., Yuen K.Y. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic // Emerg. Microbes. Infect. – 2021. – Vol. 10, No. 1. – P. 507–535. DOI: 10.1080/22221751.2021.1898291
2. Tsang H.F., Chan L.W.C., Cho W.C.S., Yu A.C.S., Yim A.K.Y., Chan A.K.C., Ng L.P.W., Wong Y.K.E., Pei X.M., Li M.J.W., Wong S.C. An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies // Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. – 2021. – Vol. 19, No. 7. – P. 877–888. DOI: 10.1080/14787210.2021.1863146
3. Sreepadmanabh M., Sahu A.K., Chande A. COVID-19: Advances in diagnostic tools, treatment strategies, and vaccine development // J. Biosci. – 2020. – Vol. 45, No. 1. – Art. No. 148. DOI: 10.1007/s12038-020-00114-6
4. Wen W., Chen C., Tang J., Wang C., Zhou M., Cheng Y., Zhou X., Wu Q., Zhang X., Feng Z., Wang M., Mao Q. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19:a meta-analysis // Ann. Med. – 2022. – Vol. 54, No. 1. – P. 516–523. DOI: 10.1080/07853890.2022.2034936. PMID: 35118917; PMCID: PMC8820829.
5. Hung YP, Lee JC, Chiu CW, Lee CC, Tsai PJ, Hsu IL, Ko WC. Oral Nirmatrelvir/Ritonavir Therapy for COVID-19:

The Dawn in the Dark? Antibiotics (Basel). 2022 Feb 9;11(2):220. DOI: 10.3390/antibiotics11020220

6. Anka A.U., Tahir M.I., Abubakar S.D., Alsabbagh M., Zian Z., Hamedifar H., Sabzevari A., Azizi G. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management // Scand. J. Immunol. – 2021. – Vol. 93, No. 4. – Art. ID: e12998. DOI: 10.1111/sji.12998
7. Vangeel L., Chiu W., De Jonghe S., Maes P., Slechten B., Raymenants J., André E., Leyssen P., Neyts J., Jochmans D. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern // Antiviral. Res. – 2022. – Vol. 198. – Art. ID: 105252. DOI: 10.1016/j.antiviral.2022.105252
8. Reina J., Iglesias C. Nirmatrelvir más ritonavir (Paxlovid) una potente combinación inhibidora de la proteasa 3CLpro del SARS-CoV-2 [Nirmatrelvir plus ritonavir (Paxlovid) a potent SARS-CoV-2 3CLpro protease inhibitor combination] // Rev. Esp. Quimioter. – 2022. – Vol. 35, No. 3. – P. 236–240. DOI: 10.37201/req/002.2022. Spanish
9. Paxlovid for treatment of COVID-19 // Med. Lett. Drugs Ther. – 2022. – Vol. 64, No. 1642. – P. 9–10.
10. Eng H., Dantonio A.L., Kadar E.P., Obach R.S., Di L., Lin J., Patel N.C., Boras B., Walker G.S., Novak J.J., Kimoto E., Singh R.S.P., Kalgutkar A.S. Disposition of Nirmatrelvir, an Orally Bioavailable Inhibitor of SARS-CoV-2 3C-Like Protease, across Animals and Humans // Drug. Metab. Dispos. – 2022. – Vol. 50, No. 5. – P. 576–590. DOI: 10.1124/dmd.121.000801
11. Buxeraud J., Faure S., Fougere É. Le nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid®), un traitement contre la Covid-19 [Nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid®), a treatment for Covid-19] // Actual Pharm. – 2022. – Vol. 61, No. 617. – P. 10–12. DOI: 10.1016/j.actpha.2022.05.002. French
12. Saravolatz L.D., Depcinski S., Sharma M. Molnupiravir and Nirmatrelvir-Ritonavir: Oral COVID Antiviral Drugs // Clin. Infect. Dis. – 2022. – Art. ID: ciac180. DOI: 10.1093/cid/ciac180
13. Wong C.K.H., Au I.C.H., Lau K.T.K., Lau E.H.Y., Cowling B.J., Leung G.M. Real-world effectiveness of molnupiravir and nirmatrelvir plus ritonavir against mortality, hospitalisation, and in-hospital outcomes among community-dwelling, ambulatory patients with confirmed SARS-CoV-2 infection during the omicron wave in Hong Kong: an observational study // Lancet. – 2022. – Vol. 400, No. 10359. – P. 1213–1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01586-0
14. Drożdżal S., Rosik J., Lechowicz K., Machaj F., Szostak B., Przybyciński J., Lorzadeh S., Kotfis K., Ghavami S., Łos M.J. An update on drugs with therapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment // Drug. Resist. Updat. – 2021. – Vol. 59. – Art. ID: 100794. DOI: 10.1016/j.drup.2021.100794
15. Rubin E.J., Baden L.R. The Potential of Intentional Drug Development // N. Engl. J. Med. – 2022. – Vol. 386, No. 15. – P. 1463–1464. DOI: 10.1056/NEJMe2202160
16. Hammond J., Leister-Tebbe H., Gardner A., Abreu P., Bao W., Wisemandle W., Baniecki M., Hendrick V.M., Damle B., Simón-Campos A., Pypstra R., Rusnak J.M.; EPIC-HR Investigators. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19 // N. Engl. J. Med. – 2022. – Vol. 386, No. 15. – P. 1397–1408. DOI: 10.1056/NEJMoa2118542
17. Vassilopoulos A., Mylonakis E. In patients with COVID-19 at risk for severe disease, nirmatrelvir + ritonavir reduced hospitalization or death // Ann. Intern. Med. – 2022. – Vol. 175, No. 6. – Art. ID: JC63. DOI: 10.7326/J22-0038
18. Sacks H.S. In nonhospitalized, unvaccinated adults with COVID-19, molnupiravir reduced hospitalization or death at 29 d // Ann. Intern. Med. – 2022. – Vol. 175, No. 4. – Art. ID: JC40. DOI: 10.7326/J22-0017
19. Najjar-Debbiny R., Gronich N., Weber G., Khoury J., Amar M., Stein N., Goldstein L.H., Saliba W. Effectiveness of Paxlovid in Reducing Severe COVID-19 and Mortality in High Risk Patients // Clin. Infect. Dis. – 2022. – Art. ID: ciac443. DOI: 10.1093/cid/ciac443
20. Lee J.T., Yang Q., Gribenko A., Perrin B.S. Jr., Zhu Y., Cardin R., Liberator P.A., Anderson A.S., Hao L. Genetic Surveillance of SARS-CoV-2 Mpro Reveals High Sequence and Structural Conservation Prior to the Introduction of Protease Inhibitor Paxlovid // mBio. – 2022. – Vol. 13, No. 4. – Art. ID: e0086922. DOI: 10.1128/mbio.00869-22
21. Greasley S.E., Noell S., Plotnikova O., Ferre R., Liu W., Bolanos B., Fennell K., Nicki J., Craig T., Zhu Y., Stewart A.E., Steppan C.M. Structural basis for the in vitro efficacy of nirmatrelvir against SARS-CoV-2 variants // J. Biol. Chem. – 2022. – Vol. 298, No. 6. – Art. ID: 101972. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101972
22. Lamb Y.N. Nirmatrelvir Plus Ritonavir: First Approval // Drugs. – 2022. – Vol. 82, No. 5. – P. 585–591. DOI: 10.1007/s40265-022-01692-5. Erratum in: Drugs. – 2022. – Vol. 82, No. 9. – Art. ID: 1025.
23. Fishbane S., Hirsch J.S., Nair V. Special Considerations for Paxlovid Treatment Among Transplant Recipients With SARS-CoV-2 Infection // Am. J. Kidney. Dis. – 2022. – Vol. 79, No. 4. – P. 480–482. DOI: 10.1053/j.ajkd.2022.01.001
24. Arbel R., Wolff Sagy Y., Hoshen M., Battat E., Lavie G., Sergienko R., Friger M., Waxman J.G., Dagan N., Balicer R., Ben-Shlomo Y., Peretz A., Yaron S., Serby D., Hammerman A., Netzer D. Nirmatrelvir Use and Severe Covid-19 Outcomes during the Omicron Surge // N. Engl. J. Med. – 2022. DOI: 10.1056/NEJMoa2204919
25. Marzi M., Vakil M.K., Bahmanyar M., Zarenezhad E. Paxlovid: Mechanism of Action, Synthesis, and *In Silico* Study // Biomed. Res. Int. – 2022. – Vol. 2022. – Art. ID: 7341493. DOI: 10.1155/2022/7341493
26. Agarwal A., Rochwerg B., Lamontagne F., Siemieniuk R.A., Agoritsas T., Askie L., Lytvyn L., Leo Y.S., Macdonald H., Zeng L., Amin W., Barragan F.A.J., Bausch F.J., Burhan E., Calfee C.S., Cecconi M., Chanda D., Dat V.Q., De Sutter A., Du B., Freedman S., Geduld H., Gee P., Gotte M., Harley N., Hashimi M., Hunt B., Jehan F., Kabra S.K., Kanda S., Kim Y.J., Kissoon N., Krishna S., Kuppalli K., Kwizera A., Lado Castro-Rial M., Lisboa T., Lodha R., Mahaka I., Manai H., Mino G., Nsutebu E., Preller J., Pshenichnaya N., Qadir N., Relan P., Sabzwari S., Sarin R., Shankar-Hari M., Sharland M., Shen Y., Ranganathan S.S., Souza J.P., Stegemann M., Swanstrom R., Ugarte S., Uyeki T., Venkatapuram S., Vuyiseka D., Wijewickrama A., Tran L., Zeraatkar D., Bartoszko J.J., Ge L., Brignardello-Petersen R., Owen A., Guyatt G., Diaz J., Kawano-Dourado L., Jacobs M., Vandvik P.O. A living WHO guideline on drugs

for covid-19 // BMJ. – 2020. – Vol. 370. – Art. ID: m3379. DOI: 10.1136/bmj.m3379. Update in: BMJ. – 2020. – Vol. 371. – Art. ID: m4475. Update in: BMJ. – 2021. – Vol. 372. – Art. ID: n860. Update in: BMJ. – 2021. – Vol. 374. – Art. ID: n1703. Update in: BMJ. – 2021. – Vol. 374. – Art. ID: n2219. Erratum in: BMJ. – 2022. – Vol. 377. – Art. ID: o1045.

27. Чуланов В.П., Пушкарь Д.Ю., Горелов А.В., Балыкова Л.А., Лиознов Д.А., Дмитриев А.С., Колонтарев К.Б., Малявин А.Г., Будневский А.В., Эсауленко Е.В., Пшеничная Н.Ю., Омарова Х.Г., Таганов А.В., Петров В.А. Заключение экспертов. Новые возможности этиотропной терапии коронавирусной инфекции // Инфекционные болезни. – 2022. – Т. 20, № 2. – С. 120–122. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-2-119-121

АВТОРЫ

Балыкова Лариса Александровна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой педиатрии, директор Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-2290-0013. E-mail: larisabalykova@yandex.ru

Селезнева Наталья Михайловна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва». ORCID ID: 0000-0002-3004-2063. E-mail: nata_rm@mail.ru

Горшенина Елена Ивановна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной терапии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID 0000-0001-9342-0909, E-mail: lena.medfak@yandex.ru

Шепелева Ольга Ивановна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной терапии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0001-8307-2787. E-mail: shepeleva-oi@rambler.ru

Кириченко Наталья Вячеславовна – врач-пульмонолог, заместитель главного врача по медицинской части, ОБУЗ «Ивановская клиническая больница имени Куваевых». г. Иваново, Россия. ORCID ID: 0000-0002-4272-9540. E-mail: igb2@ivreg.ru

Симакина Елена Николаевна – врач-инфекционист, заведующая инфекционным отделением ОБУЗ «Клиническая больница №1», г. Смоленск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5709-8913. E-mail: e.simakina@mail.ru

Колонтарев Константин Борисович – доктор медицинских наук, профессор кафедры урологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России; врач-уролог Городской клинической больницы им. С.И. Спасокукоцкого Департамента здравоохранения города Москвы. ORCID ID: 0000-0003-4511-5998. E-mail: kbk@mail.ru

Пушкарь Дмитрий Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой урологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России; врач-уролог ГКБ им. С.И. Спасокукоцкого Департамента здравоохранения города Москвы; академик РАН. ORCID ID: 0000-0002-6096-5723. E-mail: pushkardm@mail.ru

Земсков Дмитрий Николаевич – ассистент кафедры биологической и фармацевтической химии с курсом организации и управления фармацией Медицинский институт ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-0181-4327. E-mail: dizem1978@gmail.com

Заславская Кира Яковлевна – ассистент кафедры биологической и фармацевтической химии с курсом организации и управления фармацией Медицинский институт ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-7348-9412. E-mail: kiryonok@yandex.ru

Носков Сергей Михайлович – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой госпитальной терапии ФГБОУ ВО Ярославский медицинский университет Минздрава России; врач-терапевт ГБУЗ ЯО «КБ №3». ORCID ID: 0000-0003-3456-9409. E-mail: Noskov03@gmail.com

Таганов Алексей Викторович – доктор медицинских наук, профессор кафедры дерматовенерологии с курсом косметологии факультета непрерывного медицинского образования медицинского института ФГАОУ ВО РУДН. ORCID ID: 0000-0001-5056-374X. E-mail: matis87177@yandex.ru

Белый Петр Александрович – кандидат медицинских наук, старший лаборант кафедры пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО МГМУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-5998-4874. E-mail: pbely@ncpharm.ru

Scientific and Practical Journal
PHARMACY & PHARMACOLOGY

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-387-399

УДК 615.0354

СИНЕРГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА С КООРДИНАЦИОННЫМ КОМПЛЕКСОМ ТРИМЕТИЛГИДРАЗИНИЯ ПРОПИОНАТА И ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН И ДЫХАНИЕ КЛЕТКИ

М.В. Журавлева[1,2], М.В. Грановская[3], К.Я. Заславская[4], Ю.Г. Казаишвили[5], В.С. Щербакова[5], А.А. Андреев-Андриевский[6], Д.И. Поздняков[7], М.Ю. Высоких[8]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[3] Институт системной биологии, Университетский колледж Дублина, D04 V1W8, Ирландия, Белфилд, Дублин, 4
[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», 430005, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевистская, д. 68
[5] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, 170100, Россия, г. Тверь, ул. Советская, д. 4
[6] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, 123007, Россия, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А
[7] 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-т Калинина, д. 11
[8] Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского» Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

E-mail: kiryonok@yandex.ru

Получена 08.07.2022 После рецензирования 12.08.2022 Принята к печати 22.08.2022

В статье представлены результаты *in vitro* исследования оценки синергического действия препарата лекарственного препарата на основе координационного комплекса этилметилгидроксипиридина сукцината и триметилгидразиния пропионата на энергетический обмен и дыхание клетки.

Целью данного исследования являлась оценка митохондриально-направленного действия метаболического и антиоксидантного лекарственного средства на основе янтарно-кислого координационного комплекса с триметилгидразинием в отношении оптимизации энергообмена в клетках в условиях оксидативного стресса, а также на фоне ишемических процессов.

Для цитирования: М.В. Журавлева, М.В. Грановская, К.Я. Заславская, Ю.Г. Казаишвили, В.С. Щербакова, А.А. Андреев-Андриевский, Д.И. Поздняков, М.Ю. Высоких. Синергическое действие препарата с координационным комплексом триметилгидразиния пропионата и этилметилгидроксипиридина сукцината на энергетический обмен и дыхание клетки. *Фармация и фармакология.* 2022;10(4):387-399. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-387-399

For citation: M.V. Zhuravleva, M.V. Granovskaya, K.Ya. Zaslavskaya, Yu.G. Kazaishvili, V.S. Shcherbakova, A.A. Andreev-Andrievsky, D.I. Pozdnyakov, M.Yu. Vysokikh. Synergic effect of preparation with coordination complex “trimethydrazinium propionate+ethymth methylhydroxypiridine succinate” on energy metabolism and cell respiration. *Pharmacy & Pharmacology.* 2022;10(4):387-399. **DOI:** 10.19163/2307-9266-2022-10-4-387-399

Материалы и методы. Исследование действия гидросукцинатного комплекса компонентов препарата Брейнмакс® проводили на изолированных митохондриях печени мыши. В процессе исследования оценивали потенциал митохондрий, скорость генерации в ходе дыхания перекиси водорода, а также скорость дыхания: а) нестимулированного малатом и пируватом, б) стимулированного малатом и пируватом (субстраты комплекса I), сукцинатом (субстрат комплекса II), в) на фоне блокады начального участка электрон-транспортной цепи ротеноном, г) при блокаде фосфорилирования олигомицином, д) на фоне вызванного FCCP разобщения и е) при заблокированном цианидом комплексе IV (цитохром С оксидазе).
Результаты. Было показано, что янтарно-кислый координационный комплекс с триметилгидразинием, являющийся действующим началом лекарственного препарата Брейнмакс®, значимо снижал трансмембранный потенциал митохондрий (IC_{50}=197±5 μM), по сравнению с широко применяемыми препаратами этилметилгидроксипиридина сукцинатом и мельдонием, что облегчает перенос продуцируемых АТФ в клетку и сохраняет жизнедеятельность митохондрий даже в условиях стресса. При исследовании дыхания митохондрий, стимулированном субстратами комплекса I (НАДФ-коэнзимQ-оксидоредуктазы), пирувата и малата, изучаемый препарат приводил к более выраженному росту потребления кислорода с IC_{50}=75±6 μM. При оценке влияния комплекса на продукцию митохондриями АТФ, наиболее выраженное действие наблюдалось при добавлении изучаемого комплекса, что свидетельствовало о разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования при данных концентрациях исследуемых соединений. При оценке влияния комплекса на продукцию изолированными митохондриями перекиси водорода, было показано значимое снижение продукции перекиси в пробах, содержащих комплекс триметилгидразиния пропионата и ЭМГПС.
Заключение. По совокупности полученных результатов можно предполагать, что выгодная конформация фармакофорных групп координационного комплекса этилметилгидроксипиридина сукцината и триметилгидрозиния пропионата в составе лекарственного препарата Брейнмакс® приводит к синергетическому взаимодействию и более выраженному фармакологическому воздействию на клетки-мишени. Данный комплекс обеспечивает стабилизацию митохондриальной функции, интенсификацию выработки энергии аденозинтрифосфата и оптимизацию энергетических процессов в клетке, снижает выраженность оксидативного стресса и устраняет нежелательные эффекты ишемически-гипоксического повреждения тканей.
Ключевые слова: этилметилгидроксипиридина сукцинат; триметилгидразиния пропионат; янтарно-кислый координационный комплекс с триметилгидразинием; гидроксисукцинатный комплекс с триметилгидразинием; митохондрии; дыхание; оксидативный стресс; продукция перекиси
Список сокращений: ЭМГПС – этилметилгидроксипиридинна сукцинат; ТМГП – триметилгидразиния пропионат; FCCP – карбонилцианид-n-трифторметокси-фенилгидразон; АТФ – аденозинтрифосфат; АТФ-азы – аденозинтрифосфатаза; АФК – активные формы кислорода; DAMPs – молекулярные паттерны клеточного повреждения; АДФ – аденозиндифосфат; НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфáт; МРБ – митохондриальные разобщающие белки.

SYNERGIC EFFECT OF PREPARATION WITH COORDINATION COMPLEX “TRIMETHYDRAZINIUM PROPIONATE+ETHYMTH METHYLHYDROXYPIRIDINE SUCCINATE” ON ENERGY METABOLISM AND CELL RESPIRATION

M.V. Zhuravleva[1,2], M.V. Granovskaya[3], K.Ya. Zaslavskaya[4], Yu.G. Kazaishvili[5], V.S. Shcherbakova[5], A.A. Andreev-Andrievsky[6], D.I. Pozdnyakov[7], M.Yu. Vysokikh[8]

[1] Scientific Center for Expertise of Medicinal Products,
Bldg. 2, 8, Petrovsky Blvd., Moscow, Russia, 127051
[2] Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
Bld. 2, 8, Trubetskaya Str., Moscow, Russia, 119991
[3] Institute of Systems Biology of University College Dublin,
4, Dublin, Belfield, Ireland, D04 V1W8
[4] National Research Ogarev Mordovia State University,
68, Bolshevistskaya Str., Saransk, Republic of Mordovia, Russia, 430005
[5] Tver State Medical University,
4, Sovetskaya Str., Tver, Russia, 170100
[6] Institute for Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences,
76A, Khoroshevskoe Hwy, Moscow, Russia, 123007
[7] Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University,
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532
[8] A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of Moscow State University named after M.V. Lomonosov,
Bldg. 40, 1, Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119234

E-mail: kiryonok@yandex.ru

Received 08 Jule 2022 After peer review 12 Aug 2022 Accepted 22 Aug 2022

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-387-399

The article presents the results of an *in vitro* study of the synergetic effect evaluation of the combined preparation based on coordination complex ethylmethylhydroxypyridine succinate and trimethylhydrazinium propionate on energy metabolism and cell respiration.

The aim of the study was to evaluate the mitochondria-directed action of the metabolic and antioxidant preparation based on succinic acid coordination complex with trimethylhydrazinium in relation to optimizing the energy metabolism in the cells under the oxidative stress conditions, as well as against the background of ischemic processes.

Materials and methods. The study of the hydroxysuccinate complex effect of the drug Brainmax® components was carried out on isolated mouse liver mitochondria. In the course of the study, the potential of mitochondria, the generation rate of hydrogen peroxide during the respiration, the respiration rate were evaluated in the following positions: a) unstimulated by malate and pyruvate, b) stimulated by malate and pyruvate (complex I substrates), by succinate (complex II substrates), c) against the background of the initial section of the electron transport chain blockade by rotenone, d) in phosphorylation blockade by oligomycin, e) against the background of the FCCP-induced uncoupling, and f) in cyanide-blocked complex IV (cytochrome C oxidase).

Results. It has been shown that the succinic acid coordination complex with trimethylhydrazinium, which is the active principle of the Brainmax® drug, significantly reduced the transmembrane potential of mitochondria (IC_{50}=197±5 μM), compared with the widely used preparations of ethylmethylhydroxypyridine succinate and trimethylhydrazinium propionate, which facilitates the transfer of the produced ATP into the cell and preserves a vital activity of mitochondria even under stress. In the study of the mitochondrial respiration stimulated by the substrates of complex I (NADP-coenzyme Q-oxidoreductase), pyruvate and malate, the studied drug led to a more pronounced increase in the oxygen consumption with IC_{50}=75±6 μM. When evaluating the effect of the complex on the production of ATP by mitochondria, the most pronounced effect was observed with the addition of studied complex, which indicated to the uncoupling of respiration and oxidative phosphorylation at the given concentrations of the studied compounds. When assessing the effect of the complex on the production of hydrogen peroxide by isolated mitochondria, a significant decrease in the peroxide production was shown in the samples containing the complex of trimethylhydrazinium propionate and EMHPS.

Conclusion. Based on totality of the results obtained, it can be assumed that a favorable conformation of the pharmacophore groups of ethylmethylhydroxypyridine succinate and trimethylhydrozinium propionate coordination complex included in the composition of Brainmax® leads to a synergetic interaction and more pronounced pharmacological effects on target cells. This complex provides stabilization of a mitochondrial function, intensification of the adenosine triphosphate energy production and the optimization of energy processes in the cell, reduces the severity of the oxidative stress and eliminates undesirable effects of an ischemic-hypoxic tissue damage.

Keywords: ethylmethylhydroxypyridine succinate; trimethylhydrazinium propionate; succinic acid coordination complex with trimethylhydrazinium; hydroxysuccinate complex with trimethylhydrazinium; mitochondria; breath; oxidative stress; peroxide production.

Abbreviations: EMHPS – ethylmethylhydroxypyridine succinate; TMHP – trimethylhydrozinium propionate; FCCP – carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; ATP – adenosine triphosphate; ATPase – adenosine triphosphatase; ROS – reactive oxygen species; DAMPs – damage associated molecular patterns; ADP – adenosine diphosphate; NADP – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; MUPs – mitochondrial uncoupling proteins.

ВВЕДЕНИЕ

Патологические состояния, ассоциированные с дисциркуляторными расстройствами и ишемией тканей, являются самыми распространенными причинами смертности и первичной инвалидности населения. Согласно данным WHO Health Estimates[1], лидирующие позиции в списке ведущих неинфекционных заболеваний с высоким риском летального исхода занимают ишемическая болезнь сердца (терминально – инфаркт миокарда) и ишемический инсульт.

В основе патогенеза любого ишемического повреждения тканей лежит дисбаланс между метаболической активностью клеток, выражаемой в потреблении кислорода и субстратов биологического окисления, и адекватной доставкой необходимых питательных элементов [1].

Современные исследования показывают, что ключевым патогенетическим аспектом, определяющим выраженность данного дисбаланса, является нарушение функциональной активности митохондрий клетки. Митохондрии – двумембранные органеллы, выполняющие в клетках множество функций. Прежде всего, митохондриям отводится роль «энергетических станций», обеспечивающих оптимальный пул внутриклеточной энергии [2].

Также митохондрии, регулируют окислительно-восстановительные процессы и реакции апоптоза. В этой связи нарушение митохондриальной активности может привести к дефициту макроэргических соединений, повышению генерации активных форм кислорода (АФК) и программированной гибели клетки по апоптотическому пути [3]. Основным триггером, инициирующим данные процессы, является нехватка кислорода и субстратов окисления [4].

Окклюзия сосуда и последующая гипоксия вызывает ряд тяжелых биохимических и метаболических нарушений, опосредующих сбой функциональной активности митохондрий. Метаболизм клеток переключается с митохондриального окислительного фосфорилирования на анаэробный гликолиз, что приводит к внутриклеточному накоплению лактата и протонов, снижая pH с дальнейшей активацией

[1] World Health Organization. The top 10 causes of death. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death

аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы), прежде всего отвечающей за Na^+/H^+ обменник. Однако, в силу быстрого истощения энергоресурсов в виде АТФ, возникает перегрузка клетки ионами натрия и, впоследствие, кальция (в условиях натриевой перегрузки активируется Na^+/Ca^{2+} АТФ-аза) [5].

Высокое внутриклеточное содержание кальция в ишемизированной клетке нарушает буферную емкость митохондрий, в связи с чем активируется поступление ионов кальция в митохондриальный матрикс. [6]. Поступившие внутрь митохондрий ионы кальция вызывают дисфункцию дыхательной цепи, способствуя гиперпродукции активных форм кислорода и активации механизма гибели клетки (некроз, апоптоз). Также в результате поступления ионов кальция митохондрии «набухают» (феномен митохондриального блеббинга) и разрушаются, высвобождая в цитозоль соединения, усиливающие степень клеточного повреждения [7].

Прежде всего, данные вещества представлены молекулярными паттернами клеточного повреждения (DAMPs), которые активируют путь AGE/RAGE, усиливая иммунологическую реактивность в очаге ишемии [8].

Учитывая особенности описанных выше патогенетических путей ишемического повреждения клеток и центральную роль митохондрий в данных процессах, неудивительно, что именно «энергетические станции» клеток стали главной мишенью для направленной цитопротекции. С целью коррекции митохондриальной дисфункции при ишемии, в настоящий момент применяется ряд химически модифицированных веществ со скаффолдом бенз-γ-пирона, убихинона и трифенилфосфониевым линкером [9], а также вещества, имеющие белковую природу, примером которых могут служить пептиды группы *Szeto-Schiller* (SS-31) [9, 10]. Однако ряд исследований показывает, что нативные, не подвергшиеся модификации молекулы, могут выступать в качестве средств коррекции митохондриальной дисфункции. Например, сукцинат и его производные [11] или средства, шунтирующие метаболические процессы (триметилгидразиния пропионат, триметазидин) могут препятствовать необратимому повреждению митохондрий клетки [12, 13].

В Российской Федерации в 2022 г. зарегистрирован новый лекарственный препарат из группы нейропротекторов и антиоксидантов – Брейнмакс®, представляющий оригинальный комплекс этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) и триметилгидразиния пропионата (ТМГП) в виде раствора для внутривенных и внутримышечных инъекций или капсул. Обычно триметилгидразиния пропионат существует в виде цвиттер-иона (дигидрата), имеющего положительный заряд на гидразиновом фрагменте и отрицательный на карбоксилатной группе [14]. В литературе описано, что соли некоторых многоосновных кислот (кислые соли фумаровой и малеиновой кислот, дигидрофосфат, кислая соль щавелевой кислоты, моно- или дизамещенная соль слизевой кислоты, соли памоевой и оротовой кислот) с триметилгидразиния пропионатом демонстрировали особые фармакокинетические и фармакодинамические свойства [15]. Особенностью рассматриваемого лекарственного препарата является образование в процессе приготовления готовой лекарственной формы гидросукцинатного комплекса с триметилгидразинием. Компоненты комплекса связаны между собой водородными связями и электростатическим межмолекулярным взаимодействием, что обеспечивает выгодную конформацию фармакофорных фрагментов для лучшего связывания с рецепторами и более выраженного действия. При этом важно, что компоненты комплекса имеют разные точки приложения действия, в результате чего при их комбинированном применении возможно развитие синергетического эффекта.

ЦЕЛЬ. Оценка митохондриально-направленного действия компонентов гидросукцинатного комплекса с триметилгидразинием, входящего в состав нового лекарственного препарата Брейнмакс®.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В исследование было включено 50 самцов мышей CBA×B6 возрастом 4–5 мес, полученных из центра генетических ресурсов лабораторных животных ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук». При работе соблюдались требования Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 24.06.1998 г., правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ Р 53434-2009), директивы Европейского сообщества (86/609 ЕС), правил Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.) и Правил лабораторной практики, принятых в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708 от 29.08.2010 г.). Протокол исследования прошел экспертизу в комиссии по биоэтике ООО «Научно-исследовательский институт митоинженерии МГУ» (заключение № 171 от 13.01.2022).

Дизайн исследования

Исследование проводили на изолированных митохондриях печени мыши. Оценивали: потенциал митохондрий, скорость генерации перекиси водорода, скорость дыхания: а) нестимулированного малатом и пируватом, б) стимулированного малатом и пируватом (субстраты комплекса I), сукцинатом (субстрат комплекса II), в) на фоне блокады начального участка электрон-транспортной цепи ротеноном, г) при блокаде фосфорилирования олигомицином, д) на фоне вызванного карбонилцианид-n-трифторметокси-фенилгидразоном (FCCP) разобщения и е) при заблокированном цианидом комплексе IV (цитохром С оксидазе).

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-387-399

Для каждого из показателей в трех экспериментах регистрировали: 1) реакцию на мельдоний, 2) реакцию на ЭМГПС и 3) реакцию на янтарнокислый координационный комплекс триметилгидразиния пропионата и ЭМГПС. Для каждого из опытов проводили 7 независимых повторов эксперимента.

Выделение митохондрий печени

Для получения печени мышей подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации, после немедленно вскрывали брюшную полость животных и иссекали печень. Печень помещали в ледяной фосфатно-солевой буфер (pH=7,0) и хранили на льду до выделения митохондрий, но не дольше 3 мин.

После гомогенизации в приблизительно 20 объемах изотонического раствора суспензию ткани печени переносили в пробирки и осаждали остатки неразрушенных тканей центрифугированием при 1000 g и 4°C в течение 10 мин. Супернатант собирали, избегая попадания в пипетку молочно-белой суспензии, на поверхности и центрифугировали при 14 000 g и 4°C в течение 10 мин. Полученный темный осадок митохондрий отмывали от верхнего светлого рыхлого слоя, собирая последний пипеткой и промывая митохондрии буфером следующего состава: 250 мМ сахароза, 20 мМ Hepes/NaOH, pH 7,5, 0,5 mm EGTA, 0,1% BSA. Осадок суспендировали в 0,5 мл данного буфера и осторожно гомогенизировали 5–10 проходами тефлонового пестика в стеклянном гомогенизаторе на 1 мл (G-Biosciences, США). Гомогенат количественно переносили в новую пробирку и осаждали митохондрии центрифугированием при 12 000 g и 4°C в течение 10 мин. Осадок суспендировали на льду в 70–100 мкл буфера для выделения при помощи пластикового пестика до получения гомогенной суспензии.

Измерение дыхательной функции митохондрий

Аликвоту полученного препарата митохондрий в количестве 50 мкг по белку, определенному по методу с бицинхониновой кислотой (Pierce, США), использовали для определения скорости дыхания, интенсивности окислительного фосфорилирования, степени сопряженности и кальциевой нагрузки митохондрий. Для определения скорости дыхания использовали метод прямой регистрации поглощения кислорода при помощи высокочувствительного оксиграфа (Hansatech, Англия). Для этого аликвоту митохондрий помещали в стеклянную кювету, заполненную 0,5 мл буфера, содержащего: 120 мМ сахарозы, 75мМ KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 5 мМ KH_2PO_4, 20 мМ HEPES, pH=7,5 (титрование NaOH). Измерение потребления кислорода проводили в закрытой системе при 37°C и постоянном перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 500 об/мин.

Полученные величины (изменение O_2 во времени, dO_2 /dt) нормировали на содержание белка. Энергизацию митохондрий осуществляли при помощи субстратов I и II комплексов дыхательной цепи. После регистрации скорости дыхания, активированного добавлением в систему 4 мМ пирувата в присутствии 1 мМ малата, исследовали действие ротенона (2 мкМ), блокирующего I комплекс. Для регистрации скорости дыхания митохондрий с активированным комплексом II после добавления ротенона в систему измерения вносили 10 мМ сукцината калия.

Исследование степени сопряженности полученных препаратов проводили в присутствии аденозиндифосфата (АДФ) после стимуляции дыхания путем внесения 0,1 мМ АДФ в систему 1 мкг олигомицина и регистрировали ингибирование стимулированного дыхания. Отношение скоростей стимулированного и нестимулированного дыхания использовали как характеристическую величину (коэффициент дыхательного контроля), позволяющую оценить качество полученного препарата митохондрий и их состояние в исследуемых тканях. Максимальную скорость разобщенного дыхания определяли в присутствии 20–50 нМ протонофора FCCP. При анализе скоростей дыхания из всех значений вычитали величину, соответствующую скорости потребления кислорода в присутствии 0,5 мМ KCN.

Измерение трансмембранного потенциала митохондрий

Для всех полученных препаратов исследовали способность митохондрий к образованию трансмембранного потенциала, величину которого оценивали при помощи измерения отношения поглощения красителя сафранина О при длинах волн 555/523 нм по методу Викстрема [16]. Для этого в микрокювету объемом 250 мкл вносили 25 мкг белка митохондрий и в двухволновом режиме на спектрофотометре Aminco DW2000 (Olis Inc., США) производили регистрацию кинетики изменения соотношения 555/523 нм до и после добавления субстратов дыхания и специфических ингибиторов переноса электрона в дыхательной цепи митохондрий, таких как ротенон, антимицин, малонат и миксотиазол. Диссипация трансмембранного потенциала достигали при помощи FCCP.

Измерение кальциевой емкости

Кальциевую емкость митохондрий определяли методом титрования при измерении светорассеяния на 575 нм, спектрофотометрически на Cary Varian 300 (Agilent, США) и в среде 250 мМ сахарозы, 2 мМ $MgCl_2$, 5 мМ KH_2PO_4, 20 мМ HEPES, pH=7,4 (титрование NaOH). При этом исследовали как общее количество кальция, индуцирующего падение поглощения, соответствующее максимальному набуханию митохондрий в изоосмотической системе (кальциевой емкости), так и кинетику набухания, характеризующую способность митохондрий к транспорту кальция.

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

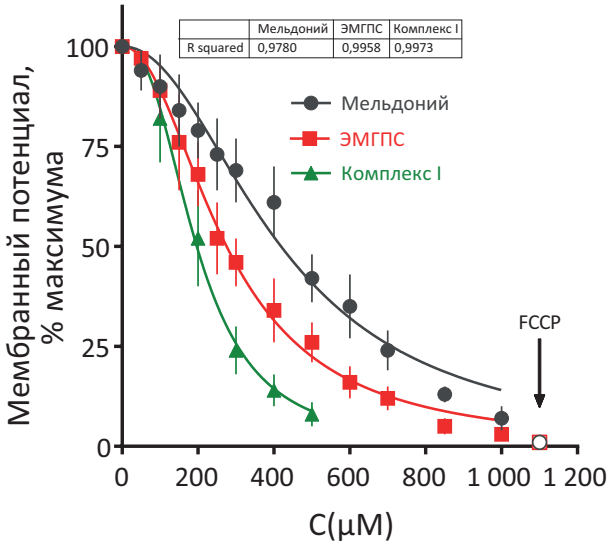


Рисунок 1 – Зависимость мембранного потенциала митохондрий от дозы мельдония, ЭМГПС или комплекса триметилгидразиния пропионата и ЭМГПС (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями – логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридння сукцинат.

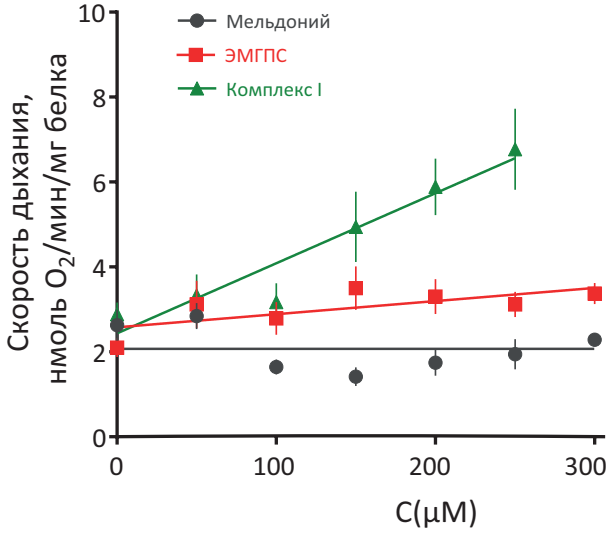


Рисунок 2 – Скорость базального дыхания (без добавления экзогенных субстратов) митохондрий печени мыши в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса компонентов (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — линейная регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридння сукцинат

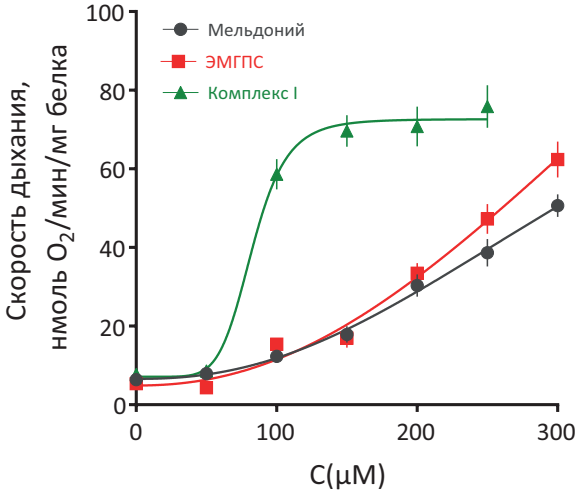


Рисунок 3 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 5 мМ пирувата и 1 мМ малата, в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса компонентов (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридння сукцинат;

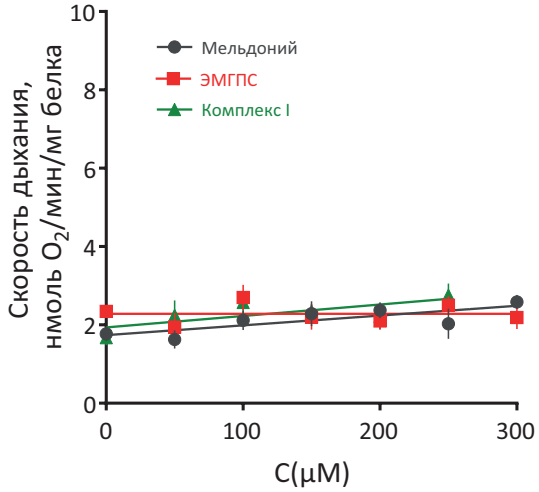


Рисунок 4 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 5 мМ пирувата и 1 мМ малата, в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса компонентов (Комплекс I) и ингибитора комплекса I ротенона (2 μМ)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями – линейная регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридння сукцинат.

RESEARCH ARTICLE
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-387-399

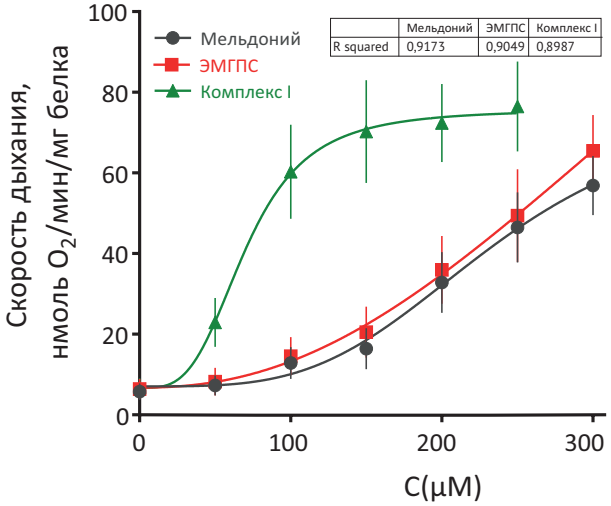


Рисунок 5 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 1 мМ сукцината, в присутствии мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Комплекс I) и ингибитора комплекса I ротенона (2 μМ)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

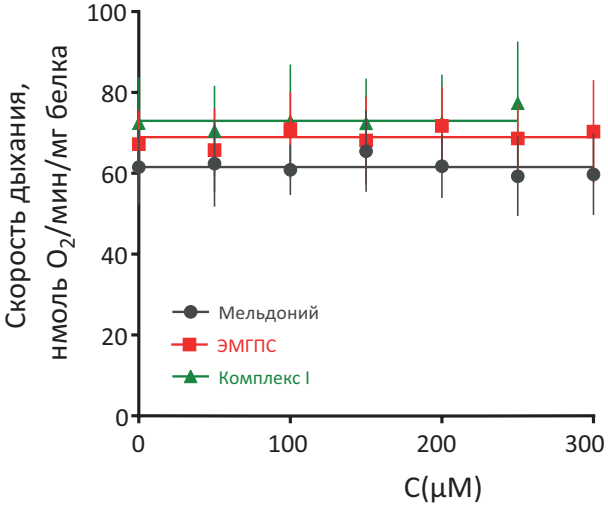


Рисунок 6 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 1 мМ АДФ, в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса с триметилгидразинием (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

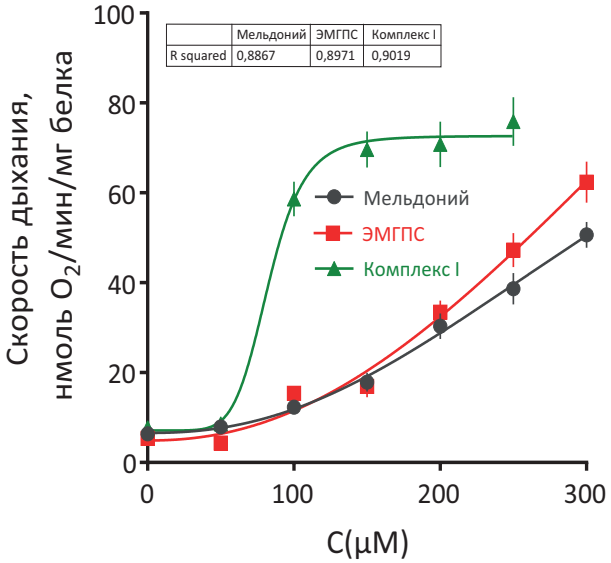


Рисунок 7 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 1 мМ АДФ, в присутствии мельдония, ЭМГПС или рассматриваемого комплекса (Комплекс I) и блокатора АТФ-синтазы олигомицина (1 μМ)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

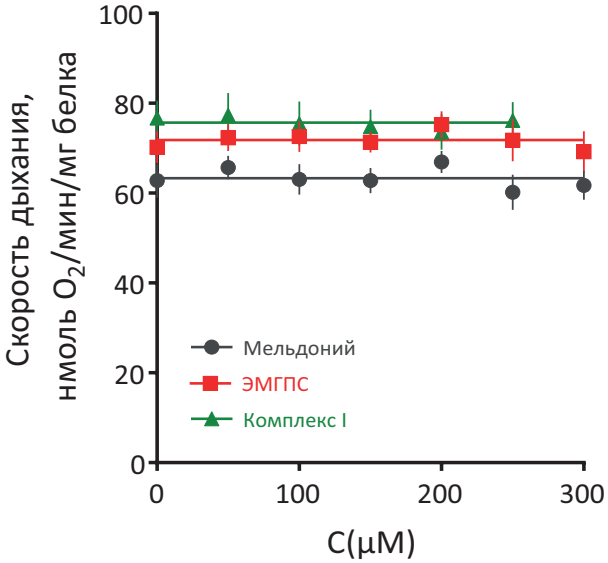


Рисунок 8 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 1 мМ АДФ, в присутствии мельдония, ЭМГПС или рассматриваемого комплекса (Комплекс I) и протонофора FCCP (1 μМ)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

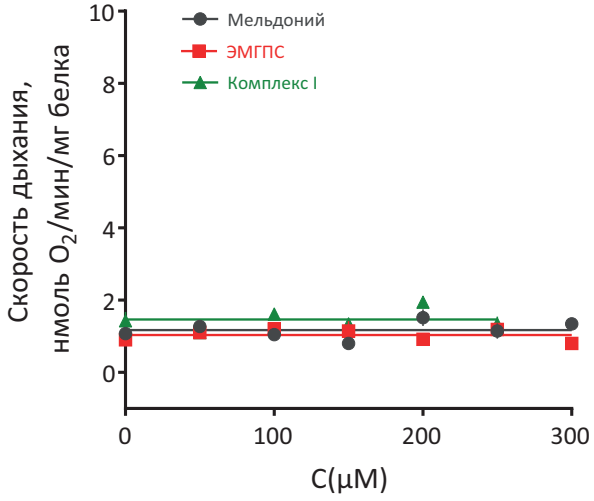


Рисунок 9 – Скорость дыхания митохондрий печени мыши, стимулированного 1 мМ АДФ, в присутствии мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Комплекс I) и цианида (1 μМ)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

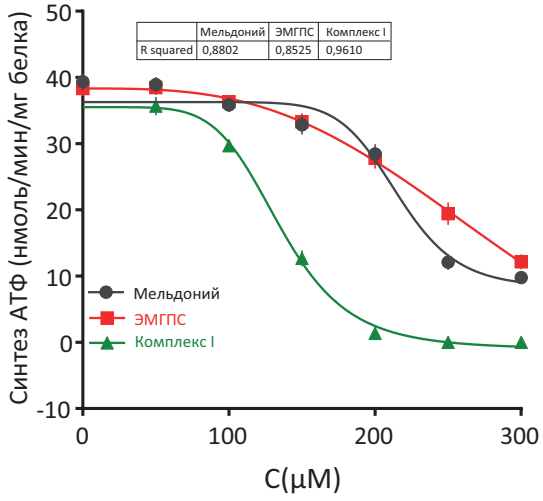


Рисунок 10 – Скорость синтеза АТФ митохондриями печени мыши в присутствии мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (m±sem), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

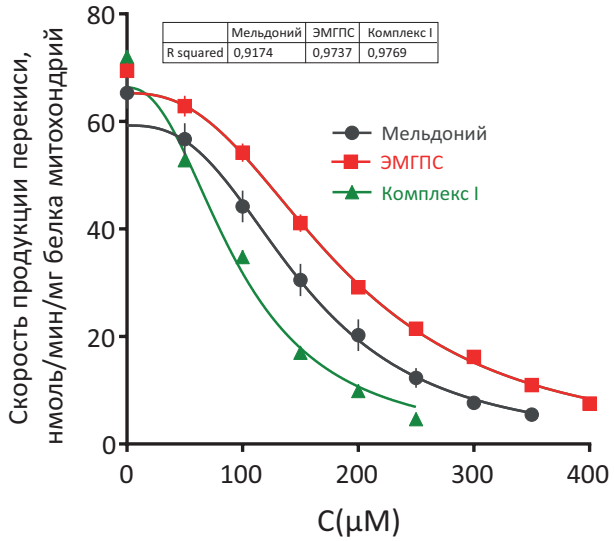


Рисунок 11 – Скорость продукции H_2O_2 митохондрий печени мыши в присутствии мельдония, ЭМГПС или комплекса ЭМГПС с триметилгидразинием (Комплекс I)

Примечание: точками показаны экспериментальные данные (M±SEM), линиями — логистическая регрессия; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-387-399

Оценка синтеза АТФ

Уровень синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) определяли по АТФ-зависимой люминесценции суспензии митохондрий в различных состояниях, при энергизации субстратами различных комплексов дыхательной цепи. Поскольку уровень продукции АТФ митохондриями при аэробном окислении субстратов определяется активностью АТФ-синтетазы, чувствительной к олигомицину, применение этого ингибитора позволяет рассчитать общее максимальное количество синтезированного в митохондриях АТФ, характеризуя, таким образом, различия в возможностях митохондрий поддерживать энергетический метаболизм.

Измерение генерации перекиси водорода

Генерацию перекиси водорода митохондриями оценивали, используя пероксидазу хрена (Thermo Scientific, США) и её флюорогенный субстрат Amplex Red reagent (Thermo Scientific, США), на флюоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Agilent, США) в присутствии ингибитора каталазы специфическим ингибитором 3-амино-1,2,4-триазолом.

Статистический анализ данных

Для первичного анализа данные табулировали и рассчитывали показатели описательной статистики: среднее (M), стандартное отклонение (SD), стандартную ошибку среднего (SEM). Полученные данные подчинялись закону распределения Гаусса, на основании чего были выбраны параметрические методы статистической обработки. Статистический анализ данных проводили с использованием методов нелинейной регрессии, теста Стьюдента для сравнения и однофакторного дисперсионного анализа (для сравнения нескольких выборок). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для анализа данных использовали программное обеспечение Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США) и Prism 5.0 (Graphpad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерение трансмембранного потенциала митохондрий

При оценке влияния исследуемых препаратов на показатели трансмембранного потенциала митохондрий, было показано, что при добавлении возрастающих концентраций препаратов он снижался. Наименее выраженное влияние оказывал мельдоний, для которого величина полуэффективной концентрации (IC_{50}) составляла 419±17 μM. ЭМГПС оказывал значимо ($F (1,22) = 82,90$; $p < 0,0001$) более выраженное влияние на потенциал (IC_{50}=275±6 μM).

Комплекс компонентов триметилгидразиния пропионата и ЭМГПС снижал потенциал митохондрий до IC_{50}=197±5 μM, что значимо меньше по сравнению только с мельдонием ($F (1,15) = 166,5$; $p < 0,0001$) или только с ЭМГПС ($F (1,22) = 107,5$; $p < 0,0001$). При добавлении разобщителя FCCP, потенциал митохондрий снижался до нуля вне зависимости от наличия в инкубационной смеси мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Рис. 1).

Дыхание митохондрий

Фоновое дыхание митохондрий, в отсутствие экзогенных субстратов дыхания не изменялось при добавлении возрастающих концентраций мельдония. ЭМГПС также несущественно увеличивал скорость базального дыхания митохондрий с 2,2±0,2 до 3,4±0,25 нмоль O_2/мин/мг белка ($F (1,47) = 4,34$; $p = 0,0426$), а при добавлении комплекса компонентов скорость базального дыхания увеличивалась с 2,9±0,3 до 6,8±1,0 нмоль O_2/мин/мг белка ($F (1,40) = 28,95$; $p < 0,0001$), что может свидетельствовать о разобщающем дыхание митохондрий действии комплекса ТМГП и ЭМГПС (Рис. 2). Такой эффект позволяет протонам транслоцироваться в межмембранное пространство посредством специфических респираторных комплексов электронно-транспортной цепи и возвращаться в митохондриальный матрикс независимо от АТФ-синтазы. Установленное протонное «протекание» является важным механизмом распределения энергии в клетке и составляет до 25% основного обмена. Разобщение митохондрий на фоне действия компонентов исследуемого комплекса может рассматриваться как цитопротекторная стратегия, опосредованная митохондриальными разобщающими белками (МРБ), в условиях оксидативного стресса при любом ишемическом повреждении, включая процессы старения, а также диабет и резистентность к противоопухолевым препаратам.

Затем исследовали дыхание митохондрий, стимулированное субстратами комплекса I (НАДФ-коэнзим Q-оксидоредуктазы), пирувата и малата (Рис. 3). Было обнаружено повышение скорости, стимулированного субстратами комплекса I, дыхания при повышении в ячейке концентрации янтарнокислого комплекса ТМГП и ЭМГПС. Полуэффективные концентрации мельдония и ЭМГПС составили 273±67 и 350±204 μM, соответственно, и значимо не различались ($F (1,90) = 0,21$; $p = 0,6470$). Добавление исследуемого комплекса приводило к более выраженному росту потребления кислорода (IC_{50}=75±6 μM), что значимо меньше по сравнению с мельдонием ($F (1,83) = 34,37$; $p < 0,0001$) и ЭМГПС ($F (1,83) = 30,17$; $p < 0,0001$).

После добавления ингибитора комплекса ротенона (2 μM), скорость стимулированного пируватом и малатом дыхания митохондрий снижалась практически до нуля и не изменялась в зависимости от концентрации мельдония, ЭМГПС или изучаемого комплекса (Рис. 4).

Сукцинат является субстратом комплекса II электрон-транспортной цепи, таким образом, в присутствии ротенона стимулированное сукцинатом дыхание позволяет оценить состояние комплексов II, III и IV электрон-транспортной цепи митохондрий. Как показано на рисунке 5, действие исследуемого комплекса на скорость потребления кислорода при поддерживаемом субстратом второго комплекса электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) дыхании было сходно. Полуэффективная концентрация для этих двух веществ составляла 237±81 μM и 453±1059 μM

и значимо не различалась (F (1,90) = 0,20; p = 0,6596). Эквимолярная смесь компонентов в комплексе стимулировала дыхание с IC_{50} = 141±27 μM. Различия с мельдонием (F (1,83) = 3,55; p = 0,0632) и ЭМГПС (F (1,83) = 3,90; p = 0,0516) приближались к уровню статистической значимости.

Для оценки сопряженности митохондрий измеряли скорость дыхания в присутствии избытка АДФ и фосфата (Рис. 6), а затем — в присутствии 1 μM олигомицина, ингибитора АТФ-синтазы (Рис. 7). Было установлено, что в присутствии избытка АДФ мельдоний и ЭМГПС не оказывали влияния на скорость дыхания, ни сами по себе, ни в комплексе. На фоне блокады АТФ-синтазы олигомицином мельдоний, ЭМГПС и янтарно-кислый комплекс с триметилгидразинием повышали скорость дыхания с IC_{50}=380±699, 536±1578 и 165±40 μM. Существенные по величине различия IC_{50} не достигали статистической значимости.

Скорость разобщенного FCCP дыхания при добавлении мельдония, ЭМГПС или рассматриваемого комплекса не изменялась (Рис. 8).

Наконец, скорость дыхания при угнетении цианидом цитохром С оксидазы при добавлении мельдония, ЭМГПС или комплекса компонентов не изменялась (Рис. 9).

Таким образом, данные по влиянию изучаемого комплекса на дыхание митохондрий свидетельствуют о восстановлении обмена кислорода в клетках для обеспечения нормальной жизнедеятельности и модуляциию клеточного метаболизма в условиях кардиоваскулярных рисков.

Оценка синтеза АТФ

По результатам проведеного эксперимента, было установлено, что мельдоний, ЭПГМС и янтарно-кислый координационный комплекс с триметилгидразинием оказывают выраженное влияние на продукцию митохондриями АТФ (Рис. 10). Так, наименее выраженное влияние на скорость продукции АТФ оказывал ЭМГПС, для которого концентрация полумаксимального ингибирования составляла 321±168 μM. Полумаксимальное снижение продукции АТФ при добавлении мельдония наблюдалось при концентрации вещества 216±6 μM. Наиболее выраженное снижение продукции АТФ наблюдалось при добавлении координационного комплекса ТМГП и ЭМГПС с IC_{50}=136±4 μM.

Скорость продукции перекиси

Скорость продукции перекиси оценивали флюорометрически. Как показано на рисунке 11, ТМГП, ЭМГПС и изучаемый комплекс снижали продукцию изолированными митохондриями перекиси водорода. Наименьшее влияние на генерацию перекиси проявлял ЭМГПС (EC_{50}=186±6 μM), что значимо меньше, чем у мельдония (IC_{50}=153±11 μM, F (1,113) = 16,36; p <0,0001). Наибольшее подавление продукции перекиси наблюдалось при добавлении к изолированным митохондриям печени мыши комплекса ТМГП и ЭМГПС (IC_{50}=96±10 μM), что значимо меньше, чем для мельдония (F(1,92)=68,94, p <0,0001) или для только ЭМГПС (F(1,99)=310,2, p <0,0001). Данные результаты свидетельствуют о выраженном снижении выработки реактивных форм кислорода и антиоксидантном действии рассматриваемого комплекса, что определяет его протективное воздействие на клетки в условиях ишемии и гипоксии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Средства метаболической терапии находят все большее применение в практической медицине. Одними из представителей данной фармакотерапевтической группы являются широко известные на отечественном фармацевтическом рынке триметилгидразиния пропионат и этилметилгидроксипиридина сукцинат. Мельдоний является средством, позволяющим «шунтировать» биоэнергетические процессы, переключая клетку на более энергетически выгодный режим функционирования. Как правило, это отражается в снижении интенсивности реакций β-окисления жирных кислот и преобладании реакций углеводного обмена в энергопродукции. Важно, что мельдоний оказывает селективное действие именно на ишемизированную ткань, практически не влияя на интактные тканевые участки, что дает возможность избегать эффекта «обкрадывания» [17].

Действие этилметилгидроксипиридина сукцината направлено, прежде всего, на подавление процессов перекисного окисления липидов и снижение общего пула АФК в клетке, а также стимулирование выработки энергии. Применение ЭМГПС ограничивает продукцию реактивных форм кислорода и азота, устраняет негативные эндотелиальные эффекты в виде повышения активности индуцибельной синтазы оксида азота, повышает активность ферментов эндогенной антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы). Наличие в структуре молекулы сукцинатного фрагмента позволяет данному соединению выступать не только в роли антиоксидантного средства, но и в качестве непосредственного субстрата митохондриального комплекса II, что, учитывая высокую биодоступность, может способствовать высокой метаболической активности. Вариабельность таргетного воздействия ТМГП и ЭМГПС, может лежать в основе их синергизма по отношению к энергопродуцирующей функции клеток. В настоящий момент на отечественном фармацевтическом рынке представлен нейро- и цитопротектор на основе координационного комплекса триметилгидразиния пропионата и этилметилгидроксипиридина сукцината – Брейнмакс® – оказывающий антиамнестический, противогипоксический, антиоксидантный и противоишемический эффекты [18].

В этой связи было проведено исследование, посвященное изучению митохондриально-направленного действия рассматриваемого комплекса. В итоге было показано, что в культуре митохондрий, соединения с pK около 4 (комплекс триметилгидразиния пропионата и этилметилгидроксипиридина сукцинат) действуют

как умеренные разобщители митохондриального дыхания. Данный факт может быть связан с наличием в структуре данных соединений положительно заряженного атома третичного азота (триметилгидразиний) и гетероциклического азота (этилметилгидроксипиридина сукцинат), в связи с чем можно предполагать формирование ионных пар между данными соединениями при физиологических условиях и соответствующем значении pH. Интересно, что закрытый метильными группами азот с положительным зарядом может играть роль проникающего катиона и при образовании ионной пары повышать эффективность доставки противоиона (в данном случае сукцината), в том числе и с последующей диссоциацией протона. Таким образом, рассматриваемый координационный комплекс может являться донором дополнительных протонов (протонофором), так необходимых для обеспечения функционирования дыхательной цепи.

Использование разобщителей дыхания (исследуемый комплекс), умеренно увеличивающих протонную проводимость митохондрий, способно элиминировать негативные эффекты, вызванные повышением генерации АФК митохондриями [19].

Данное предположение подтверждается, во-первых, активацией утилизации эндогенных субстратов (пирувата и малата), но в значительно большей степени — при совместном действии исследуемых веществ в диапазоне концентраций порядка десятков нмоль на параметры энергизованных митохондрий. Полученные данные по диссипации мембранного потенциала хорошо коррелируют с данными по снижению генерации перекиси при обратном переносе), при этом, кинетика подавления генерации перекиси обгоняет кинетику подавления синтеза АТФ, что позволяет отнести наблюдаемый феномен к так называемой мягкой деполяризации, когда потенциал ниже порогового значения для образования перекиси, но синтез АТФ еще возможен.

Для того чтобы протонофоры не обладали токсичным действием и не проявляли свою активность в тех случаях, когда клетке требуется синтез АТФ, необходимо, чтобы их активность зависела от функционального состояния митохондрий, например, от потенциала на ее внутренней мембране. В состоянии гиперполяризации протонофор должен снимать только избыток потенциала, но не снижать его чрезмерно, что неизбежно приведет к ингибированию процесса дыхания. Идеальный протонофор не должен ингибировать дыхание митохондрий даже при относительно высоких концентрациях. Ранее предпринимались попытки синтеза веществ, обладающих свойствами «мягких» митохондриальных разобщителей, однако они потерпели неудачу [20].

Таким образом, рассматриваемый янтарнокислый комплекс, вероятно, выступает в качестве такого «мягкого» разобщителя, что уменьшает интенсивность образования АФК и оптимизирует синтез АТФ. В результате работы было показано высокое влияние комплекса на дыхательную функцию митохондрий. Данное исследование показало, что комплекс средств метаболического и антиоксидантного действия повышает базальный уровень дыхания митохондрий, что может быть актуально для повышения исходно нормальной респирометрической функции митохондрий, например, в профилактике гипоксических состояний при отсутствии патологии. Увеличение интенсивности стимулированного дыхания также представляет собой интересный аспект метаболического действия комплекса.

Было показано, что изучаемый комплекс увеличивал интенсивность субстратного дыхания, причем выраженные изменения были получены на всем протяжении митохондриальной дыхательной цепи, что является важным терапевтическим преимуществом в условиях дефицита субстратов окисления – при ишемически-гипоксическом повреждении.

Универсальным метаболическим паттерном ишемий является накопление предшественника сукцината – циклической лимонной кислоты, ответственной за митохондриальную выработку реактивных форм кислорода. Избыток сукцината повторно окисляется сукцинатдегидрогиназой, что приводит к стремительному накоплению реактивных форм кислорода. Триметилгидразиниевый компонент изучаемого комплекса, переводя клетку в анаэробный цикл, снижает доступность молекулярных форм кислорода для оксиления сукцината, таким образом, прерывая патологический каскад образования разрушительных свободных радикалов и оказывая выраженное антигипоксическое действие [21].

Кроме того, учитывая метаболический профиль действия триметилгидразиния пропионата, а именно ограничение требующих кислорода процессов окисления жирных кислот с переводом клетки на интенсивный углеводный обмен и шунтирующий эффект этилметилгидроксипиридина сукцината, можно предположить увеличение устойчивости клеток к кислородному дефициту на разных сопряженных метаболических уровнях. Так, фрагмент триметилгидразиния, за счет повышения транспорта углеводов в клетку и ограничения гликолиза, опосредованного ингибицией фосфофруктокиназы, может увеличивать эффективность степени воздействия этилметилгидроксипиридина сукцината на электронотрапспортные процессы, модулируя тем самым оптимальную продукцию АТФ в условиях ишемии, достаточную для поддержания нормального функционирования клетки [22].

В сложившихся условиях ишемии тканей модуляция синтеза АТФ может иметь важное значение для выживания клетки. Известно, что в условиях ишемического инсульта снижение концентрации внутриклеточного пула АТФ до критического уровня опосредует активацию каспазо-зависимых реакций апоптоза, ведущих к гибели клетки и усилению реакций нейровоспаления [23, 24]. Также при манифестации болезни Альцгеймера – одного из самых распространенных нейродегенеративных

заболеваний – повышение образования АТФ за счет активации субстрат-зависимого дыхания, а именно переключение биоэнергетических процессов с одного используемого субстрата на другой, может препятствовать спонтанной самоагрегации тау-белка, подавляя тем самым основной патогенетический каскад болезни Альцгеймера (в данном случае АТФ выступает как естественный гидротроп, стабилизирующий белковые молекулы) [25].

Значительное усиление сукцинат зависимого дыхания под влиянием комплекса (триметилгидразиния пропионат+ этилметилгидроксипиридина сукцинат) в условиях блокады активности митохондриального комплекса I ротеноном, сопряженное с АФК-ингибирующей активностью, вероятно, позволит добиться определенных терапевтических преимуществ при болезни Паркинсона. Установлено, что одним из патогенетических триггеров данного заболевания является дисфункция митохондриального комплекса I с последующим усилением утечки электронов из митохондриальной дыхательной цепи и развитием окислительного повреждения нейронов черной субстанции [26]. В данных условиях применение рассматриваемого комплекса компонентов позволит достичь эффекта «метаболического обхода» комплекса I, что позволит уменьшить ретроградный ток и утечку электронов, снизив образование АФК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По совокупности полученных результатов, можно предполагать, что лекарственный препарат Брейнмакс® приводит к стабилизации митохондриальной функции, рационализации работы клетки в условиях стресса, нормализации энергообмена в клетке даже в условиях гипоксии и устранению нежелательных эффектов ишемически-гипоксического повреждения тканей. Причем для комплекса активных компонентов, обладающих синергетическим взаимодействием, эти эффекты более выражены, чем для их применения по отдельности. Спектр биохимических реакций, происходящих в клетке под действием янтарнокислого комплекса с триметилгидразинием, и соответствующие фармакологические эффекты могут являться предметом дальнейших, более детализированных исследований на соответствующих экспериментальных моделях патологических процессов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование проводилось при поддержке компании ООО «ПРОМОМЕД РУС». Спонсор не оказывал влияния на выбор материала для публикации, анализ и интерпретацию данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В. Журавлева – анализ результатов, редактирование текста; М.В. Грановская – интерпретация результатов; К.Я. Заславская – разработка концепции исследования, редактирование текста; Ю.Г. Казаишвили – статистическая обработка результатов, написание текста; В.С. Щербакова – написание текста, подбор литературных источников; А.А. Андреев-Андриевский – организация и проведение исследования, интерпретация результатов; Д.И. Поздняков – анализ результатов, написание текста; М.Ю. Высоких – разработка дизайна и написание программы исследования.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Mui D., Zhang Y. Mitochondrial scenario: roles of mitochondrial dynamics in acute myocardial ischemia/reperfusion injury // J. Recept. Signal. Transduct. Res. – 2021. – Vol. 41, No. 1. – P. 1–5. DOI: 10.1080/10799893.2020.1784938
2. Johnson J., Mercado-Ayon E., Mercado-Ayon Y., Dong Y.N., Halawani S., Ngaba L., Lynch D.R. Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases // Arch. Biochem. Biophys. – 2021. – Vol. 702. – Art. ID:108698. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108698
3. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Нигарян С.А., Хури Е.И., Мирошниченко К.А., Сосновская А.В., Олохова Е.А. Оценка респирометрической функции митохондрий в условиях патологий различного генеза // Фармация и фармакология. – 2019. – Т. 7, № 1. – С. 20–31. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-1-20-31
4. Hernandez-Resendiz S., Prunier F., Girao H., Dorn G., Hausenloy D.J.; EU-CARDIOPROTECTION COST Action (CA16225). Targeting mitochondrial fusion and fission proteins for cardioprotection // J. Cell. Mol. Med. – 2020. – Vol. 24, No. 12. – P. 6571–6585. DOI: 10.1111/jcmm.15384
5. Dia M., Gomez L., Thibault H., Tessier N., Leon C., Chouabe C., Ducreux S., Gallo-Bona N., Tubbs E., Bendridi N., Chanon S., Leray A., Belmudes L., Couté Y., Kurdi M., Ovize M., Rieusset J., Paillard M. Reduced reticulum-mitochondria Ca^{2+} transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy // Basic. Res. Cardiol. – 2020. – Vol. 115, No. 6. – Art. No. 74. DOI: 10.1007/s00395-020-00835-7
6. Wang P., Xu S., Xu J., Xin Y., Lu Y., Zhang H., Zhou B., Xu H., Sheu S.S., Tian R., Wang W. Elevated MCU Expression by CaMKIIδB Limits Pathological Cardiac Remodeling // Circulation. – 2022. – Vol. 145, No. 14. – P. 1067–1083. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055841
7. Wolf P., Schoeniger A., Edlich F. Pro-apoptotic complexes of BAX and BAK on the outer mitochondrial membrane // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res. – 2022. – Vol. 1869, No. 10. – Art. ID: 119317. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2022
8. Marchi S., Guilbaud E., Tait S.W.G., Yamazaki T., Galluzzi L. Mitochondrial control of inflammation // Nat. Rev. Immunol. – 2022. – P. 1–15. DOI: 10.1038/s41577-022-00760-x
9. Kafkova A., Trnka J. Mitochondria-targeted compounds in the treatment of cancer // Neoplasma. – 2020. – Vol. 67, No. 3. – P. 450–460. DOI: 10.4149/neo_2020_190725N671
10. Zhu Y., Luo M., Bai X., Li J., Nie P., Li B., Luo P. SS-31, a Mitochondria-Targeting Peptide, Ameliorates Kidney

Disease // Oxid. Med. Cell Longev. – 2022. – Vol. 2022. – Art. ID: 1295509. DOI: 10.1155/2022/1295509
11. Chouchani E.T., Pell V.R., Gaude E., Aksentijević D., Sundier S.Y., Robb E.L., Logan A., Nadtochiy S.M., Ord E.N.J., Smith A.C., Eyassu F., Shirley R., Hu C.H., Dare A.J., James A.M., Rogatti S., Hartley R.C., Eaton S., Costa A.S.H., Brookes P.S., Davidson S.M., Duchen M.R., Saeb-Parsy K., Shattock M.J., Robinson A.J., Work L.M., Frezza C., Krieg T., Murphy M.P. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS // Nature. – 2014. – Vol. 515, No. 7527. – P. 431–435. DOI: 10.1038/nature13909
12. Wang D., Liu F., Yang W., Sun Y., Wang X., Sui X., Yang J., Wang Q., Song W., Zhang M., Xiao Z., Wang T., Wang Y., Luo Y. Meldonium Ameliorates Hypoxia-Induced Lung Injury and Oxidative Stress by Regulating Platelet-Type Phosphofructokinase-Mediated Glycolysis // Front. Pharmacol. – 2022. – Vol. 13. – Art. ID: 863451. DOI: 10.3389/fphar.2022.863451
13. Dedkova E.N., Seidlmayer L.K., Blatter L.A. Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2013. – Vol. 59. – P. 41–54. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.016
14. Балыкова Л.А., Ивянский С.А., Самошкина Е.С., Чигинева К.Н., Варлашина К.А., Плешков С.А. Стимуляторы работоспособности в спортивной медицине: многообразие выбора и влияния на здоровье // Consilium Medicum. Педиатрия. – 2017. – № 4. – С. 78–83.
15. Görgens C., Guddat S., Dib J., Geyer H., Schänzer W., Thevis M. Mildronate (*Meldonium*) in professional sports – monitoring doping control urine samples using hydrophilic interaction liquid chromatography – high resolution/high accuracy mass spectrometry // Drug Test. Anal. – 2015. – Vol. 7, No. 11–12. – P. 973–979. DOI: 10.1002/dta.1788
16. Wikstrom M.K. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria // Nature. – 1977. – Vol. 266, No. 5599. – P. 271–273. DOI: 10.1038/266271a0
17. Стаценко М.Е., Шилина Н.Н., Туркина С.В. Применение мельдония в комплексном лечении больных с сердечной недостаточностью в раннем постинфарктном периоде // Терапевтический архив. – 2014. – Т. 86. – №. 4. – С. 30–35.
18. Танашян М.М., Раскуражев А.А., Заславская К.Я., Кузнецова П.И., Меркулова И.Ю. Новые возможности нейропротективной терапии пациентов в остром и раннем восстановительном периоде ишемического инсульта // Терапевтический архив. – 2022. – Т. 94, № 6. – С. 748–755. DOI: 10.26442/00403660.2022.06.201743
19. Патент РФ № 2527519. Мягкие катионные митохондриальные разобщители. Авторы: Скулачев В.П., Скулачев М.В., Зиновкин Р.А., Северин Ф.Ф., Антоненко Ю.Н., Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю., Исаев Н.К., Силачёв Д.Н., Кнорре Д.А. Патентообладатель ООО «Митотех». 2011. № публикации WO/2011/162633.
20. Blaikie F.H., Brown S.E., Samuelsson L.M., Brand M.D., Smith R.A., Murphy M.P. Targeting dinitrophenol to mitochondria: limitations to the development of a self-limiting mitochondrial protonophore // Biosci. Rep. – 2006. – Vol. 26, No. 3. – P. 231–243. DOI: 10.1007/s10540-006-9018-8
21. Jespersen N.R., Yokota T., Støttrup N.B., Bergdahl A., Paelestik K.B., Povlsen J.A., Dela F., Bøtker H.E. Pre-ischaemic mitochondrial substrate constraint by inhibition of malate-aspartate shuttle preserves mitochondrial function after ischaemia-reperfusion // J. Physiol. – 2017. – Vol. 595, No. 12. – P. 3765–3780. DOI: 10.1113/JP273408
22. Wang D., Liu F., Yang W., Sun Y., Wang X., Sui X., Yang J., Wang Q., Song W., Zhang M., Xiao Z., Wang T., Wang Y., Luo Y. Meldonium Ameliorates Hypoxia-Induced Lung Injury and Oxidative Stress by Regulating Platelet-Type Phosphofructokinase-Mediated Glycolysis // Frontiers in pharmacology. – 2022. – Vol. 1. – Art. ID: 863451. DOI: 10.3389/fphar.2022.863451
23. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Нигарян С.А. Церебропротективное действие некоторых фенолокислот в условиях экспериментальной ишемии головного мозга // Фармация и фармакология. – 2019 – Т. 7. № 6. – С. 332-339. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-332-338
24. Sun Y., Zhang Y., Cheng B., Dong Y., Pan C., Li T., Xie Z. Glucose may attenuate isoflurane-induced caspase-3 activation in H4 human neuroglioma cells // Anesth. Analg. – 2014. – Vol. 119, No. 6. – P. 1373–1380. DOI: 10.1213/ANE.0000000000000383
25. Sarkar S., Mondal J. Mechanistic Insights on ATP's Role as a Hydrotrope // J. Phys. Chem. B. – 2021. – Vol. 125, No. 28. – P. 7717–7731. DOI: 10.1021/acs.jpcb.1c03964
26. Franco-Iborra S., Vila M., Perier C. The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We at? // Neuroscientist. – 2016. – Vol. 22, No. 3. – P. 266–277. DOI: 10.1177/1073858415574600257619 46.

АВТОРЫ

Журавлева Марина Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет); заместитель начальника научного отдела клинической фармакологии Института исследований и разработок ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9198-8661. E-mail: mvzhuravleva@mail.ru

Грановская Марина Викторовна – адьюнкт профессора Института системной биологии Университетского колледжа Дублина, Дублин, Ирландия. ORCID ID: 0000-0002-6867-5376. E-mail: mgranovsk@gmail.com

Заславская Кира Яковлевна – ассистент кафедры биологической и фармацевтической химии с курсом организации и управления фармацией Медицинский институт ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-7348-9412. E-mail: kiryonok@yandex.ru

Казаишвили Юрий Георгиевич – кандидат биологических наук, ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-0826-4177. E-mail: ykaza@bk.ru

Щербакова Виктория Сергеевна – кандидат биологических наук, ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7251-8744. E-mail: Victoria_kaptar@mail.ru

Андреев-Андриевский Александр Александрович – руководитель отдела исследований на животных, ГНЦ РФ ИМБП РАН. ORCID ID: 0000-0002-1173-8153. E-mail: aaa@mitotech.ru

Поздняков Дмитрий Игоревич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5595-8182. E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Высоких Михаил Юрьевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных механизмов старения, НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ. ORCID ID: 0000-0002-4047-6201. E-mail: mikhail.vyssokikh@gmail.com

РЕДАКЦИОННАЯ СТАТЬЯ
ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241
DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-400

Научно-практический журнал
ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

CORRIGENDUM: «ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СНИЖЕНИЯ ВЕСА И БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СИБУТРАМИНСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ У ПАЦИЕНТОВ С АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ»

DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-3-289-304
Исправления: https://www.pharmpharm.ru/jour/article/view/1121

Т.Ю. Демидова[1], М.Я. Измайлова[1], С.Е. Ушакова[2], К.Я. Заславская[3], А.А. Одегова[4], В.В. Попова[5], М.Е. Невретдинова[6], А.Ф. Вербовой[7], П.А. Белый[8]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1
[2] Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Ивановская клиническая больница имени Куваевых»,
153025, Россия, г. Иваново, ул. Ермака, д. 52/2
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва»,
430005, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Ульянова, д. 26а
[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
610027, Россия, г. Киров, ул. К. Маркса, д. 112
[5] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
194100, Россия, г. Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2
6 Общество с ограниченной ответственностью «Практика здоровья»,
117624, Россия, г. Москва, ул. Скобелевская, д. 1
[7] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89
[8] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20/1

E-mail: t.y.demidova@gmail.com

Ключевые слова: ожирение; фармакотерапия; сибутрамин; метформин; Редуксин®; Редуксин® Форте

В опубликованной статье «Оценка эффективности снижения веса и безопасности применения сибутраминсодержащих лекарственных препаратов у пациентов с алиментарным ожирением» авторами была обнаружена ошибка: случайным образом, в силу технической ошибки с нашей стороны и без какого-либо злого умысла, была поставлена фамилия автора А.Ф. Вербового, не принимавшего непосредственного участия в написании статьи и не внесшего большой вклад в работу. Исправленный список авторов приведен ниже.

Т.Ю. Демидова, М.Я. Измайлова, С.Е. Ушакова, К.Я. Заславская, А.А. Одегова, В.В. Попова, М.Е. Невретдинова, П.А. Белый

Ошибка произошла по вине всего авторского коллектива, но не изменяет сути изложенных в статье данных, не нарушает их восприятие читателями или интерпретацию.

Коллектив авторов подтверждает достоверность указанных в настоящем письме сведений о составе авторского коллектива, и то, что вклад каждого автора соответствует рекомендациям ICMJE. Исходная статья обновлена.

ВМЕСТЕ ПРОТИВ ВИРУСОВ

Современные препараты направленной этиотропной противовирусной терапии

эффективны против РНК-вирусов, вызывающих простудные заболевания*

*Е.П. Амон, Е.В. Эсауленко, А.В. Таганов, М.А. Ширяева, Е.Ю. Малинникова. Терапия острых респираторных вирусных инфекций в амбулаторной практике в условиях пандемии COVID-19. Терапия. 2022; 3: 14–26. Doi: https://dx.doi.org/10.18565/therapy. 2022. 3. 14–26. Петров В.А., Потапов А.Л., Ледовская Т.И., Таганов А.В. Опыт применения новых противовирусных препаратов у коморбидных пациентов в условиях пандемии. FOCUS Эндокринология. 2022. DOI: 10.47407/ef 2022. 3.1. p012. Новые возможности этиотропной терапии коронавирусной инфекции. В.П. Чуланов, Д.Ю. Пушкарь, А.В. Горелов, Л.А. Балыкова, Д.А. Лиознов, А.С. Дмитриев, К.Б. Колонтарев, А.Г. Малявин, А.В. Будневский, Е.В. Эсауленко, Н.Ю. Пшеничная, Х.Г. Омарова, А.В. Таганов, В.А. Петров. Инфекционные болезни, 2022, т. 20, №2. стр. 120-122.

ИНФОРМАЦИЯ ПРЕДНАЗНАЧЕНА ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ. ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ РЕКОМЕНДУЕТСЯ ОЗНАКОМИТЬСЯ С ИНСТРУКЦИЕЙ

ПРОМОМЕД

ООО ПРОМОМЕД ДМ
129090 Москва, Проспект Мира, 13, стр. 1, офис 106
Тел.: +7 (495) 640-25-28 www.promo-med.ru

ЭСПЕРАВИР РУ ЛП-007856
СКАЙВИРА РУ ЛП-008056
АРЕПЛИВИР ЛП-007609

ПМФИ
Филиал ВолгГМУ