ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

XI ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ СТУДЕНТОВ И АСПИРАНТОВ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО»

15 марта – 23 апреля 2021 года

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ КОНФЕРЕНЦИИ

PROCEEDINGS OF THE CONFERENCE

ТОМ 1

ВЕРТЕКС ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ

Полисан

ГЕРОФАРМ

BIOCAD Biotechnology Company

СПбНИИВС

NOVARTIS

FarmBioLine

Итоги конкурсной программы научных работ
XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов
с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего»

Трансляция пленарного заседания

https://spcpu.ru/himfarm_life/events/2510/

Официальная страница
XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов
с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего»

http://www.ypharm.spcpu.ru

young.pharm@pharminnotech.com

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**XI ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
СТУДЕНТОВ И АСПИРАНТОВ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

«МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО»

15 марта – 23 апреля 2021 года

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ КОНФЕРЕНЦИИ

PROCEEDINGS OF THE CONFERENCE

ТОМ 1

УДК 615.1+661.12(063)
ББК 52.82+52.81я54
М75

М75 «Молодая фармация – потенциал будущего», XI всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием (11 ; 2021; Санкт-Петербург). Сборник материалов конференции=Proceeding of the conference «Молодая фармация – потенциал будущего», 15 марта – 23 апреля 2021г.: в. 2 т. Т.1. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2021 . – 448, [18] с. : ил.

ISBN 978-5-8085-0521-6 (т. 1)
ISBN 978-5-8085-0520-9 (общ.)

Сборник содержит тезисы докладов студентов, аспирантов, соискателей, стажеров-исследователей, молодых ученых ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России и других фармацевтических, медицинских и технических вузов Российской Федерации и ряда других государств, представленные на XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», 2021 г.

Все материалы публикуются в авторской редакции.

УДК 615.1+661.12(063)
ББК 52.82+52.81я54

ISBN 978-5-8085-0521-6 (т. 1)
ISBN 978-5-8085-0520-9 (общ.)

© Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2021

Уважаемые коллеги!

Рад приветствовать гостей и участников XI Всероссийской конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – Потенциал будущего»!

Данная конференция традиционно является платформой для обсуждения актуальных вопросов интенсивно развивающейся фармацевтической отрасли. Конференция дает возможность научной коммуникации, обмена знаниями и опытом как между студентами, аспирантами и их научными руководителями – представителями учебных заведений Российской Федерации и иностранных вузов-партнеров, так и с представителями фармацевтических компаний, а также является уникальной площадкой демонстрации последних достижений фармацевтической отрасли.

В этом году, в силу сложившейся сложной эпидемиологической обстановки, конференция пройдёт в онлайн-формате. Не смотря на это, организационный комитет будет способствовать тому, чтобы конференция стала масштабным событием, отвечающим современным вызовам. В ходе дискуссии участникам предстоит рассмотреть широкий круг актуальных профессиональных проблем, обменяться накопленным опытом и передовыми практиками.

Желаю всем участникам конференции плодотворной работы, интересных дискуссий, новых идей и достижения намеченных целей!

Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России
Игорь Анатольевич Наркевич

Уважаемые участники XI научной конференции «Молодая фармация – потенциал будущего»!

Я искренне убежден, что наука должна быть креативной и захватывающей, способной находить решения прежде, чем в них возникает острая необходимость. Поэтому ваша задача – стараться предугадывать потребности завтрашнего дня, опережать актуальность и быть готовыми к стихийному развитию событий. Пандемия-2020 ярко показала важность оперативных действий в науке, которые стали жизненно необходимыми.

С химико-фармацевтическим университетом мы давние партнеры и друзья: в компании работает значительное количество выпускников важнейшей кузницы кадров для фарминдустрии. Это одна из причин, по которой «ВЕРТЕКС» ежегодно поддерживает конференцию – ключевое мероприятие отрасли для любознательной молодежи со своим взглядом на мир. Она создает возможности: участникам – для старта и проверки на прочность научных подходов, фармпроизводителям – для изучения интересов молодых ученых, перспективных направлений, ценных идей. Все это позволяет компаниям сделать ставку на редких профессионалов.

Два последних года «ВЕРТЕКС» входит в Рейтинг работодателей России (проект HeadHunter). Компания включена в топ-10 крупных компаний с численностью от 1001 до 5000 сотрудников в категории «Фармацевтика и медицина».

Сегодня штат компании превышает 1700 сотрудников. Молодые перспективные талантливые специалисты – ее будущее.

Желаю вам не растерять смелости и драйва, уметь открываться переменам, находить возможности для роста даже в непростых условиях, смотреть на науку с точки зрения глобальных перспектив и быть первопроходцами.

Пусть у вас всегда будут силы, импульс и желание менять мир.

Каждому из вас жму руку и приветствую новые открытия!

С уважением,
Георгий Побелянский,
генеральный директор фармацевтической компании «ВЕРТЕКС»

ВЕРТЕКС
Фармацевтическая компания

Уважаемые коллеги!

Приветствую всех участников конференции XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО».

Ситуация мировой пандемии продемонстрировала высокий приоритет задач, которые в настоящее время стоят как перед мировой, так и перед российской фармацевтикой. Поэтому кадровый потенциал отрасли приобретает особое значение.

Сегодня российская школа высшего образования готовит высококвалифицированных специалистов, которые становятся драйверами выхода фармацевтики на новый уровень развития. ГЕРОФАРМ ежегодно поддерживает конференцию и уделяет большое внимание работе с молодыми специалистами. Компания реализует профориентационные программы для школьников, развивает партнёрство и образовательные проекты с ведущими университетами и профильными факультетами.

Ежегодно ГЕРОФАРМ организует стажировки на собственных инфраструктурных объектах, после которых принимает на работу зарекомендовавших себя талантливых выпускников, предоставляя им возможности для раскрытия потенциала и развития в компании.

Генеральный директор компании ГЕРОФАРМ
Петр Родионов

ГЕРОФАРМ

Уважаемые участники конференции, я рад вас приветствовать!

Мы всегда с большим интересом принимаем участие в конференции.

В научных и производственных успехах ПОЛИСАНа особо заметен вклад выпускников университета, в их лице компания приобрела ценных специалистов, которые на протяжении многих лет вносят ощутимый вклад в повышение эффективности деятельности ПОЛИСАНа и во благо качества жизни и здоровья людей.

Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет – это центр притяжения для талантливой молодёжи, наш надежный партнер и верный помощник в решении кадровых вопросов.

Желаю всем участникам конференции уверенного движения вперед!

Генеральный директор
ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»
Дмитрий Борисов

Полисан

Уважаемые коллеги и дорогие друзья!

Рад приветствовать всех участников XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО». За 11 лет данная конференция стала востребованной площадкой для обмена опытом и обсуждения прорывных технологий в фармацевтике, которые способны изменить наше будущее к лучшему.

Для компании BIOCAD популяризация науки является одним из ключевых направлений, мы активно сотрудничаем с образовательными учреждениями и поддерживаем талантливых специалистов. Наша команда постоянно растет и развивается, поэтому мы готовы предложить молодым ученым площадку для профессиональной реализации на базе нашего современного биотехнологического производства совместно с высококвалифицированными сотрудниками компании. В России 2021 год объявлен годом науки и технологий и только вместе мы можем увеличить научный потенциал нашей страны!

Мы рады нашему сотрудничеству с Санкт-Петербургским химико-фармацевтическим университетом и выражаем особую благодарность за вклад в развитие российской фармацевтической отрасли.

От лица компании BIOCAD желаю удачи и успехов всем участникам конференции!

Генеральный директор компании BIOCAD
Морозов Д.В.

BIOCAD
Biotechnology Company

Уважаемые организаторы и участники XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО».

От компании Фармбиолайн и от себя лично сердечно приветствую участников, гостей и организаторов конференции и поздравляю с открытием столь представительной научной площадки для диалога науки и бизнеса, а также спешу поблагодарить всех за ваши усилия направленные на проведение этого важного и значимого мероприятия в области науки и биотехнологий.

События 2020 года изменили привычный ход жизни каждого человека на планете. Все мы почувствовали как в одночасье меняется Наша Планета.

Развитие научных технологий стремительно меняет все сферы экономики, и от вас, молодые ученые зависит насколько органично и быстро наше государство вольётся в этот «стремительный поток».

Современная наука требует молодых, профессиональных, прогрессивных, высокоорганизованных, увлеченных специалистов.

И эта конференция стала местом концентрации стремящихся к познанию нового, пытливых и неравнодушных людей.

2021 год объявлен в России годом Науки, и на мой взгляд у молодых специалистов все чаще появляется возможность для реализации своего творческого потенциала.

Ведь будущее науки, технологий напрямую зависит от вашего трудолюбия, увлеченности, способностей и целеустремленности.

Хочу пожелать уважаемым участникам конференции новых знаний, открытий, жарких дискуссий и успехов в реализации своих талантов и возможностей.

Уверен, что XI Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО» пройдет на высоком профессиональном уровне, станет важной вехой для молодого поколения ученых и позитивно отразится в укреплении связей науки, производства и бизнеса.

Генеральный директор ООО «Фармбиолайн»
А.С. Старовойтов

FarmBioLine

Уважаемые коллеги!

Приветствую участников XI Всероссийской научной конференции с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО».

Пандемия новой коронавирусной инфекции обнажила перед наукой, медициной и обществом всего мира глобальные проблемы – оперативное противостояние вирусу, разработка вакцин и лекарственных препаратов в кратчайший срок, пересмотр системы здравоохранения в целом. Сейчас, как никогда развитие кадрового потенциала, поиск талантливых молодых специалистов особенно актуален.

СПбНИИВС уделяет большое внимание профориентационной работе с молодыми специалистами, начиная уже со школьной скамьи. Ежегодно мы реализуем мероприятия по популяризации наукоемких профессий, биотехнологии, проводим детские научные конференции, умные каникулы, трудовой отряд школьников, стажировки и многое другое. В том числе реализуем международный профориентационный проект BioNica в Латинской Америке, развивая кадровый потенциал в регионе присутствия своего дочернего предприятия.

Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет – наш давний партнер и золотой фонд талантливых молодых специалистов. Вместе мы ведем работу с магистрами НОЦ «Иммунобиотехнология» СПХФУ на площадке СПбНИИВС.

От лица СПбНИИВС желаю ярких успехов участникам конференции!

Директор СПбНИИВС
Виктор Павлович Трухин

СПбНИИВС

Технология направленного синтеза для получения активных фармацевтических субстанций

Секция «Технология направленного синтеза для получения активных фармацевтических субстанций» открывала второй этап XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» 13 апреля. В работе приняли участие студенты, магистранты и аспиранты университетов и научно-исследовательских институтов России и Финляндии.

Необходимо отметить значительное разнообразия тем докладов, среди которых можно выделить несколько направлений органического синтеза и химической технологии фармацевтических субстанций, такие как химия и технология биологически активных карбоциклических и гетероциклических соединений, изучение новых германийсодержащих органических соединений, процессы сокристализации лекарственных веществ, синтез новых природных материалов на основе аминирования лигнина, поиск новых технологий получения вспомогательных веществ для фармацевтической промышленности на примере микрокристаллической целлюлозы, синтез модицфицированных дипептидов и другие.

Такое разнообразие тем вызвало неподдельный интерес со стороны всей аудитории секции, значительное количество вопросов и дискуссию, нацеленную на продолжение работы и сотрудничество в дальнейшем между участниками и университетами, которые они представляли.

Также в работе секции приняли участие партнеры и спонсоры конференции, представители одной из ведущих фармацевтических компаний России АО Вертекс, а также наши специалисты инжинирингового центра Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева.

В результате продолжительных обсуждений и дискуссий была отмечена актуальность, теоретическая и практическая значимость для науки и отрасли всех докладов и при этом был сделан нелегкий выбор победителя секции – лучшего среди равных. Им стал Панков Денис Игоревич с докладом на тему «Кокристаллизация дигидрокверцетина с аскорбиновой кислотой *in vitro* и *in silico*».

Без сомнений, работа секции «Технология направленного синтеза для получения активных фармацевтических субстанций» стала заметным событием в химической науке.

Модератор секции
Борис Юрьевич Лалаев
заведующий кафедрой химической технологии лекарственных веществ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России,
канд. хим. наук., доцент

Технология направленного синтеза для получения активных фармацевтических субстанций

14 апреля 2021 15:00

Трансляция заседания тематической секции доступна по ссылке и QR-коду

https://spcpu.ru/himfarm_life/events/2485/

Научный редактор секции

Чернов Никита Максимович, доцент кафедры органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. хим. наук

Кафедра органической химии

Яковлев Игорь Павлович, заведующий кафедрой органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, д-р. хим. наук, профессор

Кафедра химической технологии лекарственных веществ

Лалаев Борис Юрьевич, заведующий кафедрой химической технологии лекарственных веществ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. хим. наук., доцент

Программа конференции доступна по ссылке и QR-коду

http://www.ypharm.spcpu.ru

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2-АЗОЛОВ С ПИРИДИНОВЫМ ФРАГМЕНТОМ

Акишина Е.А., асп. 3 года обучения, **Казак Д.В.**, магистрант
Руководитель: **Дикусар Е.А.**, канд. хим. наук, с.н.с.
ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»,
220072, Минск, ул. Сурганова, д. 13, Республика Беларусь
E-mail: che.semenovaea@gmail.com

Описан метод синтеза новых пиридинсодержащих 1,2-азолов (5-арилизоксазолов и 4,5-дихлоризотиазола) и их гидрохлоридов.

Ключевые слова: *изоксазол, изотиазол, сложные эфиры, гидрохлориды, 4-ацетилпиридин, 4-бензоилпиридин.*

Производные пиридина в виде различных модифицированных составляющих присутствуют в живых системах, и в качестве лекарственных средств могут быть использованы для лечения самых разнообразных болезней [1]. Предыдущие исследования показали, что производные изоксазола и изотиазола оказывают синергетический эффект в их композиции с известными инсектицидами, а также с химиотерапевтическими средствами, что позволяет уменьшить дозу этих агентов и, таким образом, снизить риск побочных токсических эффектов в химиотерапии рака [2]. Сочетание в одной молекуле фрагментов пиридина и 1,2-азолов может придать новые полезные свойства их коньюгатам. Кроме того, производные изоксазола и изотиазола образуют комплексы с палладием (II), которые проявляют высокую каталитическую активность в реакциях кросс-сочетания в водных средах [3].

Целью данной работы является разработка методики синтеза сложных эфиров 5-арилизоксазол- и 4,5-дихлоризотиазол-3-карбоновых кислот на основе 4-бензоил- и 4-ацетилпиридина.

ИК-спектры соединений записаны на Фурье-спектрофотометре Protege-460 фирмы Nikolet с приготовлением образцов в виде таблеток с KBr. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C сняты на спектрометре Avance-500 Bruker в $CDCl_3$ относительно остаточного сигнала растворителя [$CDCl_3$, δ_H 7.26, δ_C 77.2 м.д.]. Элементный анализ соединений выполнялся на CHNS-анализаторе Vario MICRO cube V1.9.7.

Производные 4-бензоил- и 4-ацетилпиридина **1, 2** были получены восстановлением этих соединений боргидридом натрия в изопропиловом спирте до фенил-, метил(пиридин-4-ил)метанолов **3, 4** с последующим их ацилированием хлорангидридами гетероциклсодержащих кислот в среде сухого диэтилового эфира при комнатной температуре в присутствии триэтиламина с образованием соответствующих сложных эфиров **5-12** с выходами 65-78% (рисунок 1). Соли гетероциклических аминов обычно обладают более высокой биологической активностью и биологической доступностью, чем исходные свободные основания [4], поэтому был осуществлен синтез иг х гидрохлоридов. Гидрохлориды сложных эфиров **13-20** получали пропусканием сухого хлористого водорода через эфирный раствор соединений **5-12**.

Разработаны препаративные методики синтеза новых пиридинсодержащих 1,2-азолов и их гидрохлоридов. Строение полученных соединений доказано данными элементного анализа и спектральными методами. Синтезированные гетероциклические соединения являются перспективными веществами для создания на их основе новых фармацевтических субстанций, а также могут рассматриваться в качестве потенциальных лигандов для получения комплексов переходных металлов и их последующего применения в качестве катализаторов реакций кросс-сочетания.

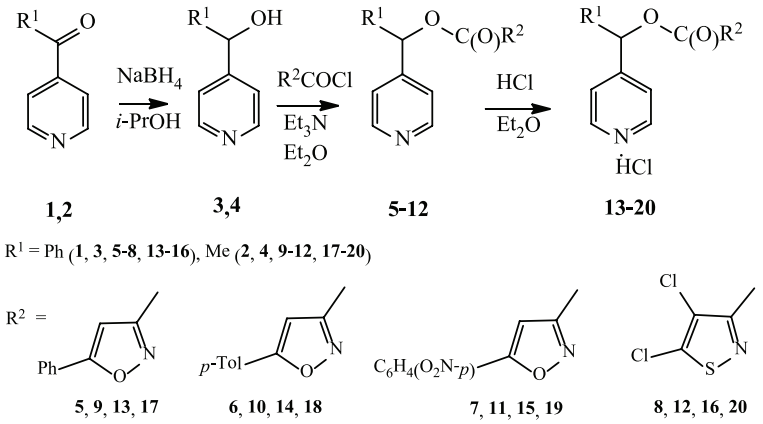


Рисунок 1. Синтез пиридинсодержащих производных 1,2-азолов

ЛИТЕРАТУРА

1. Altaf AA, Shahzad A, Gul Z et al. Review on the Medicinal Importance of Pyridine Derivatives. Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry. 2015;1(1):1-11. DOI: 10.11648/j.jddmc.20150101.11

2. Kulchitsky VA, Alexandrova R, Suziedelis K et al. Perspectives of Fullerenes, Dendrimers, and Heterocyclic Compounds Application in Tumor Treatment. Recent Pat. Nanomed. 2014;4(2):82-89. DOI: 10.2174/1877912305999150212114954

3. Bumagin NA, Potkin VI. Functionalized isoxazole and isothiazole ligands: design, synthesis, palladium complexes, homogeneous and heterogeneous catalysis in aqueous media. Russian Chemical Bulletin. 2016;65(2):321–332. DOI: 10.1007/s11172-016-1306-2

4. Дикусар ЕА, Козлов НГ, Поткин ВИ. Соли органических кислот и аминов. Синтез, структура, биологическая активность. Saarbrücken, Deutschland: LAP LAMBERT Academic Publishing / AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG;2013:250.

SUMMARY

SYNTHESIS OF 1,2-AZOLES DERIVATIVES WITH A PYRIDINE FRAGMENT

Akishina E.A., 3rd year PhD student, **Kazak D.V.**, master student
Institute of Physical and Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus;
13, Surganova St., Minsk, 220072, Republic of Belarus

A method for the synthesis of new pyridine-containing 1,2-azoles (5-arylisoxazoles and 4,5-dichloroisothiazole) and their hydrochlorides is described.

Key words: *isoxazole, isothiazole, esters, hydrochlorides, 4-acetylpyridine, 4-benzoylpyridine.*

REFERENCES

1. Altaf AA, Shahzad A, Gul Z et al. Review on the Medicinal Importance of Pyridine Derivatives. Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry. 2015;1(1):1-11. DOI: 10.11648/j.jddmc.20150101.11

2. Kulchitsky VA, Alexandrova R, Suziedelis K et al. Perspectives of Fullerenes, Dendrimers, and Heterocyclic Compounds Application in Tumor Treatment. Recent Pat. Nanomed. 2014;4(2):82-89. DOI: 10.2174/1877912305999150212114954

3. Bumagin NA, Potkin VI. Functionalized isoxazole and isothiazole ligands: design, synthesis, palladium complexes, homogeneous and heterogeneous catalysis in aqueous media. Russian Chemical Bulletin. 2016;65(2):321–332. DOI: 10.1007/s11172-016-1306-2

4. Dikusar EA, Kozlov NG, Potkin VI. Soli organicheskih kislot i aminov. Sintez, struktura, biologicheskaya aktivnost'. Saarbrücken, Deutschland: LAP LAMBERT Academic Publishing / AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG;2013:250. (in Russ)

СИНТЕЗ *N,N'*-[СУКЦИНИЛБИС(ОКСИ)]ДИБЕНЗАМИДОВ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Вахнина А.А., студ. 4 курса
Руководители: **Лалаев Б.Ю.**, к.х.н., заведующий кафедрой ХТЛВ, доц.;
Труханова Ю.А., магистрант 1 года обучения
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: vahnina.anna@pharminnotech.com

Разработан метод синтеза новых замещенных *N,N'*-[сукцинилбис(окси)]дибензамидов из соответствующих гидроксамовых кислот. Доказано строение полученных соединений. При помощи пакета программ PASS проведено компьютерное прогнозирование спектров биологической активности.

Ключевые слова: *N,N'-[сукцинилбис(окси)]дибензамид, сукцинилхлорид, биологическая активность, PASS-Online.*

В настоящее время, в литературе можно найти достаточно большое количество публикаций, посвященных гидроксамовым кислотам, что связано с их широким спектром биологической активности: противогрибковой, антибактериальной, гипотензивной и гипохолестеринемической [1]. Было обнаружено, что бензгидроксамовые кислоты ингибируют рибонуклеотидредуктазу млекопитающих и проявляют противоопухолевую активность [2]. Однако, малоизученными остаются реакции *O*-ацилирования бензгидроксамовых кислот производными дикарбоновых кислот.

Традиционным методом получения *O*-ацилированных производных гидроксамовых кислот является взаимодействие гидроксамовых кислот с хлорангидридами карбоновых кислот [3]. Нами в качестве исходных реагентов использовались бензгидроксамовая и 4-нитробензгидроксамовая кислоты и сукцинилхлорид.

В настоящем эксперименте для синтеза *N,N'*-[сукцинилбис(окси)]дибензамида (II а) к суспензии бензгидроксамовой кислоты (0,34 г, 2,5 ммоль) в сухом бензоле добавляли по каплям сукцинилхлорид (0,28 мл, 2,5 ммоль) и выдерживали при кипячении в течение 2-х часов (рисунок 1), окончание реакции фиксировали методом ТСХ. Получали осадок от почти белого до белого цвета с выходом 67%. Реакцию 4-нитробензгидроксамовой кислоты с сукцинилхлоридом проводили по аналогичной методики синтеза.

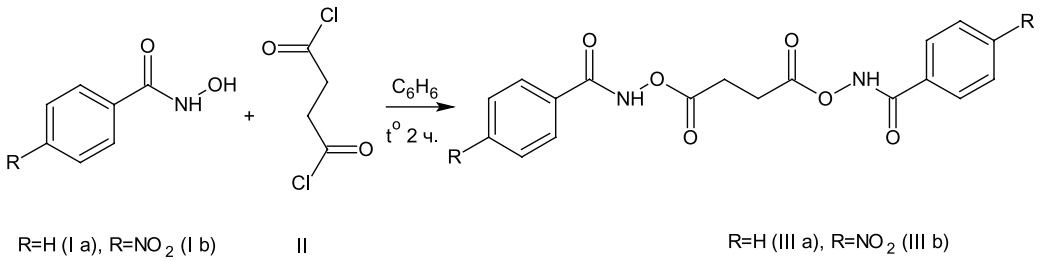


Рисунок 1. Ацилирование бензгидроксамовых кислот сукцинилхлоридом

Строение полученных соединений, было доказано спектроскопией ЯМР ^{1}H в ДМСО-d_6 (рисунки 2, 3).

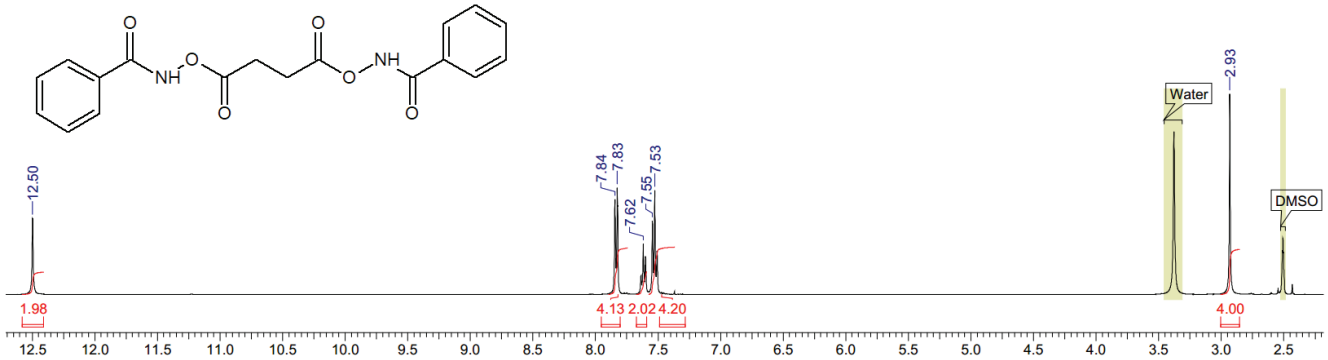


Рисунок 2. Спектр ЯМР ^{1}H *N,N'*-[сукцинилбис(окси)]дибензамида (III a)

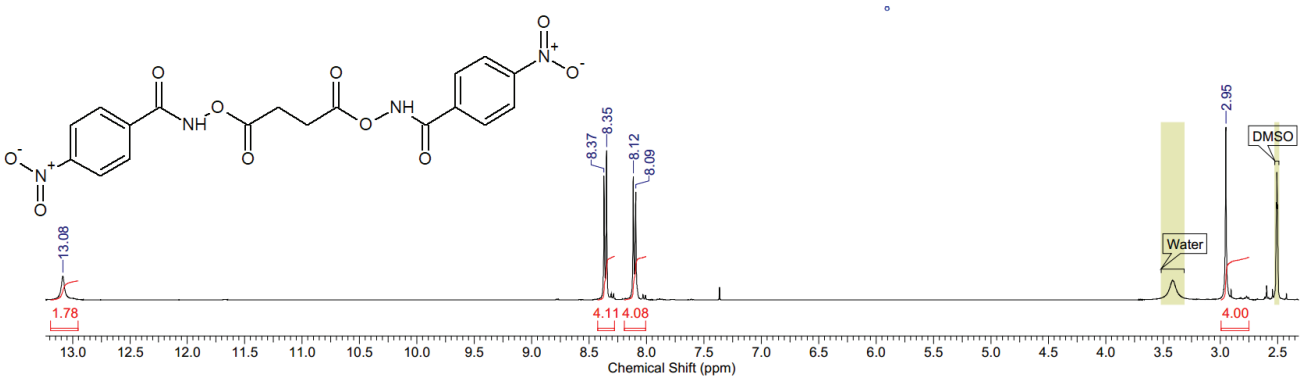


Рисунок 3. Спектр ЯМР ^{1}H *N,N'*-[сукцинилбис(окси)]бис(4-нитробензамида) (III b) в ДМСО-d_6

Для полученных соединений проводили компьютерное прогнозирование спектров биологической активности *in silico* с помощью программного обеспечения PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances).

Было установлено, что *N,N'*-[сукцинилбис(окси)]дибензамид (III a) с большей вероятностью обладает действием агониста гормона роста (0,929). С определённой вероятностью незамещённое соединение может применяться для лечения фобических расстройств (0,895), в качестве ингибитора метилентетрагидрофолатредуктазы (0,821) – одного из генов-кандидатов шизофрении, ингибитора глутамин-фенилпируваттрансаминазы (0,806) – фермента семейства трансфераз, переносящего азотистые группы. *N,N'*-[сукцинилбис(окси)]бис(4-нитробензамид) (III b) может также обладать свойствами агониста гормона роста (0,882). Обнаружены свойства ингибиторов акроцилиндропепсина – эндопептидазы (0,861), которая расщепляет белки на более мелкие пептиды, реннина – фермента из класса гидролаз, который вырабатывается в желудочных железах млекопитающих и широко используется в промышленности, сахаропепсина – фермента, гидролизующего белки с широкой специфичностью по пептидным связям, этот фермент присутствует в пекарских дрожжах.

В ходе выполненного исследования были получены новые *N,N'*-[сукцинилбис(окси)]дибензамиды (III a, b), доказано их строение. Скрининг биологической активности *in silico* показал широкий потенциал применения синтезированных структур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bauer L, Exner O. The Chemistry of Hydroxamic Acids and N-Hydroxyimides. Angewandte Chemie International Edition in English [Internet]. Wiley. 1974 Jun;13(6):376–84. DOI: 10.1002/anie.197403761

2. Van't Riet B, Wampler GL, Elford HL. Synthesis of hydroxy- and amino-substituted benzohydroxamic acids: inhibition of ribonucleotide reductase and antitumor activity. Journal of Medicinal Chemistry [Internet]. American Chemical Society (ACS). 1979 May;22(5):589–92. Available from: http://dx.doi.org/10.1021/jm00191a027

3. Al-Faiyz YSS, Clark AJ, Filik RP, Peacock JL, Thomas GH. Rearrangements of activated O-acyl hydroxamic acid derivatives. Tetrahedron Letters [Internet]. Elsevier BV; 1998 Mar;39(10):1269–72. DOI: 10.1016/s0040-4039(97)10773-0

4. Rajendra G, Miller MJ. Intramolecular electrophilic additions to olefins in organic syntheses. Stereoselective synthesis of 3,4-substituted beta.-lactams by bromine-induced oxidative cyclization of O-acyl .beta. gamma.-unsaturated hydroxamic acid derivatives. The Journal of Organic Chemistry [Internet]. American Chemical Society (ACS); 1987 Oct;52(20):4471–7. DOI: 10.1021/jo00229a009

5. Smith RA, Coles PJ, Spencer RW, Copp LJ, Jones CS, Krantz A. Peptidyl O-acyl hydroxamates: Potent new inactivators of cathepsin B. Biochemical and Biophysical Research Communications [Internet]. Elsevier BV; 1988 Sep;155(3):1201–6. DOI: 10.1016/s0006-291x(88)81267-1

SUMMARY

THE SYNTHESIS OF N,N'-(SUCCINYL(OXY))DIBENZAMIDES AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY PREDICTION

Vahnina A.A., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The method of N,N'-[succinylbis(oxy)]dibenzamides synthesis from corresponding hydroxamic acids was developed. The structures were confirmed by means of spectroscopic analyses of NMR 1H. Biological activity was predicted with the use of the software package PASS.

***Key words**: N,N'-[succinylbis(oxy)]dibenzamides, succinyl chloride, biological activity, PASS-Online.*

REFERENCES

1. Bauer L, Exner O. The Chemistry of Hydroxamic Acids and N-Hydroxyimides. Angewandte Chemie International Edition in English [Internet]. Wiley; 1974 Jun;13(6):376–84. DOI: 10.1002/anie.197403761

2. Van't Riet B, Wampler GL, Elford HL. Synthesis of hydroxy- and amino-substituted benzohydroxamic acids: inhibition of ribonucleotide reductase and antitumor activity. Journal of Medicinal Chemistry [Internet]. American Chemical Society (ACS); 1979 May;22(5):589–92. Available from: http://dx.doi.org/10.1021/jm00191a027

3. Al-Faiyz YSS, Clark AJ, Filik RP, Peacock JL, Thomas GH. Rearrangements of activated O-acyl hydroxamic acid derivatives. Tetrahedron Letters [Internet]. Elsevier BV; 1998 Mar;39(10):1269–72. DOI: 10.1016/s0040-4039(97)10773-0

4. Rajendra G, Miller MJ. Intramolecular electrophilic additions to olefins in organic syntheses. Stereoselective synthesis of 3,4-substituted beta.-lactams by bromine-induced oxidative cyclization of O-acyl .beta. gamma.-unsaturated hydroxamic acid derivatives. The Journal of Organic Chemistry [Internet]. American Chemical Society (ACS); 1987 Oct; 52(20):4471–7. DOI: 10.1021/jo00229a009

5. Smith RA, Coles PJ, Spencer RW, Copp LJ, Jones CS, Krantz A. Peptidyl O-acyl hydroxamates: Potent new inactivators of cathepsin B. Biochemical and Biophysical Research Communications [Internet]. Elsevier BV; 1988 Sep;155(3):1201–6. DOI: 10.1016/s0006-291x(88)81267-1

ВЗАИМОДЕЙСТ ВИЕ 6-БРОМ-3-ВИНИЛХРОМОНОВ С ГИДРАЗИНОМ

Кустин Р.П., аспирант 1 года обучения
Руководитель: **Чернов Н.М.**, канд. хим. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: kustin.roman@spcpu.ru

Описано взаимодействие представителей 6-бром-3-винилхромонов, имеющих разную конфигурацию электроноакцепторных групп в винильном фрагменте молекулы, с гидразином. Синтезированы азотсодержащие гетероциклические структуры со значительными выходами. Показано влияние электроноакцепторных групп винильного фрагмента молекулы на направление протекания реакции.

***Ключевые слова:** 3-винилхромон, пиразол, 2-пиридон, гидразин, цианакрилат, пропендиоат.*

Известно, что производные бензопиран-4-она, известные как хромоны, зарекомендовали себя в качестве перспективных как с позиции широкого спектра проявляемых ими видов биологической активности, так и с позиции стартового реагента при получении более сложных биоактивных веществ [1].

На данный момент известны методы получения самых разных производных хромонов, в том числе и 3-винилхромонов [2], но в то же время химические свойства таких производных достаточно подробно изучены лишь для некоторых представителей ряда. Анализ литературы показывает довольно фрагментарные данные по химии большей части таких представителей – в том числе и для хроменилакрилатов [3, 4]. Практически не описано взаимодействие 3-винилхромонов с бинуклеофильными реагентами.

Таким образом, целью работы явилось изучение поведения различных 3-винилхромонов в реакциях с бинуклеофилами, а именно с гидразином.

Нами было изучено поведение трёх структур ряда 3-винилхромонов – хроменилакрилата (**1**), хроменилпропендиоата (**2**) и хроменилцианакрилата (**3**) – в реакциях с гидразином, представителем 1,2-*N,N*-бинуклеофилов. Реакция протекает в этаноле при комнатной температуре при введении в реакцию гидразин гидрата в количестве 1.2 эквивалента (рисунок 1). Было установлено, что взаимодействие **1** с гидразином ведёт к рециклизации пироновой системы с образованием пиразольного производного **1a** с выходом 99%. Однако, введение в реакцию 3-винилхромона с двумя сложноэфирными группами **2** ведет к образованию этил-1-амино-5-(5-бром-2-гидроксибензоил)-2(1*H*)-оксопиридин-3-карбоксилату **2a**. В результате реакции **3** с гидразингидратом в спирте была выделена смесь этил-(2*E*)-3-[5-)5-бром-2-гидроксифенил)-1*H*-пиразол-3-ил]-пропеноата **3a** и необычного соединения, которое по спектрам ЯМР HMQC, HMBC и NOESY было охарактеризовано нами, как производное 1,7-диазабицикло[2.2.1]гепта-2,5-диена **3b**, в соотношении 2:1. Замена этанола на ледяную уксусную кислоту в качестве растворителя в последней реакции привело к преимущественному протеканию реакции по первому пути с образованием соответствующего пиразола **3a** с выходом 84%.

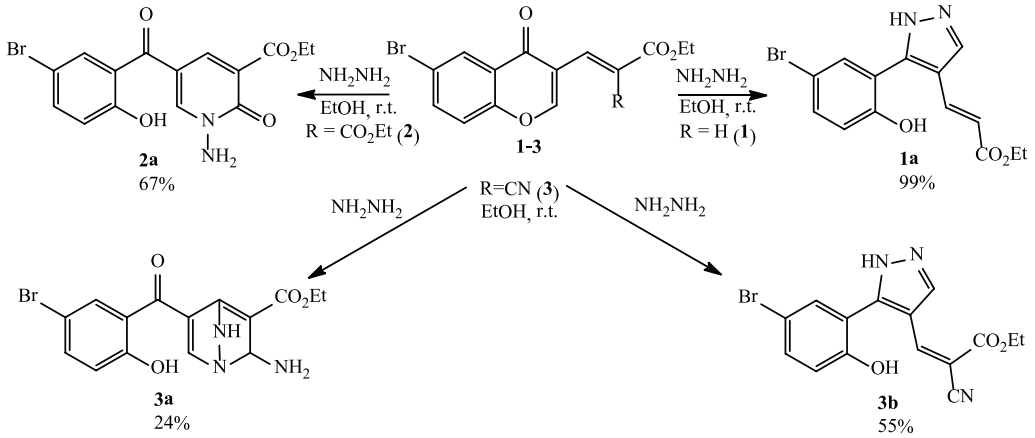


Рисунок 1. Взаимодействие производных 3-винилхромона с гидразином

В случае хромонилакрилата **1** реакция начинается, по-видимому, путём первой атаки нуклеофилом второго положения в хромоновом фрагменте с последующим размыканием цикла, после чего второй атаке подвергается карбонильный углерод в положении 4 хромона, таким образом замыкаясь в новую гетероциклическую структуру. Однако, при наличии второй сложноэфирной группы предполагаемый маршрут реакции с гидразин гидратом отличается: гидразин тут ведёт себя как мононуклеофил, чья аминогруппа сначала атакует углерод во втором положении, а потом – карбонильный углерод сложноэфирной группы с последующим отщеплением молекулы спирта, образуя, таким образом, 2-пиридоновый цикл. При взаимодействии **3** с гидразин гидратом после атаки субстрата нуклеофилом сначала С2-положения, а затем углерода цианогруппы вторая аминогруппа гидразина атакует кратную С-С связь, активированную сложноэфирной функцией, замыкая ещё один цикл. Далее иминный фрагмент гидролизуется до аминогруппы.

Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C растворов веществ записывали на спектрометре Bruker AM-400 (рабочая частота 400 МГц). Контроль хода реакции осуществлялся методом ТСХ на пластинах Silufol-UV-254, детектирование в УФ-свете.

Общая методика: К суспензии 0.002 моль соединений **1-3** в этаноле приливали 1.2 эквивалента гидразин гидрата и перемешивали при комнатной температуре. После окончания реакции отфильтровывали выпавший осадок (при наличии), подкисляли раствор 4М HCl, разбавляли водой и перемешивали до выпадения осадка. Осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили на воздухе. Выход 24-99%.

1. Изучено взаимодействие 3-винилхромонов с гидразин гидратом.
2. Показана вариативность пути протекания реакции при наличии разных электроноакцепторных групп в составе винильного фрагмента 3-винилхромона.
3. Строение полученных соединений доказано с помощью спектроскопии ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang YK, Lv ZL, Niu CJ, Li K. Synthesis and anti-HBV activity of novel 5-substituted pyridin-2(1H)-one derivatives. Chinese Chemical Letters [Internet]. Elsevier BV; 2010 Mar;21(3):290–2.

2. Ali TE-S, Ibrahim MA, El-Gohary NM, El-Kazak AM. 3-Formylchromones as diverse building blocks in heterocycles synthesis. European Journal of Chemistry [Internet]. European Journal of Chemistry; 2013 Sep 30;4(3):311–28.

3. Zhang Y, Lv Z, Zhang M, Li K. Re-cyclization of 3-(E)-methyl 3-(4-oxo-4H-chromen-3-yl)acrylate with amines and their potential mechanism. Tetrahedron [Internet]. Elsevier BV; 2013 Oct;69(42):8839–46.

4. Chand K, Prasad S, Tiwari RK, Shirazi AN, Kumar S, Parang K, et al. Synthesis and evaluation of c-Src kinase inhibitory activity of pyridin-2(1H)-one derivatives. Bioorganic Chemistry [Internet]. Elsevier BV; 2014 Apr;53:75–82.

SUMMARY

REACTION OF 6-BROMO-3-VINYLCHROMONES WITH HYDRAZINE

Kustin R.P., 1st year PhD student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Reaction between hydrazine hydrate and 3-vinylchromone derivatives with different configuration of EWG in vinyl fragment was described. Nitrogen-containing heterocycles was synthesized in high yields. An effect of EWG configuration in 3-vinylchromone on a reaction way was shown.

***Key words**: 3-vinylchromone, pyrazole, 2-pyridone, hydrazine hydrate, cyanacrylate, propenedioate.*

REFERENCES

1. Zhang YK, Lv ZL, Niu CJ, Li K. Synthesis and anti-HBV activity of novel 5-substituted pyridin-2(1H)-one derivatives. Chinese Chemical Letters [Internet]. Elsevier BV; 2010 Mar;21(3):290–2.

2. Ali TE-S, Ibrahim MA, El-Gohary NM, El-Kazak AM. 3-Formylchromones as diverse building blocks in heterocycles synthesis. European Journal of Chemistry [Internet]. European Journal of Chemistry; 2013 Sep 30;4(3):311–28.

3. Zhang Y, Lv Z, Zhang M, Li K. Re-cyclization of 3-(E)-methyl 3-(4-oxo-4H-chromen-3-yl)acrylate with amines and their potential mechanism. Tetrahedron [Internet]. Elsevier BV; 2013 Oct;69(42):8839–46.

4. Chand K, Prasad S, Tiwari RK, Shirazi AN, Kumar S, Parang K, et al. Synthesis and evaluation of c-Src kinase inhibitory activity of pyridin-2(1H)-one derivatives. Bioorganic Chemistry [Internet]. Elsevier BV; 2014 Apr;53:75–82.

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ АНАЛОГОВ 1-ГЕРМАТРАНОЛ-ГИДРАТА

Лёзов Д.В., асп. 2 курса обучения
Руководитель: **Кочина Т.А.**, докт. хим. наук, проф.
Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН, Санкт-Петербург,
199034, Санкт-Петербург, наб. Адм. Макарова, д. 2, Российская Федерация
E-mail: lyo-denis@yandex.ru

Нами было изучено взаимодействие GeO_2 с гидроксиалканоламинами в водной среде при нагревании (90 °C) при молярном соотношении 1:1 (в случае *N,N,N',N'*-тетракис(2-гидроксиэтил)этилендиамин (THEED)-2:1). В результате был получен новый ряд аналогов 1-герматранол-гидрата. Состав и структуру определяли элементным анализом, ЯМР (^{13}C, ^{1}H) и ИК-спектроскопией. Структура синтезированных соединений в данный момент исследуется методом рентгеноструктурного анализа. Биологическая активность была предсказана с помощью программы Pass.

***Ключевые слова:** 1-герматранол-гидрат, биологическая активность, GeO_2, гидроксиалканоламины, водная среда, гипервалентное состояние, трансаннулярная связь.*

Развитие химии германийорганических соединений в гипервалентном состоянии – герматранов, началось с 1965 года, когда впервые был сгенерирован атрановый фрагмент переалкоксилированием: взаимодействием трис- или тетракисалкоксидов германия с триалканоламинами [1]. Другим методом генерирования атранового остова является реакция GeO2 с алканоламинами в воде без участия катализаторов при 90°C, которая приводит к образованию гидроксигерматранов. Впервые такую реакцию провел М.Г. Воронков с участием GeO2 и триэтаноламина в воде и получил первого представителя герматранового ряда – 1-герматранол-гидрат (OHGe(OCH2CH2)3N). Полученное соединения имело атрановый остов и трансаннулярную связь N→Ge, образование и стабильность которой указывают на значительно большую гидролитическую устойчивость, а также на повышенную способность кислородных атомов образовывать водородные связи [2].

Дальнейшее изучение 1-герматранола (моногидрата) показало чрезвычайно низкую токсичность ($ЛД_{50}$ от 6000 до 10000 мг/кг). Соединение обладает широким спектром биологической активности: противоопухолевая, антиоксидантная, адаптогенная, противогипоксическая, нейротропная, актопротекторное действие. 1-Герматранол-гидрат стимулирует биосинтез иммуноглобулинов, стимулирует восстановительные процессы в организме вследствие усиления митохондриального (тканевого) дыхания в клетках организма [3]. Также изучено воздействие 1-герматранол-гидрат на активацию триптофанил-тРНК-синтетазы (ТРСазы). Результаты исследования показали, что 1-герматранол-гидрат в дозе 15 мкг/мл повышают экспрессию тРНК. 1-Герматранол-гидрат, будучи в меньшей дозе, проявляет более высокую активность, увеличивая экспрессию на 33-45% больше, чем трекрезан. Сообщалось, что

комбинация 1-герматранол-гидрата с рядом лекарственных средств усиливает их лечебный эффект и снижает побочное токсическое действие [4].

Реакция оксида германия с другими алканоламинами, например, диэтаноламином привела к образованию бициклического аналога 1-герматранол-гидрата – квазигерматрану ($(OH)_2Ge(OCH_2CH_2)_2NH$). Развитие исследований в этом направлении привели к получению моноциклического гипогерматранола ($(OH)_3Ge(OCH_2CH_2)NH_2$), синтезированному взаимодействием диоксида германия с 2-гидроксиэтиламином в водно-спиртовой среде при 80°C в отсутствие катализатора [5]. Согласно патенту CN 107245083 реакция GeO_2 с трис(2-гидроксипропил)амином привела к аналогу 1-герматранола-гидрата (рисунок 1). Однако его структура до сих пор не установлена методом рентгеноструктурного анализа.

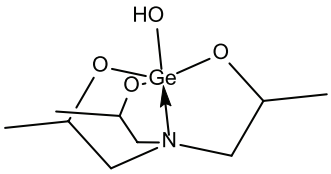


Рисунок 1. Производное GeO_2 с трис(2-гидроксипропил)амином

На сегодняшний день синтезирован небольшой ряд гидроксигерматранов, не изучена биологическая активность, что требует дальнейших исследований в этом направлении. В связи с этим, цель настоящей работы заключалась в получении ранее неизвестных герматранолов, путем взаимодействием диоксида германия в воде, со следующими гидроксиалканоламинами: трис(гидроксиметил)аминометан, бис(2-гидроксиэтил)-амино-трис(гидроксиметил)метан, *N,N,N',N'*-тетракис(2-гидроксиэтил)этилендиамин (THEED).

ИК-спектры регистрировали на FTIR-спектрометре Nicolet 8700 (Thermo Scientifc) с использованием прессованных гранул KBr. Элементный анализ был получен на элементном анализаторе Euro EA3028-NT для одновременного определения C, H и N. ЯМР-спектры соединений регистрировали в D_2O на спектрометре Bruker Avance III [400,13 (^1H), 100,613 МГц (^{13}C)]. Химические сдвиги, представленные ниже, относятся к остаточным сигналам D_2O (4,79 ppm для ^1H).

В результате синтеза были получены новые ранее не известные аналоги 1-герматранол-гидрата (рисунок 2), строение и состав которых изучено методами ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{13}C, ^1H и ИК-спектроскопии (таблица 1).

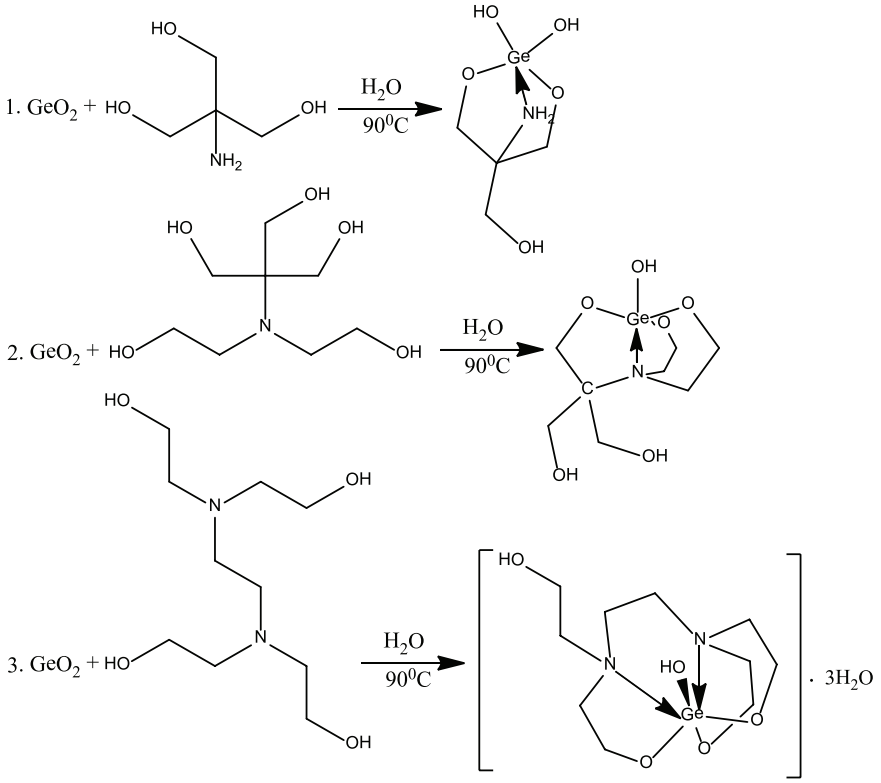
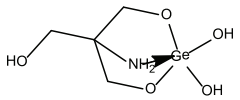
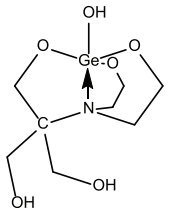
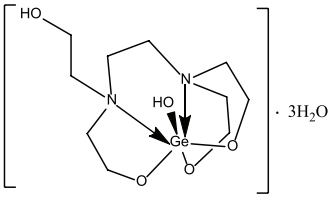


Рисунок 2. Схема синтеза аналогов 1-герматранол-гидрата с соответствующими гидроксиалканоламинами

Таблица 1 – Результаты ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{13}C, ^{1}H

Соединение	Спектр ЯМР ^{1}H (D_2O, δ, ppm, J, Hz)	Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O, δ, ppm)
	1.1 t (2H, CH_2, $^{3}J_{HH}$ 7.1); 3.6 t (4H, OCH_2, $^{3}J_{HH}$ 6.2)	16.2 (CH_2); 57.4, 61.7 (OCH_2); 58.3 (CNH_2)
	2.6 t (4H, NCH_2, $^{3}J_{HH}$ 7.1); 3.4 t (4H, CH_2, $^{3}J_{HH}$ 6.5); 3,6 t (4H, OCH_2, $^{3}J_{HH}$ 6.2)	45.0 (OCH_2); 49.2 (NCH_2); 60.8 (CH_2); 74.0 (CN)
	2.5 m (NCH_2); 3,7 t (OCH_2, $^{3}J_{HH}$ 5.9); 3.9 t (CH_2, $^{3}J_{HH}$ 6.5)	44.0 (OCH_2); 53.6 (NCH_2); 59.6 (CH_2)

Строение продукта взаимодействия GeO_2 с *N,N,N',N'*-тетракис(2-гидроксиэтил)этилендиамином (THEED) в соотношении исходных веществ 1:1 было доказано с помощью рентгеноструктурного анализа (рисунок 3).

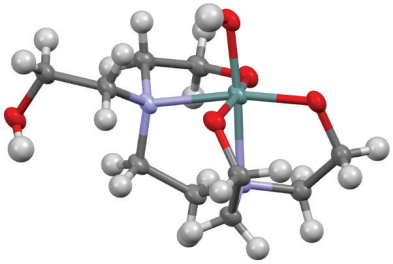
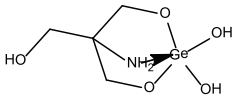
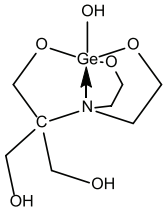
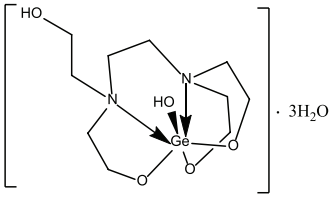


Рисунок 3. 5-(2-гидроксиэтил)-2,11,12-триокса-5,8-Диаза-1-гермабицикло[6.3.3]тетрадекан-1-ол

Новые аналоги 1-герматранол-гидрата, являются потенциальными биологически активными веществами, которые могут проявлять биологическую активность в различных областях медицины. Данные по предсказанию биологической активности представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты биологического действия аналогов 1-герматранол-гидрата, рассчитанное с помощью программы «Pass»

Аналоги 1-герматранол-гидрата	Биологическое действие
	Лечение аутоиммунных расстройств, лечение фобических расстройств, ревматоидный полиартрит
	Антигипоксическое действие, ингибитор сахарофосфатазы, лечение ревматоидного артрита
	Противовирусная активность (гепатит В), лечение желудочно-кишечных расстройств, ингибитор маннотетраозы, ацетилглюкозаминилтрансферазы

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров Санкт-Петербургского государственного университета «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Рентгенодифракционные методы исследования», «Магнитно-резонансные методы исследования» и «Методы анализа состава вещества».

ЛИТЕРАТУРА

1. Mehrotra RC. and G. Chandra «Reactions of ortho esters of germanium. VII. Reactions of alkyl orthogermanates with ethanolamines» Indian Journal of Chemistry. 1965;3:497-499.

2. Воронков МГ, Овчинникова ЗА, Барышок ВП. Синтез 1-герматранола и его С-замещенных. Изв. АН. СССР. Сер. Химия. 1987;4:880-882.

3. Герматранол-гидрат, стимулирующий экспрессию матричной РНК триптофанил-тРНК-синтетазы : пат. 2553986 Рос. Федерация. № 2014111732/04. Расулов ММ, Стороженко ПА, Снисаренко ТА, Сусова МИ, Барышок ВП, Воронков МГ, Подгорбунская ТА, Федорин АЮ, Оржековский АП. Заявл. 26.03.1. Опубл. 20.06.15. Бюл. № 17. 11 с.

4. Барышок ВП, Абзаева КА, Расулов ММ, Подгорбунская ТА. 1-герматранол-гидрат – активатор триптофанил-тРНК-синтетазы. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018;8(1):153–158.

5. Воронков МГ, Самохин ГС, Вражнов ДВ, Кочина ТА. Новые внутрикомплексные соединения пентакоординированного германия. гипогерматраны – Ge-замещенные (N→Ge) 2-окса-5-аза-1-германциклопентаны. Журнал общей химии. 2012;82(1):162-163.

SUMMARY

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW ANALOGUES OF 1-GERMATRANOL HYDRATE

Lezov D.V., asp. 2 courses of study
I. V. Grebenshchikov Institute of Silicate Chemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg,
199034, St. Petersburg, Adm. Makarova, 2, Russian Federation

We studied the interaction of GeO_2 with hydroxyalkanolamines in an aqueous medium under heating (90 °C) at a molar ratio of 1:1 (in the case of N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroxyethyl)ethylenediamine (THEED)-2:1). As a result, a new series of analogs of 1-germatranol hydrate was obtained. The composition and structure were determined by elemental analysis, NMR (^{13}C, ^{1}H) and IR spectroscopy. The structure of the synthesized compounds is currently being investigated by X-ray diffraction analysis. Biological activity was predicted using the Pass program.

Key words: *1-germatranol hydrate, biological activity, GeO_2, hydroxyalkanolamines, aqueous medium, hypervalent state, transannular bond.*

REFERENCES

1. Mehrotra RS and G. Chandra «Reactions of ortho esters of germanium. VII. Reactions of alkyl orthogermanates with ethanolamines». Indian Journal of Chemistry. 1965;3:497-499.

2. Voronkov MG, Ovchinnikova ZA, Baryshok VP. Synthesis of 1-germatranol and its C-substituted. Izv. AN. SSSR. Ser. Chemistry. 1987;4:880-882. (in Russ)

3. Germatranol hydrate, stimulating the expression of matrix RNA tryptophanyl-tRNA synthetase: pat. 2553986 Ros. Federation. No. 2014111732/04. Rasulov MM, Storozhenko PA, Snisarenko TA, Susova MI, Baryshok VP, Voronkov MG, Podgorbunskaya TA, Fedorin AYu, Orzhekovsky AP. Application No. 26.03.14. Publ. 20.06.15. Byul. No. 17. 11 p. (in Russ)

4. Baryshok VP, Abzaeva KA, Rasulov MM, Podgorbunskaya TA. 1-germatranol-hydrate-activator of tryptophanyl-tRNA-synthetase. Izvestiya vuzov. Applied Chemistry and Biotechnology. 2018$8(1):153-158. (in Russ)

5. Voronkov MG, Samokhin GS, Vrazhnov DV, Kochina TA. New intra-complex compounds of pentacoordinated germanium. hypohermatranes-Ge-substituted (N→Ge) 2-oxa-5-aza-1-germacyclopentanes. Journal of General Chemistry. 2012;82(1):162-163. (in Russ)

СИНТЕЗ ДИМЕТИЛАМИНОПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРЗАМЕЩЁННЫХ САЛИЦИЛАНИЛИДОВ

Лисовский Д.С., студ. 4 курса
Руководитель: **Дударев В.Г.**, к. х. н.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: lisovskij.dmitrij@pharminnotech.com

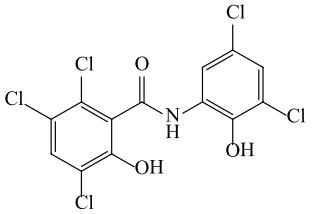
Предложены пути синтеза новых диметиламиноэтильных производных хлорзамещенного салициланилида с целью получения водорастворимых производных и расширения спектра антигельминтной активности.

Ключевые слова: *салициланилид, антигельминтная активность, диметиламиногруппа, водорастворимые лекарственные вещества.*

Уровень заболеваемости гельминтозами в Российской федерации, согласно данным, предоставленным Всемирной организацией здравоохранения, находится в районе 1% и составляет 4% в группе инфекционно-паразитарной патологии [1]. Для заболевания характерны: проявление аллергических реакций на антигены личинок, травмы органов и тканей в местах

обитания паразитов, иммуносупрессивное действие на организм носителя и, как следствие, уязвимость к бактериальным, вирусным и иным инфекциям. Используемые для лечения гельминтозов лекарственные средства характеризуются, как правило, высокой токсичностью и степенью проявления побочных эффектов. Одной из перспективных групп препаратов, применяемых в терапии гельминтозов, являются арилсалициламиды, однако их применение в медицине и ветеринарии часто ограничено вследствие крайне низкой растворимости в воде и малой биодоступности.

Таким образом, представляется актуальным поиск новых водорастворимых арилсалициламидов, обладающих антигельминтной активностью. В качестве основы в данной работе было использовано известное соединение, используемое в ветеринарии, оксиклозанид.



В работе использованы 2,4-дихлорфенол, 2-хлорэтилдиметиламина гидрохлорид, едкий натр, азотная и серная кислоты. Конец хода реакции и индивидуальность полученных соединений контролировали по ТСХ. Температуры плавления полученных веществ измерены капиллярным методом и не корректировали.

Предложены схемы синтеза диметиламиноэтильных производных, отличающиеся очерёдностью стадий нитрования, алкилирования и ацилирования (рисунки 1-3).

Установлено, что реакция диметиламиноэтилирования 2,4-дихлорфенола даже в отсутствие нитрогруппы проходит довольно долго (более 24 часов выдержки при температуре кипения в толуольной среде), и выход производного невелик.

По литературным данным известно, что 2,4-дихлоралкоксибензолы превращаются в 6-нитропроизводое с селективностью не более 80 %. Более однозначно нитрование проходит для 2,4-дихлорфенола, поэтому предпочтительно сначала провести нитрование, затем алкилирование фенолята.

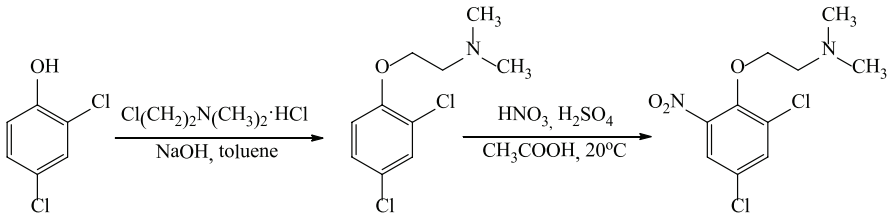


Рисунок 1. Синтез диметиламиноэтильного производного, вариант 1

В тоже время нуклеофильность 6-нитро-2,4-дихлорфенолята ещё более снижена из-за отрицательного индуктивного и мезомерного эффектов нитрогруппы. Тем не менее, если вместо диметиламиноэтилхлорида использовать дихлорэтан, то реакция проходит гладко с образованием практически чистого 2-хлорэтильного производного, без примеси продукта диалкилирования. Обработка этого вещества водным раствором диметиламина требует повышенного давления.

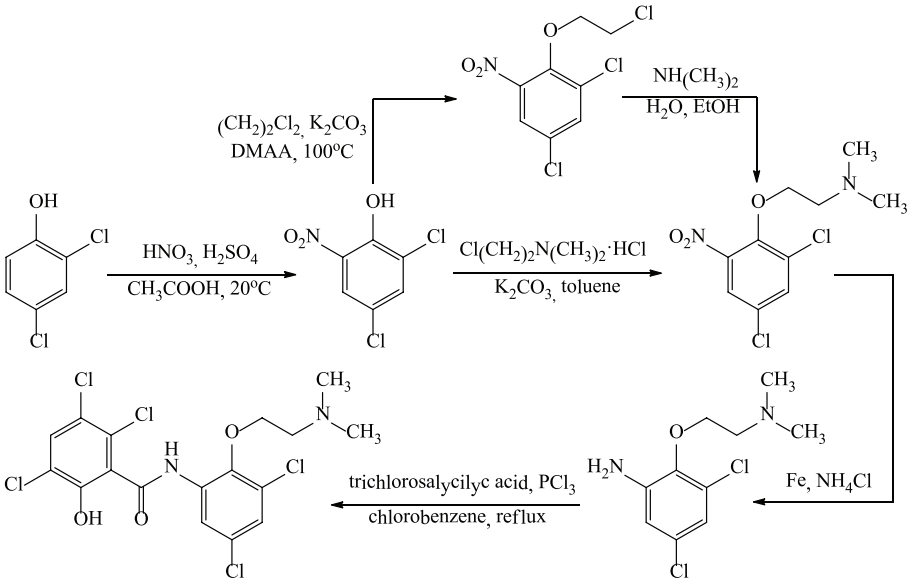


Рисунок 2. Синтез диметиламиноэтильного производного (вариант 2) с последующим ацилированием

В качестве третьего варианта синтеза предполагается алкилирование уже готового салициланилида. Проблемой этого подхода является побочная реакция алкилирования фенолята «кислотной» части молекулы.

Проведён сравнительный анализ возможных схем синтеза диметиламиноэтильного производного хлорзамещенного салициланилида. Более предпочтительной является схема, начинающаяся реакцией нитрования с последующим двухэтапным алкилированием.

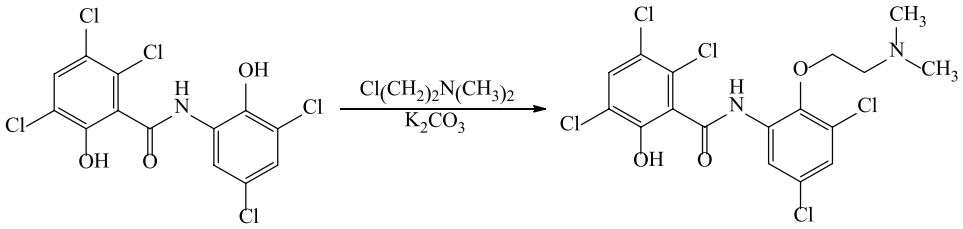


Рисунок 3. Диметиламиноэтилирование салициланилида (вариант 3)

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдюхина Т.И., Константинова Т.Н., Прокошева М.Н. Современный взгляд на проблему гельминтозов у детей и эффективные пути ее решения. Современная педиатрия. 2011;35(1):73-77.

SUMMARY

SYNTHESIS OF DIMETHYLAMINO DERIVATIVES OF CHLORO-SUBSTITUTED SALICYLANILIDES

Lisovsky, D. S., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The ways of synthesis of new dimethylaminoethyl derivatives of chloro-substituted salicylanilide with the aim of obtaining water-soluble derivatives and broadening the spectrum of anthelmintic activity have been proposed.

Key words: *salicylanilide, antihelminthic activity, dimethylamino-group, water-soluble drugs.*

REFERENCES

1. Avdyukhina TI, Konstantinova TN, Prokosheva MN. Modern view of the problem of helminthiasis in children and effective ways to solve it. Modern Pediatrics. 2011;35(1):73-77. (in Russ)

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 4,4а-ДИГИДРОКСАНТОНОВ

Лукьяненко В.И., асп. 2 года обучения
Руководитель: **Чернов Н.М.**, канд. хим. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: vladislav.lukyanenko@pharminnotech.com

Рассмотрено [4+2]-циклоприсоединение, как основной способ получения производных 4,4а-дегидроксантонов, обладающих широким спектром биологической активности: антибактериальной, иммуносупрессорной, цитотоксической. Благодаря оптимизации вышеуказанного способа был синтезирован ряд новых производных 4,4а-дигидроксантонов.

Ключевые слова: *дигидроксантоны, циклоприсоединение, хромонилакриловые производные, енамин, [1,5]-сигматропный сдвиг.*

В последние годы в фармацевтической отрасли все большее предпочтение отдается выделению природных биологически активных веществ из растительного и животного сырья или синтезу таких молекул в лаборатории. К этому же типу соединений можно отнести и объект нашего изучения – 4,4а-дигидроксантоны, которые изначально были выделены из гриба *Aspergillus sydowii*, а позже были получены и в лабораторных условиях. Такие природные соединения, несомненно, обладают большей безопасностью и хорошей эффективностью.

Молекула ксантона является трициклической кислородсодержащей системой (рис. 1). Дегидроксантоны имеют 9 различных изомеров, наибольшей биологической активностью из которых обладают 4,4а-производные.

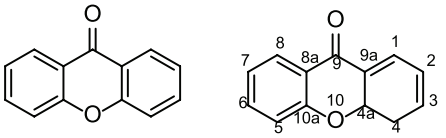


Рисунок 1. Структура ксантона (слева) и 4,4а-дигидроксантона (справа)

Основным подходом к синтезу 4,4а-дигидроксантонов является предложенная Bodwell с соавторами реакция циклоприсоединения (рисунок 2) [1]. В качестве диенов в данной реакции использовался эфир хромонакриловой кислоты, в качестве диенофилов – енаминовое производное пирролидина. При этом лишь в одном случае, когда у енамина R_1= H, R_2=R_3=CH_3, возможно образование дигидроксантона. При использовании других енаминов реакция вела к ароматизации кольца и получению бензофенонов.

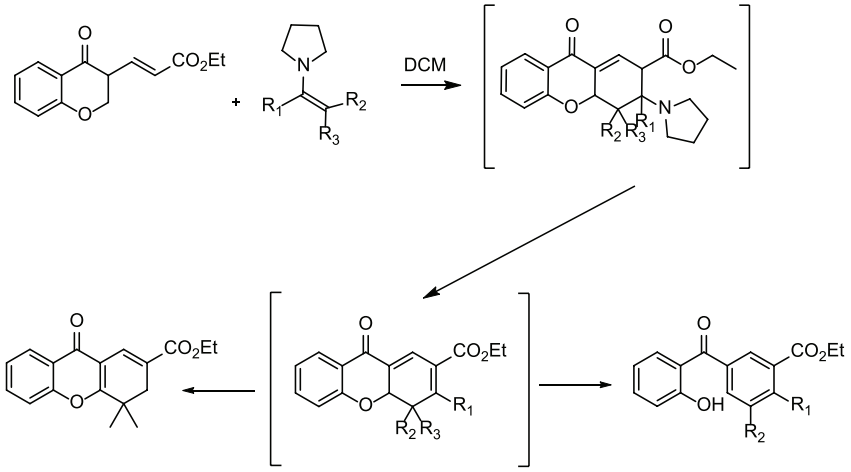


Рисунок 2. Синтез, предложенный Bodwell с соавторами в 2003 году

Главной проблемой в данном случае является [1,5]-сигматропный сдвиг, который приводит к образованию изомерных 3,4-дигидроксантонов, обладающих меньшей биологической активностью. Дальнейшие попытки модификации синтеза позволили получить ряд производных 4,4а-дигидроксантонов с карбоксильной группой [2]. В этом случае изомеризации в 3,4-дигидроксантоны отмечено не было. Было установлено, что причиной [1,5]-сигматропной перегруппировки является вторичный амин, который выделяется в ходе реакции. В эксперименте с хромонакриловыми кислотами он взаимодействует с карбоксильной группой и переходит в неактивную форму соли.

Анализируя вышеперечисленные факты, мы выбрали целью своего исследования разработку методики синтеза новых производных 4,4а-дигидроксантонов, не содержащих карбоксильную группу.

Объектом исследования стал ряд этиловых эфиров хромонилакриловых кислот **1** с различными заместителями R. В реакционную среду помимо исходного эфира и енамина **2** добавлялось 4 эквивалента ледяной уксусной кислоты, которая позволила связывать образующийся амин (рисунок 3).

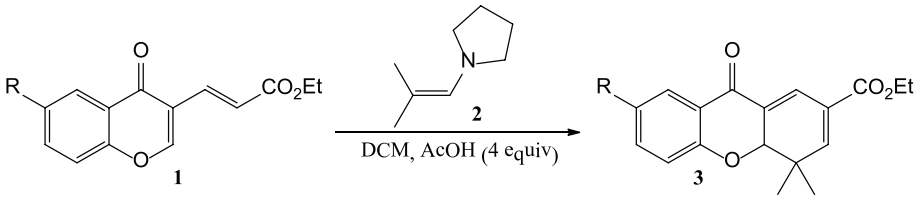


Рисунок 3. Синтез сложных эфиров 4,4а-дигидроксантонов 3

Данная оптимизация синтеза позволила получить ряд производных **3** со сложноэфирной группой и различными заместителями R в ароматическом кольце. Эксперимент показал, что с галогеновыми заместителями реакция шла быстрее – всего за 4 часа, а с сильными электроноакцепторными группами время порой достигало суток. Эта закономерность указывает на зависимость скорости реакции от электронных эффектов заместителя R. Мезомерные донорные группы ускоряют реакцию, акцепторные группы ее замедляют.

Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C растворов веществ записывали на спектрометре Bruker AM-400 (рабочая частота 400 МГц). Контроль хода реакции осуществлялся методом ТСХ на пластинах Silufol-UV-254, детектирование в УФ-свете.

Общая методика: 4 ммоль исходного хромонилакрилового эфира **1** помещали в плоскодонную колбу на 100 мл, добавляли 30 мл дихлорметана. К полученной суспензии прикапывали 4 экв. ледяной уксусной кислоты и 6 ммоль

енамина **2**. Колбу плотно закрывали и помещали на шейкер при комнатной температуре. Окончание реакции контролировали методом ТСХ (этилацетат/гексан=1/1). После окончания реакции реакционную массу обрабатывали 10 мл 4М HCl. Органический слой упаривали досуха в вакууме, остаток кристаллизовали этанолом. Выход продуктов составил 60-80%.

Были получены 10 производных 4,4а-дигидроксантонов из соответсвующих хромониловых эфиров с различными заместителями и выходами 60-80% (**таблица 1**). Строение полученных соединений доказано с помощью спектроскопии ЯМР.

Данная модификация реакции открывает дальнейшие перспективы получения рядов других производных 4,4а-дигидроксантонов: нитрилов, амидов и нитропроизводных.

Таблица 1 – Параметры синтеза 4,4а-дигидроксантонов 3

Заместитель R	Время реакции, ч	Выход продукта ,%	Заместитель R	Время реакции, ч	Выход продукта ,%
F-	4	77	$-CH_3$	15	68
Cl-	4	82	-OH	15	65
Br-	4	80	-H	24	67
F,F-	4	78	$-NO_2$	12	77
$-OCH_3$	15	67	-AcO	24	65

ЛИТЕРАТУРА

1. Bodwell GJ, Hawco KM, da Silva RP. Electron Deficient Dienes 3:Rapid Access to 2-Hydroxybenzophenones via Inverse Electron Demand Diels-Alder-Driven Domino Reactions of a Chromone-Fused Electron Deficient Diene with Enamines. Synlett [Internet]. Georg Thieme Verlag KG; 2003;(2):0179–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-36800

2. Chernov NM, Shutov RV, Sharoyko VV, Kuz'mich NN, Belyakov AV, Yakovlev IP. Synthetic Route to 4,4a- and 3,4-Dihydroxanthones through [4+2] Cycloaddition and Base-Assisted Sigmatropic Rearrangement. European Journal of Organic Chemistry [Internet]. Wiley; 2017 May 18;2017(19):2836–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201700310

3. Chernov NM, Shutov RV, Barygin OI, Dron MY, Starova GL, Kuz'mich NN, et al. Synthesis of Chromone-Containing Allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-Type Reaction. European Journal of Organic Chemistry [Internet]. Wiley; 2018 Oct 29;2018(45):6304–13. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201801159

SUMMARY

NEW DERIVATIVES OF 4,4-DIHYDROXANTHONES

Lukyanenko V. I., 2nd year PhD student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

[4 + 2] -cycloaddition was considered as the main method for obtaining derivatives of 4,4a-dihydroxanthones, which have a wide spectrum of biological activity: antibacterial, immunosuppressive, cytotoxic. Due to the optimization of the above method, a number of new derivatives, ethyl esters of carboxylic acids of 4,4a-dihydroxanthones, were synthesized.

Key words: *Dihydroxanthones, cycloaddition, chromonyl acrylic derivatives, enamine, [1,5]-sigmatropic shift.*

REFERENCES

1. Bodwell GJ, Hawco KM, da Silva RP. Electron Deficient Dienes 3:Rapid Access to 2-Hydroxybenzophenones via Inverse Electron Demand Diels-Alder-Driven Domino Reactions of a Chromone-Fused Electron Deficient Diene with Enamines. Synlett [Internet]. Georg Thieme Verlag KG; 2003;(2):0179–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-36800

2. Chernov NM, Shutov RV, Sharoyko VV, Kuz'mich NN, Belyakov AV, Yakovlev IP. Synthetic Route to 4,4a- and 3,4-Dihydroxanthones through [4+2] Cycloaddition and Base-Assisted Sigmatropic Rearrangement. European Journal of Organic Chemistry [Internet]. Wiley; 2017 May 18;2017(19):2836–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201700310

3. Chernov NM, Shutov RV, Barygin OI, Dron MY, Starova GL, Kuz'mich NN, et al. Synthesis of Chromone-Containing Allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-Type Reaction. European Journal of Organic Chemistry [Internet]. Wiley; 2018 Oct 29;2018(45):6304–13. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201801159

КОКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА С АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ *IN VITRO* И *IN SILICO*

Панков Д.И., студ. 3 курса, **Тальдаев А.Х.**, студ. 3 курса
Руководители: **Селиванова И.А.**, докт. фарм. наук, проф., **Терехов Р.П.**, препод.
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет),
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Российская Федерация
E-mail: pankov_d_i@student.sechenov.ru

Асковертин является комбинированным лекарственным препаратом на основе аскорбиновой кислоты и дигидрокверцетина. Представляло интерес изучить возможность кокристаллизации этих антиоксидантов. Для продукта, полученного путем супрамолекулярного синтеза, установлено повышение растворимости дигидрокверцетина в воде при комнатной температуре, что является важным этапом на пути оптимизации физико-химических свойств данного биофлавоноида.

Ключевые слова: *асковертин, дигидрокверцетин, аскорбиновая кислота, инженерия кристаллов, молекулярное моделирование, супрамолекулярный синтез.*

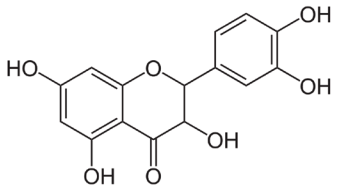
Дигидрокверцетин (ДКВ) – флаванонол, выделяемый из древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и лиственницы даурской (*Larix dahurica* Turcz.). Этот флавоноид проявляет антиоксидантные свойства и обладает аффинностью к различным биологическим мишеням [1]. Однако, ДКВ очень мало растворим в воде при комнатной температуре, и, как считают некоторые исследователи, это является основной причиной низкой биологической доступности, что в свою очередь накладывает некоторые ограничения для его широкого использования в медицине [2]. Поэтому поиск путей оптимизации свойств данного вещества является актуальной задачей для фармации. Инженерия кристаллов – это раздел супрамолекулярной химии, позволяющий изменить свойства субстанции, тем самым улучшить ее характеристики и расширить сферу применения. Такие манипуляции возможны, во многом, благодаря изменению строения твердой фазы [3]. Коформером, т.е. веществом, совместно с которым проводится кристаллизация, к ДКВ может служить аскорбиновая кислота (АСК), легкорастворимая в воде и так же проявляющая антиоксидантные свойства. Ранее на базе ДКВ и АСК разработали препарат асковертин [1]. Медицинская школа Восточной Вирджинии рекомендует применять ДКВ с АСК в целях комплексной профилактики новой вирусной инфекции COVID-19 [4]. Однако процесс супрамолекулярного взаимодействия и формирования кокристаллов между действующими веществами препарата ранее не изучали.

Таким образом, целью исследования стала оптимизизация физико-химических свойств ДКВ путем направленного синтеза кокристаллов с АСК.

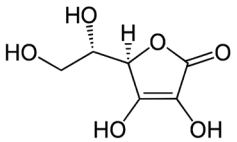
Дизайн кокристаллов осуществляли методом молекулярной динамики (МД). Расчеты проводили в программе GROMACS 2020.4 [5]. Системы состояли из 50 молекул ДКВ и 200 молекул АСК для обеспечения экспериментального мольного соотношения 1:4. Параметризацию соединений осуществляли методом DFT/B3LYP/6G-31g* для силового поля GROMOS 54A7. Длительность продуктивной МД при н.у. в NPT микроканоническом ансамбле составляла 100 нс с шагом интегрирования 1 фс с использованием 3D периодических граничных условий с радиусом отсечки нековалентных взаимодействий 1,2 нм.

Кокристаллизацию активных компонентов препарата проводили механоактивацией посредством гриндинга в ступке в течение 10 мин. Навеска состояла из 20 мг ДКВ и 50 мг АСК, что соответствует мольному соотношению 1:4. Полученную композицию анализировали на растворимость в воде согласно ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость». Спектрофотометрический анализ водных растворов с концентрацией ДКВ 0,03 ммоль/л и АСК 0,14 ммоль/л осуществляли на приборе Cary-100 (Varian, Пало Альто, США).

В структуре ДКВ (рис. 1, формула А) – 2,3-дигидро-3,5,7-тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-4*H*-1-бензопиран-4-он – и АСК (рисунок 1, формула В) – (5*R*)-5-[(1*S*)-1,2-дигидроксиэтил]-2,3-дигидроксифуран-2(5*H*)-он – имеются кислотные и основные центры, что обуславливает возможность формирования водородных связей между ними.



A



B

Рисунок 1. Структурные формулы компонентов асковертина: А – ДКВ, В – АСК

В результате компьютерных расчетов построена виртуальная модель кластера ДКВ с АСК, характеризующегося сложной супрамолекулярной структурой (рис. 2). Одна молекула ДКВ образует 5-6 водородных связей с АСК, демонстрируя формирование устойчивого комплекса.

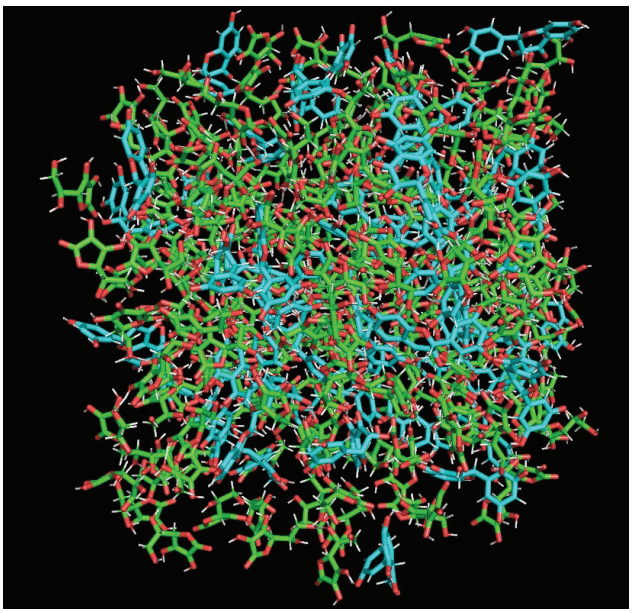


Рисунок 2. Модель кластера ДКВ (голубой) с АСК (зеленый)

Изучение процесса МД при помощи радиальной функции распределения показало равномерное расположение молекул ДКВ и АСК относительно друг друга и подтвердило формирование супрамолекулярного комплекса, на что указывает выход значения функции на плато (рисунок 3, график А). Плотность системы в конце моделирования составляла 1,55 г/мл. Изменение энтальпии системы в процессе перехода от смеси к кокристаллу равняется -5304,859375 кДж/моль, что указывает на термодинамическую возможность образования данного объекта (рисунок 3, график В).

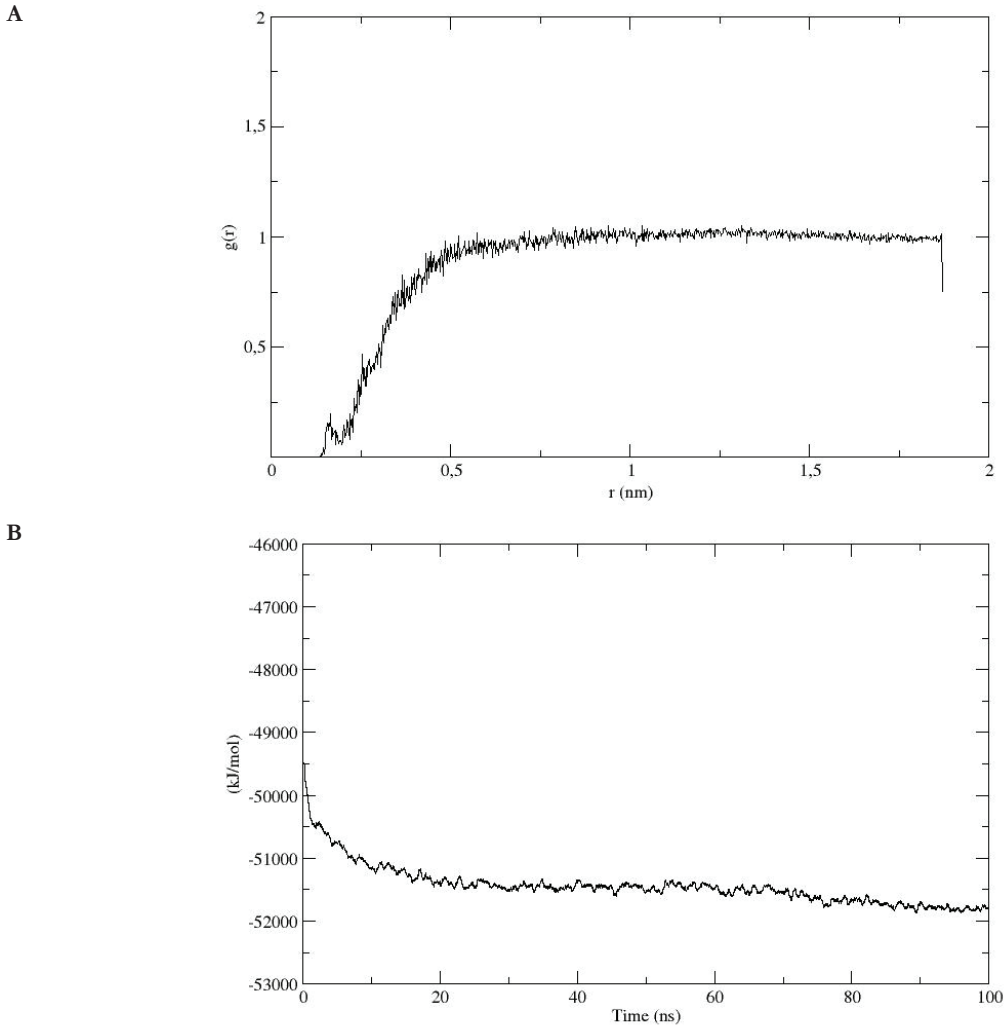


Рисунок 3. Анализ процесса молекулярной динамики: А – радиальная функция распределения, В – энтальпия системы

Результаты эксперимента согласуются с компьютерными расчетами. Кристаллы, полученные путем гриндинга, характеризовались более высокой растворимостью в воде при комнатной температуре. В соответствии с ГФ РФ XIV композиция соответствует термину «мало растворим», а исходная фармацевтическая субстанция ДКВ – «очень мало растворим». Для механической смеси ДКВ с АСК показатель растворимости не изменился – «очень мало растворим». АСК является легко растворимой в воде субстанцией. Наблюдаемые результаты указывают на вероятное формирование кокристалла.

На УФ-спектре композиции наблюдается батохромный сдвиг для максимума поглощения АСК (с 264 нм до 268 нм) и появление максимума поглощения при длине волны 230 нм (рисунок 4). Эти изменения свидетельствуют о возникновении другой хромофорной системы, что может быть результатом супрамолекулярных взаимодействий.

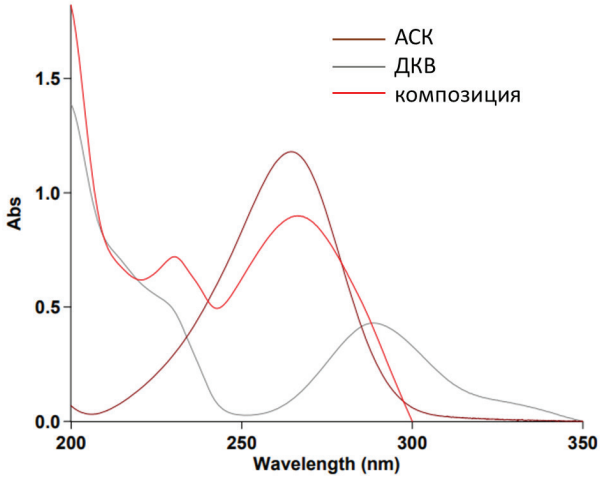


Рисунок 4. Спектр поглощения объектов исследования

Таким образом, в ходе работы нами выявлено улучшение растворимости композиции ДКВ:АСК в мольном соотношении 1:4, полученной путем гриндинга, по сравнению с исходной фармацевтической субстанцией ДКВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Плотников МБ, Тюкавкина НА, Плотникова ТМ. Лекарственные препараты на основе диквертина. Томск: Издательство Томского университета; 2005.

2. Varshosaz J, Ghassami E, Ahmadipour S. Crystal Engineering for Enhanced Solubility and Bioavailability of Poorly Soluble Drugs. Curr Pharm Des. 2018;24(21):2473–2496. DOI: 10.2174/1381612824666180712104447.

3. Селиванова ИА, Терехов РП. Инженерия кристаллов как научная основа модификации физико-химических свойств биофлавоноидов. Известия академии наук. Серия химическая. 2019;12:2155–2162.

4. Marik P. EVMS Critical Care COVID-19 Protocol developed by Dr. Paul Marik. Norfolk: Eastern Virginia Medical School; 2020.

5. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 2015;1:19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.

SUMMARY

CO-CRYSTALLIZATION OF DIHYDROQUERCETIN WITH ASCORBIC ACID *IN VITRO* AND *IN SILICO*

Pankov D.I., 3rd year student, **Taldaev A.Kh.,** 3rd year student
Sechenov Moscow State Medical University;
8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russian Federation

Ascovertin is a combination drug based on ascorbic acid and dihydroquercetin. The co-crystallization possibility of these antioxidants is of prime interest to study. The increase of water solubility at room temperature was observed for the product obtained by supramolecular synthesis comparing with raw dihydroquercetin. It is an important stage towards optimizing the physicochemical properties of this bioflavonoid.

Key words: *ascovertin, dihydroquercetin, ascorbic acid, crystal engineering, molecular modeling, supramolecular synthesis.*

REFERENCES

1. Plotnikov MB, Tyukavkina NA, Plotnikova TM. Lekarstvennye preparaty na osnove diquertina. Tomsk: Izdatelstvo Tomskogo Universiteta; 2005. (in Russ)

2. Varshosaz J, Ghassami E, Ahmadipour S. Crystal Engineering for Enhanced Solubility and Bioavailability of Poorly Soluble Drugs. Curr Pharm Des. 2018;24(21):2473-2496. DOI: 10.2174/1381612824666180712104447.

3. Selivanova IA, Terekhov RP. Crystal engineering as a scientific basis for modifying the physicochemical properties of bioflavonoids. Russ Chem Bull. 2019;12:2155-2162. (in Russ) DOI: 10.1007/s11172-019-2684-z.

4. Marik P. EVMS Critical Care COVID-19 Protocol developed by Dr. Paul Marik. Norfolk: Eastern Virginia Medical School; 2020.

5. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 2015;1:19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКРИСТАЛЛИЧЕКОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЗО-ВОЗДУШНЫХ СМЕСЕЙ ХЛОРИСТОГО ВОДОРОДА

Пименов С.Д., асп. 2 года обучения
Руководитель: **Сизов А.И.**, канд. тех. наук, доц.
Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет,
194021, Санкт-Петербург, Институтский пер., д. 5
E-mail: chudopim@mail.ru

Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) распространенный продукт, одним из основных потребителей является фармацевтическая, где МКЦ используется в качестве связующего и наполнителя при прямом прессовании таблеток. Одним из наиболее перспективных методов получения МКЦ является способ газофазного гидролиза целлюлозы газо-воздушными смесями хлористого водорода. Способ отличается высокой скоростью гидролиза, низким расходом реагентов и энергетических затрат на проведение процесса.

Ключевые слова: *микрокристаллическая целлюлоза, гидролиз, хлористый водород, степень полимеризации.*

Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) находит широкое применение в фармацевтической, пищевой, лакокрасочной и других отраслях промышленности. Общий мировой объем производства МКЦ в 2018 г составил более 270 тыс. т. на общую сумму USD 831.1 миллионов с тенденцией роста более 7 % в год.

Традиционно, МКЦ получают жидкофазным способом где целлюлозу гидролизуют разбавленными растворами серной или соляной кислоты с концентрацией до 10 %, при температурах 100-140 °С, продолжительностью от 60 до 120 мин и гидромодуле не менее 10 [1]. Технологический режим выбирается из условия гидролиза только аморфной фракции целлюлозы, которая составляет 8–10 % от ее массы.

Волокна целлюлозы после разрушения аморфной фракции распадаются на мелкие частицы с высоким индексом кристалличности. Доступность гликозидных связей в плотно упакованных структурах кристаллитов значительно снижается, дальнейший гидролиз практически прекращается и степень полимеризации целлюлозы далее не изменяется, что определяет второе название МКЦ – целлюлоза предельной степени полимеризации [2, 3].

Помимо гидролиза разбавленными минеральными кислотами известны способы гидролиза древесины с использованием концентрированной хлористоводородной кислоты. Использование концентрированных кислот обладает рядом технологических преимуществ, связанных с высокой скоростью и низкими температурами протекания процесса гидролиза. Однако в процессе гидролиза концентрированной хлористоводородной кислотой [4] существуют и определенные проблемы, связанные с необходимостью создания высокой концентрации кислоты в массе целлюлозы. Наиболее простым способом достижения высокой концентрации хлористоводородной кислоты является способ насыщения целлюлозы газообразным хлористым водородом.

При переработке большинства растительных материалов, ввиду их пористой структуры, тепло-массообменные процессы в объеме сырья протекают весьма медленно. Проникновение кислоты в толщу целлюлозы и последующий равномерный нагрев всего объема гидролизуемого материала затруднен. Поэтому, для создания гомогенных условий при химической переработке растительных материалов, процессы проводят только с измельченным сырьем в течение длительного времени и в сильно разбавленных суспензиях.

В отличие от этого адсорбция хлористого водорода (ХВ) воздушно сухой целлюлозой протекает очень быстро. Хлористый водород хорошо абсорбируется водой, и даже при низких парциальных давлениях обеспечивает получение концентрированной соляной кислоты. Адсорбция хлористого водорода водой – экзотермический процесс. Энтальпия образования соляной кислоты с концентрацией 36 % составляет – 1512 кДж·кг$^{-1}$. Эти особенности приводят к тому, что в целлюлозе равномерно по всему объему образуется соляная кислота и параллельно происходит разогрев массы, т.е. создаются условия для гидролиза гликозидных связей. Хлористый водород сорбируется только влагой растительного сырья, а сухая биомасса не адсорбирует хлористый водород. Влага целлюлозы и растительных материалов поглощают ХВ на 20–25% больше, чем сорбция хлористого водорода водой, что объясняется влиянием капиллярных эффектов.

На рисунке 1 приведены графики изменения температуры целлюлозы с различной исходной влажностью при сорбции хлористого водорода из газо-воздушных смесей различной концентрации. Как видно из графиков, использование газо-воздушных смесей позволяет значительно снизить температуру сорбции ХВ и возможно исключить гумификацию целлюлозы при проведении процесса гидролиза.

В данной работе проведены исследования процесса гидролиза целлюлозы и получения МКЦ с использованием газо-воздушных смесей хлористого водорода.

В качестве целлюлозного материала для гидролиза использовали листовую сульфатную беленую целлюлозу Братского ЦБК из хвойных пород древесины. Хлористый водород получали разложением соляной кислоты раствором хлористого кальция с концентрацией 36–50 % при температуре кипения раствора.

Исследования кристалличности целлюлозы проводились с использованием дифрактометра *D8 Discover (Bruker AXS)* с источником излучения *CuKα_* и позиционно-чувствительным детектором в интервале углов 2θ от 5 до 70 ° с шагом 0.05 ° и экспозицией в точке 0,5 сек. Съемка ИК-спектров проводилась на ИК-Фурье спектрофотометре ФСМ-1201 в формованных таблетках *KBr* с нанесенным тонким слоем образцов целлюлозы и МКЦ в соотношении 1:100.

Анализы редуцирующих веществ и кислотности проводили по известным методикам. Характеристическую вязкость растворов целлюлозы и МКЦ определяли по методике с использованием кадоксена.

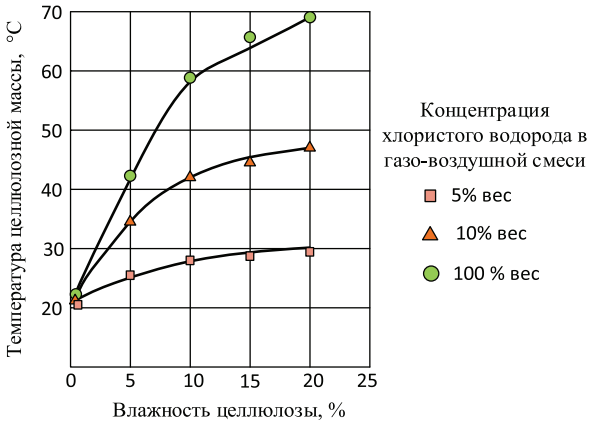


Рисунок 1. Графики изменения температуры целлюлозной массы с различной исходной влажностью при сорбции хлористого водорода из газо-воздушных смесей различной концентрации

На рисунке 2 приведена динамика изменения характеристической вязкости и белизны образцов целлюлозы, полученных в процессе гидролиза хлористым водородом из газо-воздушной смеси с температурой 45 °С и парциальными давлениями 100 кПа и 25 кПа (влажность целлюлозы 12 %).

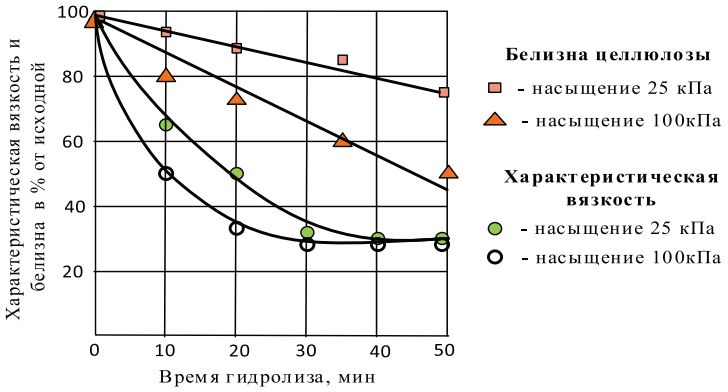
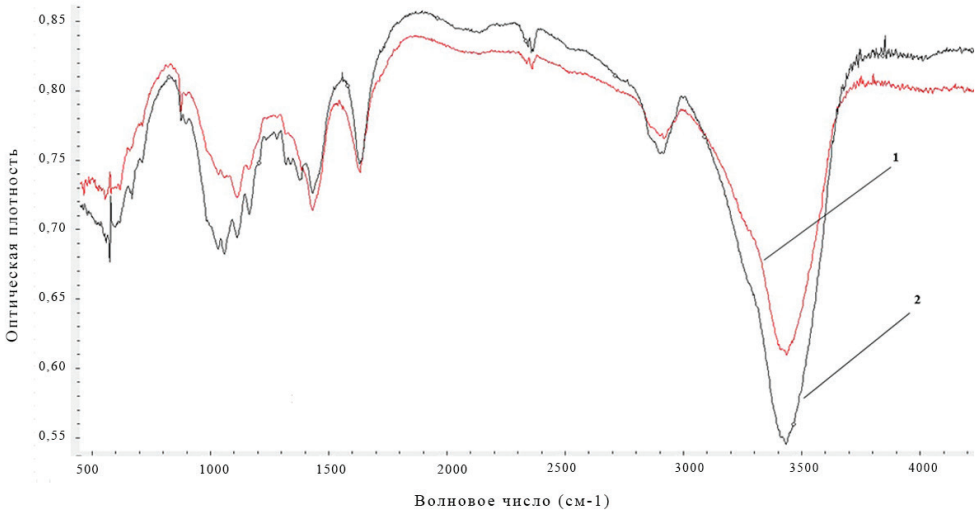


Рисунок 2. Изменение характеристической вязкости и белизны целлюлозы при гидролизе газо-воздушными смесями хлористого водородом с различным парциальным давлением (температура 45 °С, влажность целлюлозы 12 %)

Как видно из графика на рис. 2, снижение характеристической вязкости (степень полимеризации) целлюлозы проходило за первые 20 мин гидролиза, после чего вязкость практически не менялась. Этот факт указывает на достижение целлюлозой предельного значения степени полимеризации, характерное при образовании микрокристаллической целлюлозы.

При абсорбции хлористого водорода с парциальным давлением 100 кПа произошло снижение белизны целлюлозы более чем на 40 % от исходной, что указывало на существенную деструкцию части образовавшихся при гидролизе моносахаридов. Гидролиз же целлюлозы газо-воздушной смесью с парциальным давлением 25 кПа, значительно снизил «жесткость» процесса и позволил получать целлюлозу предельной СП при снижении исходной белизны всего на 15 %.

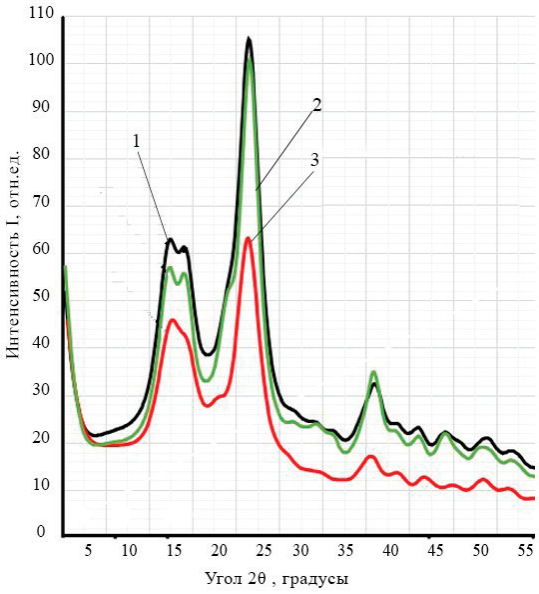
На рисунке 3 приведены ИК спектры поглощения коммерческих образцов МКЦ фирмы JRS Pharma VIVAPUR® 101 (Германия), и гидролизат-массы полученной из целлюлозы влажностью 12 % при гидролизе газо-воздушной смесью хлористого водорода с парциальным давлением 25 кПа (температура 45°С, время 30 мин). Как видно, ИК спектры полностью совпадают даже в области «отпечатков пальцев», что указывает на идентичность образцов.



1. МКЦ JRS Pharma VIVAPUR® 101 (Германия)
2.Гидролизат-масса полученная из целлюлозы влажностью 12% гидролизом с хлористым водородом (температура 45°С, время 30 мин).

Рисунок 3. ИК Спектры. 1. МКЦ JRS Pharma VIVAPUR 101 (Германия), 2. Гидролизат-масса, полученная из целлюлозы влажностью 12 % при гидролизе газо-воздушной смесью хлористого водорода с парциальным давлением 25 кПа (температура 45 °С, время 30 мин)

Гидролиз аморфной фракции целлюлозы и образование МКЦ сопровождается резким снижением степени полимеризации и увеличением индекса кристалличности материала [5]. На рисунке 4 приведены рентген дифрактограммы коммерческого образца МКЦ фирмы *JRS Pharma VIVAPUR*® 101 (Германия), гидролизат-массы из целлюлозы влажностью 12 % полученной при гидролизе газо-воздушной смесью хлористого водорода с парциальным давлением 25 кПа (температура 45 °С, время 30 мин) и исходной целлюлозы. Данные ИК-спектроскопии, вискозиметрии и рентген дифрактометрии, позволяют однозначно идентифицировать гидролизат-массу, полученную гидролизом целлюлозы газо-воздушными смесями хлористого водорода как микрокристаллическую целлюлозу.



1.МКЦ JRS PHARMA VIVAPUR 101;
2.Целлюлоза гидролизованная хлористым водородом;
3.Исходная целлюлоза;

Рисунок 4. Рентген дифрактограммы. 1. МКЦ JRS Pharma Vivapur 101; 2. Гидролизат-масса, полученная из целлюлозы влажностью 12 % при гидролизе газо-воздушной смесью хлористого водорода с парциальным давлением 25 кПа (температура 45 °С, время 30 мин); 3. Исходная целлюлоза

В таблице 1 приведены данные по сравнению способа гидролиза целлюлозы газо-воздушными смесями хлористого водорода с традиционным способом получения МКЦ. Как видно из данных таблицы 1, способ гидролиза с использованием газо-воздушных смесей хлористого водорода значительно эффективней традиционного способа, как в части

высокой скорости процесса гидролиза, так и в части низкого расхода кислоты и энергетических ресурсов на проведение процесса.

В данных таблицы 1 обращает внимание также очень низкое образование моносахаридов и высокий выход МКЦ при гидролизе целлюлозы. На наш взгляд это обстоятельство связано с рекристаллизацией части аморфных фрагментов макромолекул целлюлозы, характерной для гидролиза целлюлозы концентрированными кислотами, как в случае гидролиза с использованием хлористого водорода

Таблица 1 – Сравнение технологических параметров способа гидролиза целлюлозы газо-воздушными смесями хлористого водорода с традиционным способом получения МКЦ

Условия гидролиза	Выход МКЦ % от а.с.ц	Выход сахаров, % от а.с.ц	Расход кислоты, % от а.с.ц	Время гидролиза, мин	Расход тепла, Гкал/т
25 кПа хлористый водород, целлюлоза влажность 18 %, 45 °С	94,2	4,0	5,5	20	-
25 кПа хлористый водород, целлюлоза влажность 8 %, 45 °С	95,0	4,0	3,0	30	-
1,5% HC1, Гидромодуль 12, 120 °С	90,1	9,5	18,0	120	1,4

МКЦ как продукт, используемый в фармацевтической промышленности, должен обладать высокой белизной и однородностью, так как в процессе гидролиза целлюлозы с использованием газофазного хлористого водорода может происходить значительное потемнение материала. В таблице 2 приведены данные по анализу образцов МКЦ различных иностранных производителей, которые показывают, что использование распространенных отбеливающих агентов, таких как гипохлорит натрия и перекись водорода дают белизну, сопоставимую с импортными образцами.

Таблица 2 – Белизна образцов МКЦ различных производителей

Марка образца МКЦ	Белизна W_c, %
Образец из СПБХФУ (импорт)	90,9
Prosolv «JRSpharma» (Германия)	91,2
MCC102D$^+$ «JRSpharma» (Германия)	90,8
Vivapur 101 «JRS pharma» (Германия)	90,1
HiCel «Sigachi Industries» (Индия)	90,5
Образец МКЦ (газофазный гидролиз)	90,7

1. Сорбция хлористого водорода воздушно-сухой целлюлозой из газо-воздушных смесей сопровождается нагревом и образованием соляной кислоты высокой концентрации в массе сырья.

2. В процессе сорбции происходит гидролиз аморфной фракции целлюлозы, который проходит в течение 15-30 мин при температуре 40-60 ºС и сопровождается образованием целлюлозы предельной степени полимеризации.

3. Данные ИК-спектрометрии и рентгеновской дифрактометрии однозначно указывают на образование микрокристаллической целлюлозы в процессе гидролиза целлюлозы хлористым водородом.

4. Процесс гидролиза с использованием газо-воздушных смесей хлористого водорода показал высокую эффективность в сравнении с традиционным способом получения микрокристаллической целлюлозы.

5. Показана возможность достижения высокой белизны (не менее 90 %) микрокристаллической целлюлозы, полученной гидролизом газо-воздушной смесью хлористого водорода, при использовании гипохлорита натрия или перекиси водорода в качестве отбеливающих агентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ioelovich M. Green technology of microcrystalline cellulose. SITA. 2018;20(2):3-7.

2. Palme A. et. al. Acid hydrolysis of cellulosic fibres: Comparison of bleached kraft pulp, dissolving pulps, and cotton textile cellulose. Carbohydr Polym. 2016;136:1281-1287. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.015

3. Vanhatalo KM. Effect acid hydrolysis parameters on properties MCC. Bioresurses. 2014;9(3):4729-4740

4. Chaerunisaa, Anis & Sriwidodo, Sriwidodo & Abdassah, Marline. Microcrystalline Cellulose as Pharmaceutical Excipient. 2019. DOI:10.5772/intechopen.88092

5. Патент РФ № 2192432. Способ получения порошковой целлюлозы. ОА Носкова, ФХ Хакимова, ТН Ковтун. № 2192432, опубл. 10.11.2002.

SUMMARY

HYDROLYSIS OF CELLULOSE USING GAS-AIR MIXTURES OF CHLORIDE HYDROGEN

Pimenov S.D., Ph.D. 2 years of study
St. Petersburg State Forestry University
5, Institutsky av., St. Petersburg, Russia, 194021

Microcrystalline cellulose (MCC) is a common product, one of the main consumers is pharmaceutical, where MCC is used as a binder and filler in the direct pressing of tablets. MCC is obtained by acid hydrolysis of cellulose, while, as a rule, there is a decrease in the whiteness of the cellulose. Darkening is associated with the destruction of sugars formed during hydrolysis and the subsequent formation of colored products. The composition and properties of these products depend on the method of cellulose hydrolysis, temperature, acid concentration and the time of the process.

One of the most promising methods for producing MCC is the method of gas-phase hydrolysis of cellulose with gas-air mixtures of hydrogen chloride. The method is characterized by a high hydrolysis rate, low reagent consumption and energy costs for the process.

Key words: *microcrystalline cellulose, hydrolysis, hydrogen chloride, polymerization degree.*

REFERENCES

1. Ioelovich M. Green technology of microcrystalline cellulose. SITA. 2018;20(2):3-7.
2. Palme A. et. al. Acid hydrolysis of cellulosic fibres: Comparison of bleached kraft pulp, dissolving pulps, and cotton textile cellulose. Carbohydr Polym. 2016;136:1281-1287. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.015
3. Vanhatalo KM. Effect acid hydrolysis parameters on properties MCC.Bioresurses. 2014;9(3):4729-4740
4. Chaerunisaa, Anis & Sriwidodo, Sriwidodo & Abdassah, Marline. Microcrystalline Cellulose as Pharmaceutical Excipient. 2019. DOI:10.5772/intechopen.88092
5. Patent. RU №. 2192432 A method for producing powdered cellulose. OA Noskova, FKh Khakimova, TN Kovtun. № 2192432. 11.10.2002. (in Russ)

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ *N*-ТЕРМИНАЛЬНЫЙ 4-(1-АДАМАНТИЛ)БЕНЗОИЛИРОВАНЫЙ ФРАГМЕНТ

Спиридонова А.В., магистрант 2 года обучения, **Карлова А.Ф.**, магистрант 1 года обучения
Руководители: **Красникова Н.В.**[1], канд. хим. наук, ст. преп.,
Красников С.В.[2], докт. хим. наук, старший научный сотрудник
[1]Ярославский Государственный Технический Университет,
150023, Ярославль, Московский проспект, д. 88, Российская Федерация
[2]ОАО НИИ Ярсинтез, 150044, Ярославль, пр. Октября, д. 88, Российская Федерация
E-mail: spiridonova_sashulya@mail.ru

С использованием *N,N*-карбонилдиимидазольного и *N,N*-дициклогексилкарбодиимидного методов создания пептидной связи были синтезированы модифицированные дипептиды, содержащие *N*-терминальный 4-(1-адамантил)бензоилированый фрагмент и биогенные аминокислоты. Разработаны методики выделения целевых продуктов. Модифицированные дипептиды на основе *L*-триптофана в испытаниях *in vitro* проявили антибактериальную и фунгицидную активность.

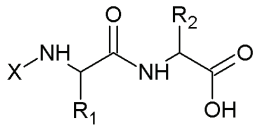
Ключевые слова: *модифицированные дипептиды, N-терминальный 4-(1-адамантил)бензоилированый фрагмент, биогенные аминокислоты, антибактериальная активность, фунгицидная активность, дипептидомиметики.*

В настоящее время биологически активные соединения, содержащие фрагмент адамантана, широко применяются в медицинской химии. Такие соединения обладают широким спектром фармакологической активности. Среди них противовирусная, нейропротекторная, анальгетическая, иммуностимулирующая и т.д. [1]. В этих соединениях липофильный фрагмент адамантана способствует не только увеличению проникаемости молекул через клеточные мембраны, но и оказывает значительное влияние непосредственно на фармакологический профиль самой лекарственной субстанции, т.е. появляются какие-либо новые виды биологической активности. Сочетание ядра адамантана с пептидными структурами дает возможность в получении уникальных фармацевтических субстанций, где пептидные фрагменты проявляют ряд положительных фармакологических активностей [2], и обладают низкой токсичностью или её отсутствием, т.к. при метаболизме происходит образование природных аминокислот [3].

Ранее были синтезированы и исследованы фармакологические свойства аминокислотных производных 4-(1-адамантил)бензойной кислоты [4]. В результате фармакологического скрининга данных соединений *in vivo* было установлено, что они обладают противовоспалительными, противоболевыми, противопаркинсоническими, антигипоксическими, актопротекторными и иммуномодулирующими свойствами, маловыраженным ульцерогенным действием, низкой токсичностью и не вызывают лекарственной зависимости [5].

В связи с этим, целью работы являлся синтез модифицированных дипептидов на основе 4-(1-адамантил)бензойной кислоты (рис. 1) для получения высокоэффективных дипептидомиметиков, обладающих широким спектром биологической активности в сочетании с низкой токсичностью.

Исходя из цели настоящей работы, были поставлены следующие задачи: разработка метода синтеза целевых продуктов с применением *N,N*-карбонилдиимидазольного и *N,N*-дициклогексилкарбодиимидного методов создания пептидной связи с целью выбора наиболее рационального из них; разработка способа выделения целевых продуктов и подтверждение их строения и состава с использованием современных физико-химических методов анализа; исследование фармакологических свойств полученных соединений на *in vitro* и *in vivo* моделях.



X = 4-(1-адамантил)бензоилированный фрагмент
R_1, R_2 = боковые радикалы биогенных аминокислот

Рисунок 1. Общая формула модифицированных дипептидов на основе 4-(1-адамантил)бензойной кислоты

Исходные реагенты: *N*-[4-(1-адамантил)бензоил]-*α*-аминокислоты – вещества, полученные реакцией ацилирования по Шоттену-Бауману *α*-аминокислот хлорангидридом 4-(1-адамантил)бензойной кислоты [4], гидрохлориды метиловых эфиров *α*-аминокислот – вещества, полученные взаимодействием *α*-аминокислот с тионилхлоридом в метаноле, *N,N*-карбонилдиимидазол (КДИ) (≥ 97,0% CAS: 530-62-1), *N,N*-дициклогексилкарбодиимид (ДЦК) («хч» ТУ 538-75-0), тетрагидрофуран (ТГФ) (≥ 99,9% CAS: 109-99-9), триэтиламин («хч» СТП ТУ КОМП 2 – 686 – 13), кислота соляная («хч» ГОСТ 3118 – 77), ацетон («осч» ТУ 6-09-3513-86), толуол («хч» ТУ 2631-020-44493179-98 с изм. 1,2), *н*-гексан («хч» ТУ 2631-061-44493179-01 с изм. 1), метилен хлористый («хч» ТУ 2631-025-78119972-2010), кальций хлористый («чда» СТП ТУ КОМП 2 – 472 – 11), натрия гидроокись («чда» ГОСТ 4328 – 77, изм. №1. 2).

Метиловый эфир *N*-[4-(1-адамантил)бензоил]-*D,L*-фенилаланил-*L*-лейцина (способ 1). К 0,18 г (1,1 ммоль) гидрохлорида метилового эфира *L*-лейцина, растворенного в хлористом метилене, добавляли 0,15 мл (1,05 ммоль) триэтиламина. Затем добавляли предварительно приготовленную смесь, состоящую из 0,4 г (1 ммоль) *N*-[4-(1-адамантил) бензоил]-*D,L*-фенилаланина и 0,227 г (1,1 ммоль) ДЦК в смеси хлористого метилена и ТГФ и перемешивали в течение 120 минут. Образовавшийся осадок отделяли, фильтрат концентрировали в вакууме. Полученную массу перекристаллизовывали в *н*-гексане. Получили 0,218 г (41,4 %) метилового эфира *N*-[4-(1-адамантил)бензоил]-*D,L*-фенилаланил-*L*-лейцина. Т.пл. 167-169 °С. R_f = 0,24 (толуол/гексан/ацетон = 8/8/5), УФ-проявка. ИК, ν, см$^{-1}$: 3273 (NH), 1742 (C=$O_{сл.\ эф.}$), 1631 (I амидная полоса), 1613 (Ar), 1541 (II амидная полоса), 1497 (Ar).

Метиловый эфир *N*-[4-(1-адамантил)бензоил]-*D,L*-фенилаланил-*L*-лейцина (способ 2). К 0,5 г (1,24 ммоль) *N*-[4-(1-адамантил)бензоил]-*D,L*-фенилаланина в ТГФ добавляли 0,22 г (1,36 моль) КДИ и перемешивали при комнатной температуре в течение 90 минут. Затем добавляли 0,246 г (1,36 ммоль) гидрохлорида метилового эфира *L*-лейцина и 0,2 мл (1,4 ммоль) триэтиламина и перемешивали при нагревании в течение 120 минут. Реакционную смесь концентрировали при атмосферном давлении до половины начального объёма, обрабатывали 1 н. HCl, а затем – хлористым метиленом. Органический слой осушали хлоридом кальция, концентрировали при атмосферном давлении. Полученный продукт перекристаллизовывали в *н*-гексане. Получили 0,483 г (73,4 %) метилового эфира *N*-[4-(1-адамантил)бензоил]-*D,L*-фенилаланил-*L*-лейцина. Т.пл. 153-155 °С. R_f = 0,215 (толуол/гексан/ацетон = 8/8/5), УФ-проявка. ИК, ν, см$^{-1}$: 3267 (NH), 1740 (C=$O_{сл.\ эф.}$), 1632 (I амидная полоса), 1611 (Ar), 1543 (II амидная полоса), 1506 (Ar).

Другие **метиловые эфиры модифицированных дипептидов** получали по аналогичной методике (способ 2).

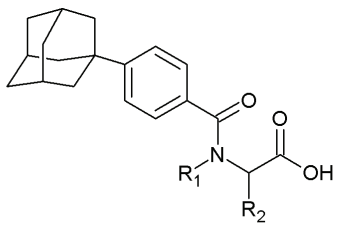
***N*-[4-(1-адамантил)бензоил]-*D,L*-фенилаланил-*L*-лейцин**. К раствору 0,42 г (0,8 ммоль) метилового эфира *N*-[4-(1-адамантил)бензоил]-*D,L*-фенилаланил-*L*-лейцина в ацетоне добавляли 0,8 мл (0,8 ммоль) 1 н. NaOH. Реакционную смесь концентрировали при атмосферном давлении, образовавшуюся массу растворяли в воде, подкисляли 36%-ным раствором HCl до pH 2-3 и выдерживали при температуре 2-6 °С. Полученный осадок отфильтровывали. Получили 0,152 г (70 %) *N*-[4-(1-адамантил)бензоил]-*D,L*-фенилаланил-*L*-лейцина. Т.пл = 95-97 °С. R_f = 0,18 (толуол/гексан/ацетон = 8/8/5), УФ – проявка. ИК, ν, см$^{-1}$: 3313 (NH), 2672 (OH); 1719 (C=$O_{карб.\ к\text{-}ты}$), 1633 (I амидная полоса), 1611 (Ar), 1541 (II амидная полоса), 1497 (Ar). ^{1}H ЯМР, ДМСО-d6, 400 МГц, δ, м.д.: 12,55 (s, 1H), 8,42 (q, 2H), 7,72 (t, J=8 Hz, 2H), 7,48 (p, 4H), 7,25 (t, J=8 Hz, 2H), 7,15 (t, J=8 Hz, 2H), 4,9 (m, 1H), 4,3 (t, J=8 Hz, 1H), 3,2 (m, 1H), 2,9 (t, J=12 Hz, 1H), 2,05 (s, 4H), 1,9 (s, 6H), 1,75 (s, 6H), 1,55 (m, 2H), 1,6 (q, 1H), 1,1 (m, 1H), 0,85 (p, 4H).

Другие **модифицированные дипептиды** получали по аналогичной методике.

В настоящей работе в качестве исходных соединений использовались аминокислотные производные 4-(1-адамантил) бензойной кислоты (рисунок 2), в результате конденсации которых с метиловыми эфирами биогенных аминокислот образовывались соответствующие модифицированные дипептиды.

Синтез целевых дипептидомиметиков осуществлялся с помощью двух классических методов пептидного синтеза: с использованием *N,N*-дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) и *N,N*-карбонилдиимидазола (КДИ).

Первый метод синтеза заключался во взаимодействии предварительно приготовленной смеси исходного аминокислотного производного 4-(1-адамантил)бензойной кислоты с 10 % избытком ДЦК в ТГФ с метиловым эфиром концевой *α*-аминокислоты, полученным в результате взаимодействия гидрохлорида метилового эфира *α*-аминокислоты с триэтиламином в хлористом метилене в течение 2-х часов. Выходы метиловых эфиров модифицированных дипептидов составляли 40-45 %.



R_1, R_2 = боковые радикалы биогенных аминокислот

Рисунок 2. Общая формула аминокислотных производных 4-(1-адамантил)бензойной кислоты

В ИК-спектрах целевых продуктов были зафиксированы сильные полосы поглощения валентных колебаний, относящихся к исходному ДЦК (в области 2110-2120 см$^{-1}$), и валентных колебаний связи NH^+ в области 2600-2615 см$^{-1}$, которые относятся к побочному продукту *N,N*-дициклогексилмочевине.

Таким образом, метод получения метиловых эфиров модифицированных дипептидов, содержащих *N*-терминальный 4-(1-адамантил)бензоилированый фрагмент, с помощью ДЦК нерационален с точки зрения невысокого выхода продукта и необходимость его очистки от сопутствующих соединений.

Второй метод синтеза заключался во взаимодействии исходных *N*-4-(1-адамантил)бензоил-*α*-аминокислот с 10 % избытком КДИ в течение 1,5 часов в ТГФ. В результате *in situ* образовывались соответствующие имидазолиды, которые вступали в реакцию с 10 % избытком гидрохлорида метилового эфира концевой *α*-аминокислоты и триэтиламином при 60-70 °С в течение 2 часов. Выходы метиловых эфиров модифицированных дипептидов составляли 70-75 %.

В ИК-спектрах целевых продуктов присутствовали полосы поглощения валентных колебаний NH-группы в области 3290-3295 см$^{-1}$, интенсивные полосы поглощения карбонильной группы сложного эфира в области 1738-1745 см$^{-1}$, I и II амидные полосы связи C=O (1635-1640 см$^{-1}$ и 1540-1545 см$^{-1}$), а также отсутствовали полосы поглощения валентных колебаний карбонильной группы кислоты.

В ^{1}H-ЯМР спектрах метиловых эфиров модифицированных дипептидов присутствуют сигналы протонов NH-групп аминокислот, образующих пептидную связь, с различной интегральной интенсивностью. Также, при химическом сдвиге 3.60-3.65 м.д. наблюдали присутствие синглета с интегральной интенсивностью, соответствующей трем протонам метильной группы сложного эфира и отсутствовали сигналы протона карбоксильной группы исходной *N*-4-(1-адамантил) бензоил-*α*-аминокислоты в области 12.00-11.00 м.д.

Таким образом, было установлено, что метод получения метиловых эфиров модифицированных дипептидов, содержащих *N*-терминальный 4-(1-адамантил)бензоилированый фрагмент, с помощью КДИ обеспечивает высокой выход и чистоту продукта.

Также в результате работы была разработана эффективная методика выделения целевого продукта. После концентрирования реакционной смеси до ½ от начального объема и обработки 1н. раствором HCl до pH = 2-3 образовавшийся гетерогенный раствор обрабатывался хлористым метиленом, с последующим отделением органической фазы и ее осушкой хлористым кальцием. Полученный раствор концентрируют при атмосферном давлении, с последующей перекристаллизацией в *н*-гексане.

Далее полученные метиловые эфиры модифицированных дипептидов на основе 4-(1-адамантил)бензойной кислоты с помощью метода с использованием КДИ подвергались щелочному гидролизу. Реакция проводилась в ацетоне с эквимолярным количеством 1 н. раствора гидроксида натрия в течение 24 часов с последующим подкислением до pH 2-4. В результате были получены целевые модифицированные дипептиды в виде кислот с выходом 80-90%.

В ИК-спектрах полученных соединений присутствуют полосы поглощения валентных колебаний карбонильной группы кислоты в области 1725-1730 см$^{-1}$ и отсутствуют полосы поглощения карбонильной группы, относящиеся к сложному эфиру. В ^{1}H ЯМР-спектрах продуктов наблюдали наличие протонов карбоксильной группы в области 12.60-12.70 м.д. и отсутствие сигналов синглета в области химических сдвигов 3.50-3.70 м.д. относящихся к метиловому эфиру модифицированного дипептида.

Полученные продукты в водорастворимых формах (в виде натриевых солей) были изучены на *in vitro* моделях. В результате фармакологического скрининга было установлено, что модифицированные дипептиды на основе *L*-триптофана, содержащие *N*-терминальный 4-(1-адамантил)бензоилированый фрагмент, обладают антибактериальной и фунгицидной активностью. Также, в настоящее время, модифицированные дипептиды на основе 4-(1-адамантил)бензойной кислоты проходят испытания *in vivo*, о чем будет написано позднее в других источниках.

Таким образом, была синтезирована серия модифицированных дипептидов, содержащих *N*-терминальный 4-(1-адамантил)бензоилированый фрагмент, с выходом 60-70 % на исходные 4-(1-адамантил)бензоил-*α*-аминокислоты. Установлено, что с точки зрения чистоты и выхода целевого продукта наиболее рациональным является метод синтеза с использованием КДИ. Также в результате исследования была разработана методика выделения метиловых эфиров модифицированных дипептидов, которая приводит к высокой кристаллизации продукта. Строение, чистота и однородность полученных соединений подтверждены методами ИК-, 1H ЯМР-спектроскопии и ТСХ.

В результате фармакологического скрининга полученных соединений на *in vitro* модели выявлена значимая антибактериальная и фунгицидная активность модифицированных дипептидов на основе *L*-триптофана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wanka L, Iqbal K, Schreiner PR. The Lipophilic Bullet Hits the Targets: Medicinal Chemistry of Adamantane Derivatives. Chem. Rev. 2013;113:3516−3604. DOI: 10.1021/cr100264t.

2. Гудашева ТА, Сколдинов АП. Стратегия создания дипептидных нейропсихотропных лекарственных препаратов. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2003;66(2):15-20. DOI: 10.30906/0869-2092-2003-66-2-15-19.

3. Красникова НВ, Красников СВ. Синтез потенциальных противовирусных дипептидомиметиков на основе 4-(1-адамантил)бензойной кислоты. Тез. докл. Международной конференции «XXI Менделеевский Съезд по общей и прикладной химии», Санкт-Петербург. 2019;5:317.

4. Krasnikov SV, Obuchova TA, Yasinskii OA et al. Synthesis of amino acid derivatives of 4-(l-adamantyl)benzoic acid obtained by transition metal ion catalyzed oxidation of 4-(l-adamantyl)toluene. Tetrahedron letters. 2004;45:711-714. DOI: 10.1016/j.tetlet.2003.11.057.

5. Пат. 2 417 988 РФ, МПК-2006.01 C 07 D 233/66, C 07 D 233/64, C 07 D 209/14, C 07 C 233/87, C 07 C 323/29. Фармацевтически приемлемые соли (S)-N-[4-(1-адамантил)бензоил]-α-аминокислот и способы их получения. Красников СВ. Заявитель и патентообладатель Красников СВ. №2009125310/04. Заявл. 02.07.09. Опубл. 10.05.11. Бюл. № 13.

SUMMARY

SYNTHESIS OF MODIFIED DIPEPTIDES CONTAINING *N*-TERMINAL 4-(1-ADAMANTYL)BENZOYLATED FRAGMENT

Spiridonova A.V., master of the 2nd year of education
Yaroslavl State Technical University;
88, Moskovsky avenue, Yaroslavl, 150023, Russian Federation

Modified dipeptides containing an *N*-terminal 4-(1-adamantyl)benzoylated fragment and biogenic amino acids were synthesized using *N,N*-carbonyldiididazole and *N,N*-dicyclohexaid methods to create a peptide bond. Methodologies for the selection of target products have been developed. Modified dipeptides based on *L*-tryptophan *in vitro* tests showed antibacterial and fungicidal activity.

Key words: *modified dipeptides, N-terminal 4-(1-adamantyl)benzoylated fragment, biogenic amino acids, in vitro and in vivo trials, antibacterial activity, fungicidal activity, dipeptidomimetics.*

REFERENCES

1. Wanka L, Iqbal K, Schreiner PR. The Lipophilic Bullet Hits the Targets: Medicinal Chemistry of Adamantane Derivatives. Chem. Rev. 2013;113:3516−3604. DOI: 10.1021/cr100264t.

2. Gudasheva TA, Skoldinov AP. Strategija sozdanija dipeptidnyh nejropsihotropnyh lekarstvennyh preparatov. Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija. 2003;66(2):15-20. DOI: 10.30906/0869-2092-2003-66-2-15-19. (in Russ)

3. Krasnikova NV, Krasnikov SV. Sintez potencial'nyh protivovirusnyh dipeptidomimetikov na osnove 4-(1-adamantil) benzojnoj kisloty. Tez. dokl. Mezhdunarodnoj konferencii «XXI Mendeleevskij Sjezd po obshhej i prikladnoj himii». Sankt-Peterburg. 2019;5:317. (in Russ)

4. Krasnikov SV, Obuchova TA, Yasinskii OA et al. Synthesis of amino acid derivatives of 4-(l-adamantyl)benzoic acid obtained by transition metal ion catalyzed oxidation of 4-(l-adamantyl)toluene. Tetrahedron letters. 2004;45:711-714. DOI: 10.1016/j.tetlet.2003.11.057.

5. Pat. 2 417 988 RF, MPK-2006.01 C 07 D 233/66, C 07 D 233/64, C 07 D 209/14, C 07 S 233/87, C 07 S 323/29. Farmacevticheski priemlemye soli (S)-N-[4-(1-adamantil)benzoil]-α-aminokislot i sposoby ih poluchenija. Krasnikov S.V. Zajavitel' i patentoobladatel' Krasnikov SV. №2009125310/04. Zajavl. 02.07.09. Opubl. 10.05.11. Bjul. № 13. (in Russ)

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ N-ФЕНИЛБЕНЗАМИДИНОВ С АРОМАТИЧЕСКИМИ ДИКАРБОНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Труханова Ю.А., магистрант 1 года обучения
Руководитель: **Яковлев И.П.**, докт. хим. наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.14, лит А, Российская Федерация
E-mail: truhanova.yuliya@pharminnotech.com

Описан метод синтеза N'-(2(4)-карбоксибензоил)-N-фенилбензамидинов путем взаимодействия N-фенилбензамидина с соответствующей дикарбоновой кислотой в среде этилацетата. Получен прогноз спектра биологической активности с применением компьютерной программы Pass-online.

Ключевые слова: *N-фенилбензамидин, фталевая кислота, терефталевая кислота, прогнозирование биологической активности.*

Ранее сообщалось о серии замещенных амидов фталевой кислоты, обладающих гипертонической [1], антиатеросклеротической [2] и гипогликемической [3] активностью. Было обнаружено, что амиды терефталевой и фталевой кислот обладают противосудорожной активностью [4].

В свою очередь, интересен и такой класс соединений, как N-арилбензамидины, который активно изучается на кафедре органической химии СПХФУ [5]. Было найдено, что такие амидины проявляют выраженные антимикробное, противовоспалительное и анальгезирующее действия. Получение новых молекул на стыке двух описанных классов соединений, на наш взгляд, может обладать высоким потенциалом дальнейшего их применения в медицинской химии.

Целью работы стала разработка эффективного метода получения N'-(2 (4)-карбоксибензоил)-N-фенилбензамидинов, изучение их строения и прогнозирование биологической активности.

Изучена реакция N-фенилбензамидина с фталевой и терефталевой кислотами. Было установлено, что реакция идет по стандартному механизму нуклеофильного замещения с образованием N-ацилпроизводных фенилбензамидина.

По настоящей методике к N-фенилбензамидину I, суспендированному в этилацетате, добавляли кислоту II a, b (1:1,2) и перемешивали при температуре кипения в течение 5 часов (Рисунок 1). Ход реакции контролировали методом ТСХ. Выход целевых продуктов составлял не менее 80 % в пересчете на N-фенилбензамидин. Строение полученных соединений III a, b было доказано методами спектроскопии ЯМР ^{1}H, ^{13}C.

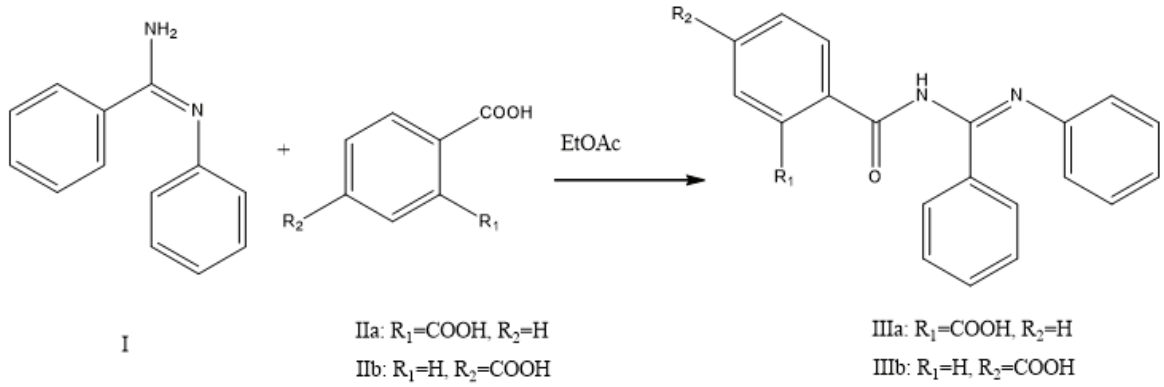


Рисунок 1. Получение ацилпроизводных N-фенилбензамидина

Стоит отметить, что проведение реакции в среде низкокипящих растворителей, таких, как хлороформ, диэтиловый эфир, дихлорметан, не давало желаемых результатов. Реакция завершалась на образовании амидиниевой соли соответствующей кислоты.

Для целенаправленного изучения биологической активности полученных соединений был проведен компьютерный скрининг в программе Pass-online. В результате была предсказана гипогликемическая, метаболическая и антикоагулянтная активности.

В ходе выполненного исследования была изучена реакция N-фенилбензамидина с фталевой и терефталевой кислотами. Подобраны оптимальные условия для получения ацилпроизводных N-фенилбензамидина. С помощью программы Pass-online предсказана биологическая активность полученных структур, что может быть использовано при дальнейшем экспериментальном изучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dolzhenko AV et al. Substituted Amides and Hydrazides of Dicarboxylic Acids. Part 11.1 Synthesis and Pharmacological Activity of a Series of Pyridylamides of Dicarboxylic Acids. Khim.-Farm. Zh. 2002;36(3):17-19.

2. Hall I. et. al. The cytotoxicity of N-pyridinyl and N-quinolinyl substituted derivatives of phthalimide and succinimide. Biomed Pharmacother. 1995;49(5):251-258. doi:10.1016/0753-3322(96)82631-X

3. Larocca JP et al. Synthesis of some substituted amides of terephthalic and isophthalic acids. J. Pharm Sci. 1967;57(7): 916-918. doi:10.1002/jps.2600560732

4. Dolzhenko AV et al. Substituted Amides and Hydrazides of Dicarboxylic Acids. Part 17. Synthesis and Antibacterial and Anticonvulsant Activity of Some Amides and Acylhydrazides of Phthalic Acid. 2003;37(7):342–344. doi:10.1023/a:1026307221989

5. Куваева ЕВ и др. Компьютерный прогноз и экспериментальная проверка биологической активности новых производных N-арилбензамидинов. Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». Казань; 2012:105-106.

SUMMARY

INTERACTIONS OF N-PHENYLBENZAMIDINES WITH AROMATIC DICARBONIC ACIDS

Truhanova J.A., 1st year student of master's degree
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A method is described for the synthesis of N- (N'-phenylbenzamidine) monoamides of phthalic and terephthalic acids by reacting N-phenylbenzamidine with the corresponding dicarboxylic acid in ethyl acetate. A prediction of the spectrum of biological activity was obtained using the Pass-online computer program.

Key words: *N-phenylbenzamidine, phthalic acid, terephthalic acid, prediction of biological activity.*

REFERENCES

1. Dolzhenko AV et al. Substituted Amides and Hydrazides of Dicarboxylic Acids. Part 11.1 Synthesis and Pharmacological Activity of a Series of Pyridylamides of Dicarboxylic Acids. Khim.-Farm. Zh. 2002;36(3):17-19.
2. Hall I. et. al. The cytotoxicity of N-pyridinyl and N-quinolinyl substituted derivatives of phthalimide and succinimide. Biomed Pharmacother. 1995;49(5):251-258. doi:10.1016/0753-3322(96)82631-X
3. Larocca JP et al. Synthesis of some substituted amides of terephthalic and isophthalic acids. J. Pharm Sci. 1967;57(7): 916-918. doi:10.1002/jps.2600560732
4. Dolzhenko AV et al. Substituted Amides and Hydrazides of Dicarboxylic Acids. Part 17. Synthesis and Antibacterial and Anticonvulsant Activity of Some Amides and Acylhydrazides of Phthalic Acid. 2003; 37(7):342–344. doi:10.1023/a:1026307221989
5. Kuvaeva EV et. al. Computer forecast and experimental verification of biological activity of new derivatives of N-arylbenzamidines. Materials of the IV Congress of Russian Pharmacologists «Innovations in modern pharmacology». Kazan; 2012:105-106 (in Russ).

ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПЕРИОДАТНОГО ОКИСЛЕНИЯ АЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Трушникова В.Э., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Иозеп А.А.**, докт. фарм. наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: vasilisa.trushnikova@spcpu.ru

В данной работе были исследованы и изучены закономерности периодатного окисление альгиновой кислоты. Окисление проходило в водной среде. Наиболее удобным окислителем при этом является метапериодат натрия.

Ключевые слова: *периодатное окисление, альгиновая кислота, полисахарид.*

Альгиновая кислота и ее соли, благодаря своим ценным свойствам представляют значительный интерес для синтеза физиологически активных полимеров. Однако сведения об изучении процесса окисления альгиновой кислоты не были найдены. В связи с этим цель нашей работы заключается в изучении и оптимизации процесса периодатного окислении альгиновой кислоты.

Окисление альгиновой кислоты периодатом натрия проводили по схеме:

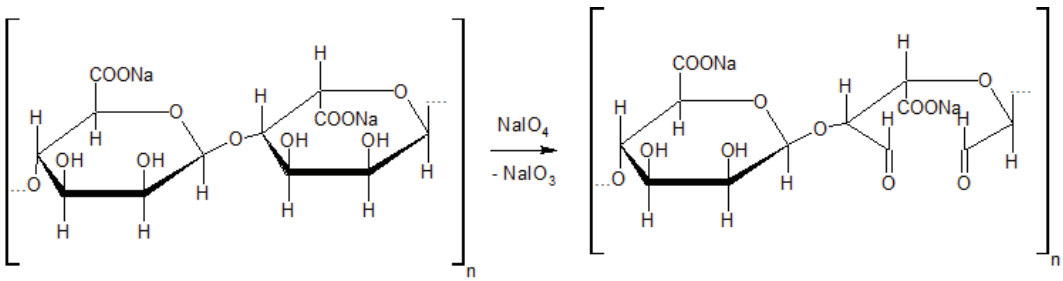


Схема 1. Синтез альгиновой кислоты полиальдегида

Для окисления использовали водные растворы альгиновой кислоты с pH = 3.5-4 и метапериодата натрия с pH = = 4-4,5 [1]. Значения pH растворов регулировали добавлением соляной кислоты. Избыток окислителя составлял 0-100% по отношению к полисахариду. Растворы смешивали и проводили окисление в темноте при комнатной температуре в течение 48-50 часов. По окончании процесса окисления реакционную массу концентрировали в вакууме до 200-250 мл,

диализовали в дистиллированной воде для удаления низкомолекулярных примесей, повторно концентрировали в вакууме до образования густого сиропа и осаждали спиртом. Осадок центрифугировали и промывали спиртом. Выделенный продукт сушили в вакууме.

Выход альгиновой кислоты полиальдегида по данной методике составил 65%. Как видно из рисунка 1, окисление альгиновой кислоты при избытке окислителя 100% (соотношение 2 моль $NaIO_4$ на 1 моль монозвена АК) протекает гораздо лучше, чем при меньших значениях.

Для предотвращения потерь была предложена методика контроля диализа для удаления низкомолекулярных примесей. Для этого брали пробу из реакционной массы до и во время диализа, к ней добавляли раствор иодида и 1 каплю концентрированной соляной кислоты, затем проводили выдержку 10 минут и добавляли крахмал. Соответственно, в образце до диализа раствор окрашивался в темно-синий цвет, спустя 1 часа диализа окраска уже была светлее, но все равно окрашивалась в синий, что означает наличие окислителя ($NaIO_3$). Спустя 14 часов анализ повторили, но уже реакционная масса не окрашивалась.

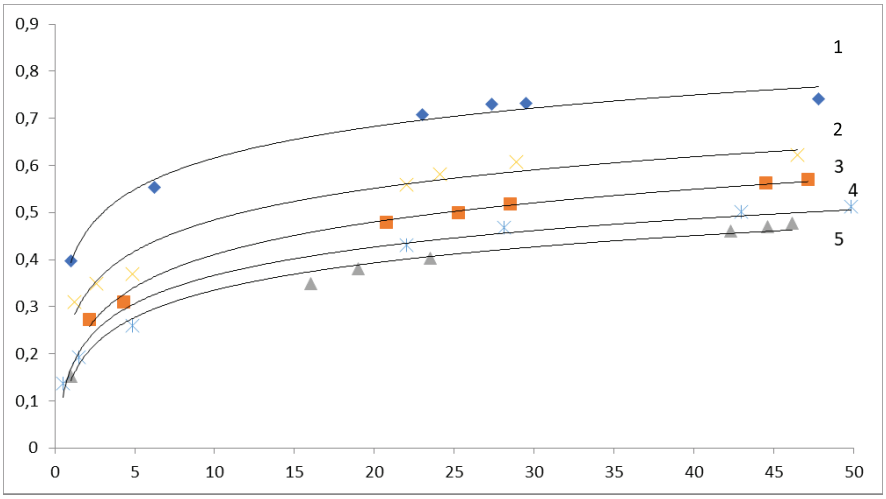


Рисунок 1. Расход периодата при окислении АК в зависимости от избытка окислителя:
1 – 2 моль $NaIO_4$ на 1 моль монозвена АК; 2 – 1,75 моль; 3 – 1,5 моль $NaIO_4$; 4 -1,25 моль $NaIO_4$; 5 – 1 моль $NaIO_4$

Для подтверждения наших выводов использовался спектрофотометрический метод анализа.

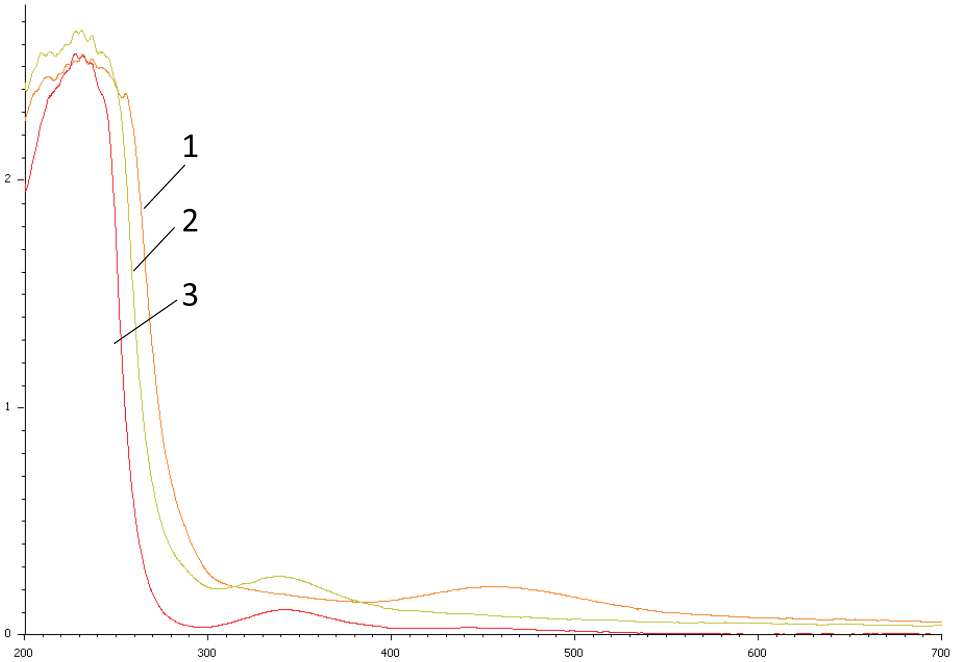


Рисунок 2. Спектры АКПА для контроля диализа: 1. До диализа 2. Спустя 1 час диализа. 3. Спустя 14 часов

Как видно из рисунка 2, до диализа есть пик в диапазоне 380-470 нм в реакционной массе. Излучения с длинами волн от 380 до 470 нм имеют фиолетовый и синий цвет, который и образуется в ходе качественной реакции. Спустя час характерно выраженного пика нет, но окраска есть. Спустя 14 часов реакционная масса отмылась от окислителя.

Данный метод контроля диализа позволил уменьшить потери полисахарида на 30%.

В ходе проделанной работы был изучен процесс окисления альгиновой кислоты и предложена методика для повышения выхода альгиновой кислоты полиальдегида с 65% до 93%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yang J-S, Xie Y-J, He W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. Carbohydrate Polymers [Internet]. Elsevier BV; 2011 Feb;84(1):33–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.048

SUMMARY

ROUTES TO IMPROVE PERIODATIC OXIDATION OF ALGINIC ACID

Trushnikova V.E., 2nd year master student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

In this work, the regularities of the periodate oxidation of alginic acid were investigated and studied. Oxidation took place in the aquatic environment. The most effective oxidizing agent is sodium metaperiodate.

Key words: *periodate oxidation, alginic acid, polysaccharide.*

REFERENCES

1. Yang J-S, Xie Y-J, He W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. Carbohydrate Polymers [Internet]. Elsevier BV; 2011 Feb;84(1):33–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.048

ОСОБЕННОСТИ ПРОТОЧНОГО ХЛОРИРОВАНИЯ В СИНТЕЗЕ БЕНДАМУСТИНА

Юраков А.М., аспирант 3 года обучения
Руководитель: **Лалаев Б.Ю.**, к.х.н., доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: andrey.yurakov@pharminnotech.com

Описаны условия протекания основных побочных процессов реакции хлорирования в синтезе бендамустина гидрохлорида моногидрата, подобраны условия процесса, обеспечивающие максимальную чистоту продукта реакции.

Ключевые слова: *бендамустина гидрохлорид, хлорирование, проточный микрореактор.*

Субстанция Бендамустин обладает цитостатическим противоопухолевым действием и используется для лечения онкологических заболеваний.

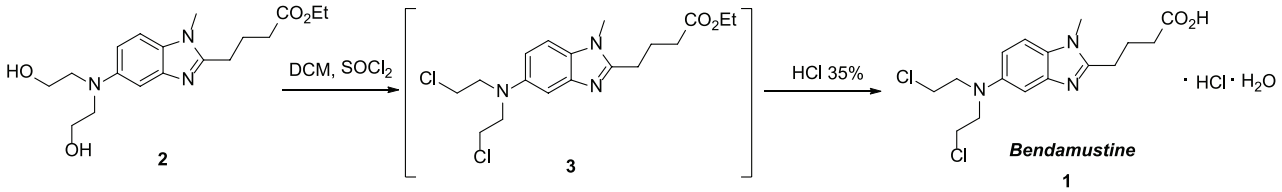


Рисунок 1. **Общая схема получения бендамустина**

Процесс идет с образованием множества побочных продуктов, что значительно осложняет очистку целевого соединения на финальной стадии [1]. Был разработан новый метод выделения промежуточного продукта **3** в безводных условиях, позволяющий достигать выходов 67-77% и хроматографической чистоты более 98%.

Исследования проводились на реакторной системе производства фирмы Corning G1 HP. Для поиска оптимальных условий была проведена серия аналитических экспериментов, в которых варьировались температура, эквивалентное количество хлористого тионила и скорость потока. Оказалось, что реакция протекает с образованием большего количества побочных продуктов, по сравнению с процессом в классическом реакторе (опыт **8**).

Таблица 1 – Подбор условий проведения хлорирования в проточном реакторе

№	Условия				A	B	C	3	D	Выход, %
	T, °C	V, мл/мин	P, bar	$SOCl_2$, eq						
1	80	40	8-10	1.1	13.32	7.24	1.02	53.58	7.51	46
2	100	40	8-10	1.1	6.77	-	0.36	87.61	0.18	79
3	120	40	12-15	1.1	3.80		0.20	90.30	0.41	56
4	100	40	8-10	1.375	0.15	0.72	3.50	88.58	0.20	70
5	100	40	8-10	1.65	0.20	0.15	7.27	80.84	0.55	62
6	100	30	8-10	1.1	2.58	1.28	1.02	87.49	1.18	73
7	100	30	8-10	1.1	3.75	0.02	1.90	88.19	1.14	72
8	38-39	-	1	1.1	-	-	1.16	95.74	0.26	90

В качестве стартовых, для оптимизации были выбраны условия эксперимента **1**. При этом наблюдаются низкие выходы продукта и значительное образование примесей **B** и **D**. Повышение температуры дает лучшие результаты, однако давление 15 бар, при котором не наблюдается кипения растворителя при 120 ºС, является предельным для эксплуатации ячейки реактора.

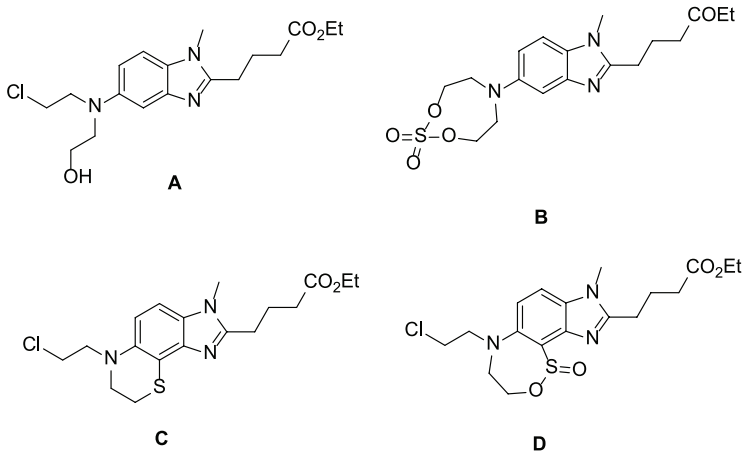


Рисунок 2. **Основные побочные продукты реакции**

Поскольку промежуточные соединения **AB** могут быть следствием неполной конверсии, были проведены опыты **4**, **5** с использованием больших эквивалентов хлористого тионила. В результате, наблюдается снижение содержания примесей **AB**, однако при этом наблюдается пропорциональное увеличение концентрации соединения **C**.

При более длительной выдержке реакционной смеси за счет снижения скорости потока до минимального (30 мл/мин), удается достичь результатов аналогичных опыту **3**. При больших загрузках (37 г) в условиях реакции **6** удалось получить с умеренным выходом 77% продукт (опыт **7**). Однако выход и чистота полученного продукта оказались значительно хуже, чем при проведении синтеза в классическом реакторе (опыт **8**). Содержание побочных продуктов **A-D** в количестве более 0.6% является критичными для процесса получения фармацевтически чистого Бендамустина **1**. Продукт реакции **7** удается очистить до необходимого уровня примесей только после многократной перекристаллизации.

При проведении реакции под давлением отщепление оксида серы становится энергетически не выгодным, и при обработке смеси триэтиламином наблюдается образование побочных продуктов **B-D** с охранением атома серы. Понижение рабочего давления в реакторе ниже 10 бар понижает содержание примесей **B-D** в конечном продукте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ozegowski W, Krebs D. Aminosäureantagonisten. III. ω-[Bis-(β-chloräthyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-propion- bzw. -buttersäuren als potentielle Cytostatika. Journal für Praktische Chemie [Internet]. Wiley; 1963 Jun;20(3-4):178–86. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/prac.19630200310

SUMMARY

FEATURES OF FLOW CHLORINATION IN THE SYNTHESIS OF BENDAMUSTIN

Yurakov A.M., 3rd year postgraduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The conditions for the occurrence of the main side processes of the chlorination reaction in the synthesis of bendamustine hydrochloride monohydrate are described, the process conditions are selected that ensure the maximum purity of the reaction product.

Key words: *bendamustine hydrochloride, chlorination, flow-through microreactor.*

REFERENCES

1. Ozegowski W, Krebs D. Aminosäureantagonisten. III. ω-[Bis-(β-chloräthyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-propion- bzw. -buttersäuren als potentielle Cytostatika. Journal für Praktische Chemie [Internet]. Wiley; 1963 Jun;20(3-4):178–86. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/prac.19630200310

РАЗРАБОТКА ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПОРИСТЫХ АЛЮМОСИЛИКАТОВ

Василенко Н.М., **Аликина Ю.А.**, асп. 3 года обучения
Руководитель: **Голубева О.Ю.**, д.х.н., в.н.с.
Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 2, Россия
E-mail: vasnadmih@yandex.ru

Ключевые слова: *энтеросорбент, алюмосиликаты, каолинит.*

Энтеросорбции является одним из основных методов в детоксикационной терапии различных патологических состояний. Применение энтеросорбентов существенно снижает метаболическую нагрузку на органы экскреции и детоксикации (печень, почки и др.), способствует нормализации моторной, эвакуаторной и пищеварительной функции ЖКТ.

Современные технологии позволяют создать большой перечень энтеросорбентов, как из синтетических, так и из природных материалов. Однако, при применении они могут вызывать дискомфорт, раздражать слизистую желудка и двенадцатиперстную кишку, у некоторых препаратов отмечается невысокая сорбционная активность, либо неудобство приема. В связи с этим поиск и разработка новых улучшенных составов данных препаратов по сей день остается актуальной задачей.

Глинистые минералы, слоистые алюмосиликаты магния или алюминия, ввиду своих уникальных свойств широко используются в качестве носителей для доставки лекарств и адсорбентов. Однако сложность контроля химического состава, размера частиц и пористо-текстурных характеристик природных силикатов, зависящих от месторождения, может ограничивать область их применения. Использование синтетических алюмосиликатов, полученных путем направленного гидротермального синтеза, с заданными свойствами позволяет снять ряд данных ограничений.

В связи с этим, целью исследования являлось получение энтеросорбента для использования в медицинских целях, его исследование и сравнение с известными промышленными поглотителями. В представляемой работе за основу энтеросорбента был взят синтетический галлуазит со сферической морфологией частиц, глинистый слоистый алюмосиликатный минерал из подгруппы каолинита.

Образцы синтезировали путем гидротермальной обработки высушенных алюмосиликатных гелей при температуре 200-220 °С в течение 3 дней. Получение алюмосиликата сферической морфологии со структурой галлуазита было подтверждено результатами рентгенофазового анализа и электронной микроскопии. Была исследована сорбционная емкость полученных образцов с помощью маркеров метиленового голубого (МГ) как катионного низкомолекулярного красителя и кармуазина (К) как анионного среднемолекулярного красителя (с=0,1 г/л). Проведено сравнение с активированным углем при pH=7. В средах, имитирующих желудок (pH=2) и кишечник (pH=7,5), результаты сопоставляли с промышленным энтеросорбентом «Полисорб». Более высокие показатели и, как результат, полное достижение сорбции, зафиксированы у синтезированного образца.

Непосредственно природный галлуазит в нейтральной среде (pH=7) показывает низкие значения сорбции (40,5 мг/г) для МГ, в случае К – 12 мг/г. Однако результаты в имитирующих средах почти во всех случаях достаточно высокие, на уровне значений, характерных для синтетических образцов. Тем не менее, наличие примесей у природных минералов и токсическое влияние при высоких концентрациях ограничивают их использование в качестве медицинских сорбентов. Промышленный энтеросорбент «Полисорб» показывает высокие значения только при сорбции положительно заряженных ионов.

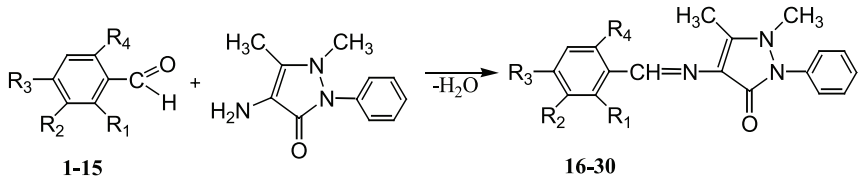
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 4-АМИНОАНТИПИРИНА С ЗАМЕЩЕННЫМИ БЕНЗАЛЬДЕГИДАМИ

Ворона Д.С., студ. 3 курса
Руководитель: **Степин С.Г.**, канд. хим. наук, доцент
Витебский государственного ордена Дружбы народов медицинский университет,
210009, Витебск, проспект Фрунзе, д. 27, Республика Беларусь
E-mail: vorona.d2000@yandex.ru

Ключевые слова: *4-аминоантипирин, бензальдегид, азометины.*

Антипирин и его производные проявляют анальгетическую, противовоспалительную и жаропонижающую активность. Азометиновые производные 4-аминоантипирина и их металлокомплексы являются перспективными противовирусными, бактерицидными и антимикотическими средствами.

Целью исследования является синтез азометиновых производных 4-аминоантипирина с замещенными бензальдегидами, которые являются потенциальными лекарственными средствами. Взаимодействием 4-аминоантипирина с *п*-диметиламинобензальдегидом **1**, гидроксибензальдегидами **2** и **3**, ванилином **4**, *изо*-ванилином **5**, *о*-ванилином **6**, ванилалем **7** и их простыми эфирами **8-15** с выходами 88-95% синтезированы соответствующие азометиновые производные **16-30** (рис. 1).



R_1=R_2=R_4=H, R_3=$N(CH_3)_2$ **1,16**; R_1= R_3= R_4=H, R_2=OH, R_4=OH **2,17;** R_1= R_2= R_4=H, R_3= OH **3,18**; R_1= R_4=H, R_2= OCH_3,R_3= OH **4,19**; R_1= R_4=H, R_2= OH, R_3= OCH_3, **5,20;** R_3= R_4=H, R_1= OH, R_2= OCH_3 **6,21;** R_1= R_4=H, R_2= OH, R_3= OC_2H_5, **7,22;** R_1= R_2= R_4= H, R_3 = $OC_{15}H_{31}$ **8,23;** R_1= R_4= H, R_2 = OCH_3, R_3 = OC_9H_{19} **9,24;** R_1= R_4= H, R_2 = OCH_3, R_3 = OC_6H_{13} **10,25;** R_1= R_4= H, R_2 = OCH_3, R_3 = OC_2H_5 **11,26;** R_1= R_4= H, R_2 = R_3 = OC_2H_5 **12,27;** R_1= H, R_2= R_3= OCH_3, R_4=Br **13,28;** R_1= R_4=H, R_1= H, R_2 = OCH_3, R_3 = OC_6H_{13} **14,29;** R_1= R_4=H, R_2=OC_2H_5, R_3= OC_6H_{13} **15,30**.

Рисунок 1. Синтеза азометиновых производных 4-аминоантипирина

Синтез проводили кипячением эквимолярных количеств 4-аминоантипирина и альдегидов 1-15 в растворе этанола в течение 1 часа. Строение синтезированных соединений 16-30 доказано спектральными методами.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ГИДРОМЕТАЛЛАТРАНЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ГИДРОКСИАЛКИЛАМИНОВ С СОЛЯМИ ПИРОМЕЛЛИТОВОЙ И ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТ

Завьялова Д.А.[1,2], студ. 4 курса
Руководитель: **Кондратенко Ю.А.**[2], к.х.н., старший научный сотрудник.
[1]Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
190013, Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 26, Российская Федерация
[2]Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН,
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 2, Российская Федерация
E-mail: Starshova18@gmail.com

Ключевые слова: *атраны, гидрометаллатраны, биологически активные вещества, биометаллы, пиромеллитовая кислота, терефталевая кислота.*

Атраны – это органические, элементоорганические и координационные производные триэтаноламина $N(CH_2CH_2OH)_3$. Благодаря исследованиям этих соединений, начатым в 1970-х годах под руководством академика М. Г. Воронкова, было обнаружено, что атраны проявляют специфическую биологическую активность широкого спектра действия. Они находят широкое применение в медицине и сельском хозяйстве. Ярким примером является лекарственный препарат трекрезан, разрешенный к применению в РФ как адаптоген и иммуномодулятор. Гидрометаллатраны благодаря содержанию эссенциальных микроэлементов, анионов биокислот и малотоксичных гидроксиалкиламинов также обладают широким спектром биологической активности. В их ряду выявлены соединения с выраженными иммуномодулирующими и антипролиферативными свойствами.

Целью данной работы является получение и исследование структуры новых биологически активных веществ в ряду гидрометаллатранов, содержащих анионы пиромеллитовой (1,2,4,5-бензолтетракарбоновая кислота, PMA) и терефталевой (1,4-бензолдикарбоновая кислота, TPH) кислот. Выбор кислот обусловлен тем, что они являются перспективными лигандами для синтеза металл-органических каркасных структур (MOFs). Сегодня MOFs находят свое применение в биомедицине, оптике, катализе и др.

На первой стадии работы были получены пиромеллитаты и терефталаты биометаллов Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II). Методами ИК спектроскопии и элементного анализа было подтверждено, что синтезированные соли имеют состав: $[M_2(PMA)\cdot mH_2O]_n$ и $[M(TPH)\cdot mH_2O]_n$ соответственно.

Задачей второго этапа работы было исследовать взаимодействие гидроксиалкиламинов (трис(2-гидроксиэтил) амин (TEA), трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS), трис(2-гидроксипропил)амин (TPA) и бис(2-гидроксиэтил) аминотрис(гидроксиметил)метан (BIS-TRIS)) с солями пиромеллитовой и терефталевой кислот для получения новых биологически активных гидрометаллатранов на их основе. Взаимодействие гидроксиалкиламинов с пиромеллитатами проводилось по ранее описанной нами методике. Полученные комплексы были охарактеризованы методами ИК и электронной спектроскопии, элементным анализом и масс-спектроскопии.

Комплексы с солями терефталевой кислоты были получены аналогичным методом. В качестве растворителя использовались вода или водометанольный раствор. Реакции проводились при молярных соотношении соль : гидроксиалкиламин – 1:1, 1:2, 1:3. Целевые гидрометаллатраны были выделены в виде окрашенных порошков или кристаллов медленным упариванием растворителя при комнатной температуре и исследованы методами ИК спектроскопии, масс-спектрометрии и элементного анализа. В данный момент их структура исследуется методом рентгеноструктурного анализа.

Среди синтезированных гидрометаллатранов комплексы TRIS, TPA с пиромеллитатами Co(II), Ni(II), Cu(II), а также комплекс TEA с терефталатом Zn(II) были выбраны для исследования их противомикробной активности на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ПСПбГМУ.

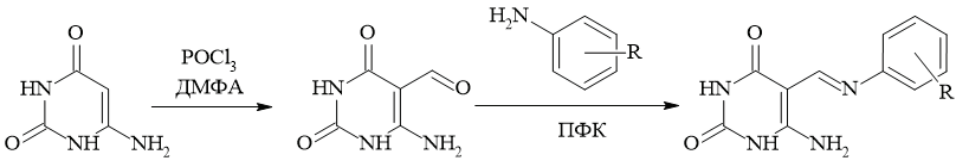
СИНТЕЗ НОВЫХ 5-АРИЛИМИНОМЕТИЛ-1*H*-ПИРИМИДИН-2,4-ДИОНОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И ПРОТИВОГРИБКОВЫХ АГЕНТОВ

Зазулина А.А., маг. 2 курса, **Савицкас В.Э.**, маг. 2 курса
Руководитель: **Крутиков В.И.**, докт. хим. наук, проф.
Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 26
E-mail: kruerk@yandex.ru

Ключевые слова: *целенаправленный синтез, иммуномодуляторы, противовирусные препараты, антибактериальная активность, противогрибковая активность, молекулярный докинг*

На сегодняшний день биологическая активность 5-арилиминометил-1*H*-пиримидин-2,4-дионов мало изучена. Однако, соединения, предшественниками которых являются их аналоги, проявили себя как потенциальные противовирусные препараты.

В настоящей работе был синтерирован ряд соединений с общей формулой **I** в соответствии со схемой:



I

где R = 4-Br, 2,6-Cl_2, 2,4-$(OCH_3)_2$-5-Cl, 4-CH_3; ПФК– полифосфорная кислота

Прогноз биологической активности целевых соединений проводили с использованием пакета программ PASS. Результат прогнозирования биологической активности представлен на рисунке 1. Выявлено, что соединения **I** способны ингибировать птериндезаминазу, которая играет важную роль в регуляции концентрации птерина в бактериях, отвечающего за строительство клеточной стенки, поэтому весьма вероятным следует считать проявление целевыми соединениями антибактериальной активности.

Биотестирования соединений **I** показали, что 5-арилиминометил-1*H*-пиримидин-2,4-дионы проявляют умеренную активность по отношению к *Escherichia coli 25922*, *Staphylococcus aureusniger*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* и значительную активность по отношению к *Mycobacterium tuberculosis 29213*, MIC_{100} которого составила – 25 мкг/мл.

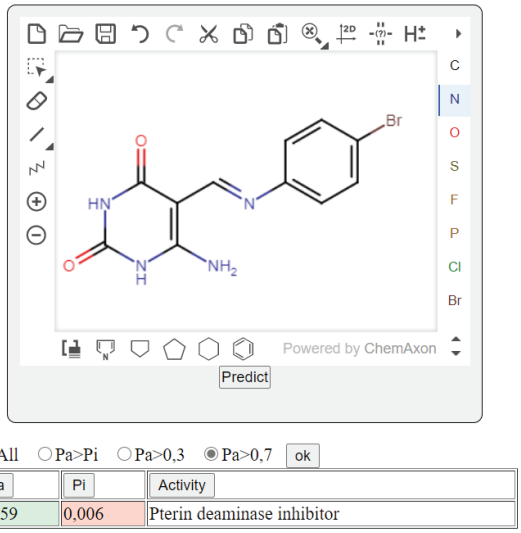


Рисунок 1. Прогноз биологической активности 6-амино-5-[(4-бром-фенилимино)-метил]-1*H*-пиримидин-2,4-диона

На основании полученных данных с использование пакета программ MCule был выполнен молекулярный докинг синтезированных соединений. В таблице 1 перечислены значения оценок стыковки лиганда с ферментом. Чем больше значение, тем выше аффинность связывания молекулы исследуемых соединений и биомишени.

Таблица 1 – Аффинность связывания соединений I с инозитол-3-фосфатсинтазой

R	Docking score
	Inositol-3-phosphate synthase
4-Br	7,9
2,6-Cl_2	7,9
2,4-$(OCH_3)_2$-5-Cl	8,0
4-CH_3	7,7

На рисунке 2 представлен результат молекулярной стыковки 6-амино-5-[(4-бром-фенилимино)-метил]-1*H*-пиримидин-2,4-диона с инозитол-3-фосфатсинтазой, содержащейся в *Mycobacterium tuberculosis 29213*. Молекулярная стыковка соединения с биомишенью была смоделирована с использованием пакета программ PLIP.

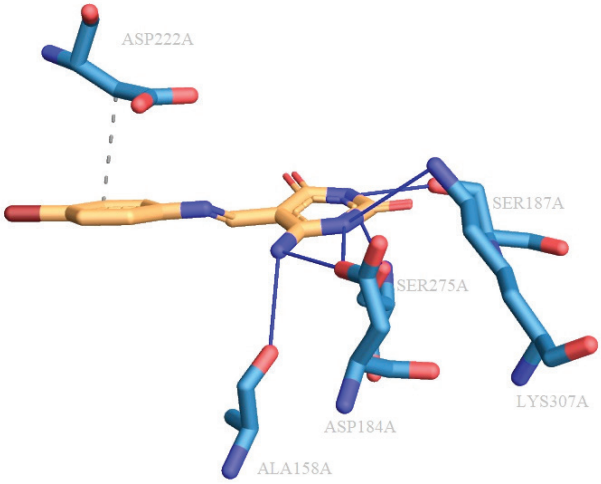


Рисунок 2. Молекулярная стыковка 6-амино-5-[(4-бром-фенилимино)-метил]-1*H*-пиримидин-2,4-диона с ферментом *Inositol-3-phosphate synthase*

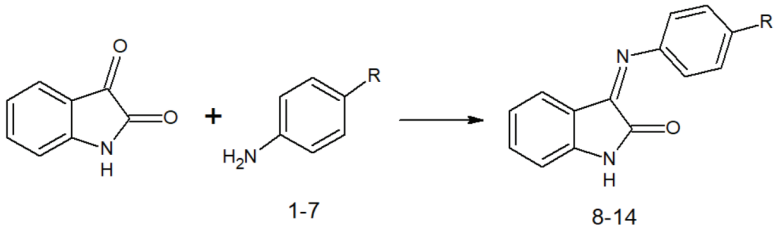
СИНТЕЗ АЗОМЕТИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗАТИНА И АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОВ

Ляльков Н.Н., **Синяк М.И.**, студ. 2 курса
Руководитель: **Степин С.Г.**, канд. хим. наук, доц.
Витебский государственного ордена Дружбы народов медицинский университет,
210009, Витебск, проспект Фрунзе, д. 27, Республика Беларусь
E-mail: nlyalkov@gmail.com

Ключевые слова: *изатин, основания Шиффа, синтез, ароматические амины.*

Производные изатина проявляют антимикробную, противовирусную, антимикотическую, противоопухолевую, противотуберкулезную, антималярийную, противовоспалительную, анальгетическую, антидепресантную активность. Значительная электрофильная активность атома углерода в карбонильной группе изатина делает изатин удобным синтоном для синтеза азометиновых производных, которые обладают широким спектром биологической активности.

Целью исследования является синтез азометиновых производных изатина с ароматическими аминами: *п*-аминобензойной кислотой **1**, анестезином **2**, стрептоцидом **3**, гидрохлоридом новокаина **4**, *п*-аминоазобензолом **5,** *п*-аминоацетофеноном **6, и** 4-аминоантипирином **7**. Взаимодействием изатина с ароматическими аминами **1-7** с выходом 60-80% синтезированы соответствующие азометиновые производные **8-14** (рис. 1).



R_1=R_8=COOH (**1**, **8**); R_2=R_9=SO_2NH_2 (**2**, **9**); R_3=R_{10}=[$COO(CH_2)_2N(Et)_2$]*HCl (**3**, **10**); R_4=R_{11}=NH_2 (**4**, **11**); R_5=R_{12}=N_2Ph (**5**, **12**); R_6=R_{13}=$(CO)CH_3$ (**6**, **13**)

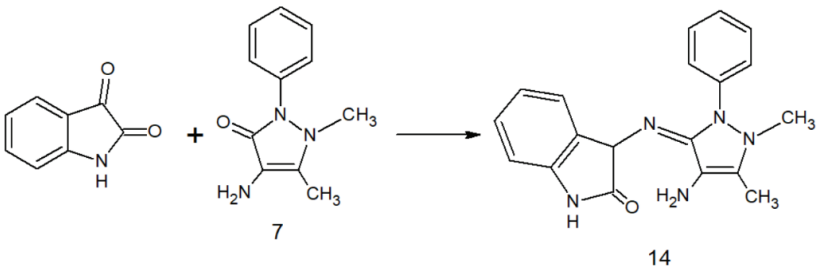


Рисунок 1. Синтез азометиновых производных изатина

Синтез проводили кипячением эквимолярных количеств изатина и ароматических аминов в растворе этанола в присутствии каталитических количеств ледяной уксусной кислоты в течение 4-6 часов. Строение синтезированных соединений **8-14** доказано спектральными методами. Синтезированные соединения содержат фармакофорные группы изатина, местноанестезирующих **7,9**) и бактерицидных лекарственных средств **8** и являются потенциальными гибридными лекарственными средствами.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРОТОННЫЕ ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ И КОМПЛЕКСЫ ТЕТРАКИС(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)ЭТИЛЕНДИАМИНА

Маковская О.Н.[1,2], студ. 4 курса
Руководитель: **Кондратенко Ю.А.**[2], к.х.н., старший научный сотрудник
[1]Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
190013, Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 26, Российская Федерация
[2]Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН,
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 2, Российская Федерация
E-mail: makovskai_olya@mail.ru

Ключевые слова*: протонные ионные жидкости, протатраны, гидроксиалкиламины, внутрикомплексные соединения гидроксиалкиламинов.*

Одной из актуальных проблем на сегодняшний день является поиск новых экологически безопасных веществ, обладающих высокой противомикробной активностью широкого спектра действия. Такими свойствами отличаются биологически активные протонные ионные жидкости (ПИЖ), представляющие огромный интерес для современной науки и техники. В частности, к ним относятся трис(2-гидроксиэтил)аммониевые соли (ТЕА соли) карбоновых кислот.

ТЕА соли (также известные как протатраны) легко образуются взаимодействием трис(2-гидроксиэтил)амина с карбоновой кислотой в среде полярного растворителя. Рентгеноструктурный анализ показал, что в катионах трис(2-гидроксиэтил)аммония три гидроксильные группы окружают аммонийный атом водорода с образованием трех внутримолекулярных водородных связей. Многолетние исследования данного класса соединений под руководством академика М.Г. Воронкова позволили открыть лекарственный препарат адаптогенного и иммуномодулирующего действия трекрезан на основе трис(2-гидроксиэтил)аммониевой соли 2-метилфеноксиуксусной кислоты.

Цель настоящего исследования заключалась в получении и исследовании структуры и свойств протонных ионных жидкостей и комплексов на основе малоизученного *N,N,N´,N´*-тетракис(2-гидроксиэтил)этилендиамина (THEED). Благодаря содержанию двух аминогрупп, каждая из которых связана с двумя гидроксиэтильными группами, следует ожидать, что катионы THEED солей будут характеризоваться протатрановой структурой.

На первой стадии работы для получения ранее неизвестных гидроксиалкиламмониевых солей были выбраны следующие биологически активные карбоновые кислоты: бензойная, коричная, салициловая, 2-метилфеноксиуксусная, 2-метил-4-хлорфеноксиуксусная, фталевая, терефталевая, пиромеллитовая, янтарная, яблочная, малоновая и щавелевая. Взаимодействие THEED с карбоновыми кислотами проводилось по ранее описанной нами методике. Полученные соли были охарактеризованы методами ИК и электронной спектроскопии, элементным анализом и масс-спектроскопии.

Целью второй стадии было получение комплексов THEED (гидрометаллатранов). Нами были выбраны следующие соли: бензоат меди (II), салицилат меди (II), циннамат меди (II), бензоат никеля (II), циннамат никеля (II), бензоат цинка (II), циннамат цинка (II) а также хлорид кобальта (II), хлорид цинка (II), хлорид меди (II) и хлорид лантана (III). Взаимодействие THEED с солями было исследовано в среде метанола, этанола или воды при молярном соотношении реагентов 0,5:1 и 1:1. Продукты реакции были выделены в виде порошков медленным упариванием органического растворителя при комнатной температуре. Состав и строение продуктов реакции в данный момент устанавливаются с помощью методов ИК спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа и рентгеноструктурного анализа.

В настоящий момент на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ПСПбГМУ исследуется противомикробная активность некоторых синтезированных ПИЖ и водорастворимого комплекса THEED с хлоридом кобальта (II).

Моделирование патологических состояний и методы их оценки. Фармакологическая оценка природных и синтетических соединений

Бурное развитие фармакологии на современном этапе развития медицинской науки базируется на широком использовании биомоделирования как ведущего инструмента в процессе создания лекарственных препаратов. В рамках такого моделирования можно оценивать не только фундаментальные особенности развития патологических состояний, но и осуществлять направленный поиск фармакологических агентов, оценивать их фармакотерапевтический потенциал и даже клинические перспективы. При этом тесное взаимодействие фармакологии с другими биомедицинскими науками открывает новые воодушевляющие возможности в разработке инновационных лекарственных средств.

19 апреля 2021 года в рамках XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» состоялось заседание секции «моделирование патологических состояний и методы их оценки. Фармакологическая оценка природных и синтетических соединений». Заседание объединило лучшие выступления, ранее заслушанные на отборочном этапе конференции, проходившем в подразделениях СПХФУ – кафедрах фармакологии и клинической фармакологии, биохимии, физиологии и патологии, НОЦ МКТ.

Работу секции открыли сообщения представителей ООО НТФФ Полисан, ООО Фармбиолайн и ГК Герофарм, посвященные организации и проведению доклинических исследований и вызвавшие живой интерес у участников конференции.

В научной части заседания прозвучали доклады, подготовленные студентами и аспирантами СПХФУ (Приходько В.А., Кан А.В., Демакова Н.В., Сухоруков А.А.), а также представителями Рязанского государственного университета им. академика И.П. Павлова (Копаница М.А.), Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) (Романова А.А.). Ряд работ были выполнены студентами СПХФУ в сотрудничестве с сотрудниками Института цитологии РАН (Литвинова М.В.), Института экспериментальной медицины (Зенкова А.К.) и Центра детской травматологии и ортопедии им. Г.И. Турнера (Ли А.О.).

Тематика представленных докладов охватывала изучение новых нейротропных соединений, фундаментальные и прикладные вопросы регуляции и фармакотерапии опухолевого роста, возможности использования фитопрепаратов для коррекции ожирения и перспективы создания микробиореакторов.

Жюри отметило высокий уровень докладов, их несомненную теоретическую значимость и практическую ориентированность. Работам, которые произвели наиболее яркое впечатление, были присуждены призовые места:

I место – Приходько Вероника Александровна – аспирант 2-го года обучения ФГБОУ ВО СПХФУ за работу «Влияние производных аллилморфолина на поведение Danio rerio в тесте «новый аквариум»»;

II место – Копаница Мария Андреевна, ассистент Рязанского государственного университета им. академика И.П. Павлова за сообщение «Противоопухолевая активность гликонаночастиц золота»;

III место – Демакова Наталья Владимировна, студент 5 курса ФГБОУ ВО СПХФУ за доклад «Исследование Эффективности фитопррепаратов на основе женьшеня, диоскореи и якорцев на экспериментальной модели алиментарного ожирения».

Мы искренне благодарим организаторов и участников конференции, вложивших свои силы, время и энергию в осуществление этого научного форума молодых ученых.

Модератор секции
Сергей Владимирович Оковитый
заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России,
д-р.мед. наук, профессор

Моделирование патологических состояний и методы их оценки. Фармакологическая оценка природных и синтетических соединений

19 апреля 2021 10:00

Трансляция заседания тематической секции доступна по ссылке и QR-коду

https://spcpu.ru/himfarm_life/events/2488/

Научный редактор секции

Титович Ирина Александровна, директор департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. биол наук

Кафедра фармакологии и клинической фармакологии

Оковитый Сергей Владимирович, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, д-р. мед. наук, профессор

Кафедра биохимии

Кириллова Надежда Васильевна, заведующий кафедрой биохимии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, д-р. биол. наук, профессор

Кафедра физиологии и патологии

Тюкавин Александр Иванович, заведующий кафедрой физиологии и патологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, д-р. мед. наук, профессор

Программа конференции доступна по ссылке и QR-коду

http://www.ypharm.spcpu.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ ЭТИЛТИОБЕНЗИМИДАЗОЛА ФУМАРАТА

Болотина Ю.Д., студ. 5 курса
Руководитель**: Болотова В.Ц.**, канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А.
E-mail: bolotina.yuliya@pharminnotech.com

Изучен вопрос влияния этилтиобензимидазола фумарата (ЭТБИФ) на физическую работоспособность лабораторных животных при курсовом введении. Установлено, что курсовое введение ЭТБИФ в дозе 25 мг/кг приводит к достоверному увеличению времени плавания мышей в 2,2 раза от исходных значений, в 1,5 раза от показателей контрольной группы и в 1,4 раза от показателей соединения сравнения – этилтиобензимидазола гидрохлорида.

Ключевые слова: *этилтиобензимидазола фумарат, физическая работоспособность, курсовое введение.*

Одной из главных задач современного спорта является поиск методов эффективного повышения и сохранения работоспособности спортсмена. Для внедрения в спортивную практику новых фармакологических средств необходимо, чтобы оно соответствовало ряду требований: способствовало расширению адаптационных возможностей организма спортсменов к физическим нагрузкам, ускоряло процессы восстановления, предупреждало развитие перетренированности, способствовало коррекции иммунодепрессии и др. Как правило, для поддержания и увеличения работоспособности используют препараты аминокислотного или белкового происхождения, адаптогены, антиоксиданты, макроэрги и др. Данные средства применяют в разные периоды подготовки спортсменов (восстановительный, подготовительный, предсоревновательный), так как большинство из перечисленных групп препаратов обладают разными механизмами действия, и следовательно, различной эффективностью в тот или иной соревновательный период [2]. Однако прием большого числа средств может оказывать и неблагоприятное влияние на здоровье спортсмена за счет увеличения риска появления побочных эффектов или снижения эффективности препаратов [4]. Таким образом, поиск универсального фармакологического средства, эффективного во всех периодах подготовки спортсмена является актуальным. Перспективным представляется изыскание таких препаратов среди класса синтетических адаптогенов, имеющих широкий спектр фармакологической активности и обладающих выраженным актопротекторным действием [3, 4].

Цель исследования: изучение влияния курсового применения этилтиобензимидазола фумарата на физическую работоспособность лабораторных животных.

Исследования проводились на беспородных мышах-самцах массой 22-24 г, в соответствии с приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», согласно утвержденному письменному протоколу. Животные были получены из ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская область), прошли необходимый карантин и содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде.

Животные были рандомизированы на 3 группы по 10 мышей в каждой. Первой группе животных вводили этилтиобензимидазола фумарат (ЭТБИФ), вторая группа получала референсный препарат из группы синтетических адаптогенов – этилтиобензимидазола гидрохлорид (ЭТБИГХ), а третья группа – контрольная, получала эквиобъемное количество физиологического раствора. Все вещества вводили внутрижелудочно в дозе 25 мг/кг с помощью зонда 1 раз в день, 5 дней в неделю в течение 2 недель. Доза ЭТБИГХ выбрана на основании литературных данных [5], а ЭТБИФ – на основании результатов скринингового исследования ЭТБИФ в диапазоне доз от 5 мг/кг до 75 мг/кг.

Оценку физической работоспособности проводили в тесте «Вынужденное плавание» со смешанной (аэробно-анаэробной) нагрузкой (с грузом 7,5% от массы тела). Исследования выполняли в плавательной установке, представляющей собой 200-литровый бассейн высотой 40 см, шириной 35 см и длинной 80 см, заполняемый водой до половины. Внутри него располагался внутренний контур из оргстекла высотой 30 см, шириной 30 см и длинной 75 см, разделенный на 10 отсеков (15х15 см каждый). Установку заполняли до половины десатурированной водой температуры 22-24ºС. Десатурацию воды проводили путем предварительного отстаивания воды в течение суток. За 30 минут до начала эксперимента животному в области межреберья фиксировалось утяжеление (7,5% от массы тела). Во время теста животных помещали в соответствующий отсек бассейна и сразу включали секундомер. Критерием окончания тренировки являлось погружение животного на дно бассейна без плавательных движений или неудачной попытки всплыть на поверхность более 3-х сек, после чего животное извлекали из бассейна, обсушивали мягкой тканью и помещали в стандартную клетку. Тренировки животных осуществляли 3 раза в неделю через день в течение 2 недель. Такой режим тренировок был выбран, чтобы избежать у мышей развития перетренированности [1].

Статистическую обработку результатов проводили методами однофакторного (тест ANOVA) дисперсионного анализа в пакете статистического анализа данных табличного процессора Excel for Windows. Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде: средняя арифметическая (M) ± ошибка среднего арифметического (m).

В результате эксперимента установлено, что в контрольной группе через 2 недели тренировок физическая работоспособность увеличилась в 1,3 раза (+31,6%) (p<0,05)по сравнению с исходным её уровнем (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние курсового введения исследуемых препаратов на физическую работоспособность мышей

Препарат	Продолжительность плавания, сек
	M±m, сек
Исходный уровень	
Контрольная группа	1130,4±98,8
ЭТБИГХ	1099,3±129,7
ЭТБИФ	1002,1±93,1
Через 2 недели	
Контрольная группа	1488,4±78,9[1]
ЭТБИГХ	1611,7±74,7[1,3]
ЭТБИФ	2197,7±218,4[2,3,4]

Примечание: 1 – статистически значимые отличия от исходного уровня (p<0,05); 2 – статистически значимые отличия от исходного уровня (p<0,001); 3 – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05); 4 – статистически значимые отличия от группы ЭТБИГХ (p<0,05).

В группе ЭТБИГХ через 2 недели введений и тренировок работоспособность была выше в 1,5 раза от исходного уровня (+46,6%), и в 1,1 раза (8,28%) от контрольной группы (p<0,05). В группе мышей, которым вводили ЭТБИФ, показатели работоспособности через 2 недели эксперимента были выше исходного уровня в 2,2 раза (+54,4%) (p<0,001) и больше значений контрольной группы в 1,5 раза (+47,6%) (p<0,05), превышая время плавания на фоне ЭТБИГХ в 1,4 раза (+36,3%) (p<0,05).

При курсовом введении этилтиобензимидазола фумарата в дозе 25 мг/кг происходит повышение физической работоспособности лабораторных животных, преимущественно за счет увеличения их выносливости.

Актопротекторная активность этилтиобензимидазола фумарата статистически значимо превышает таковую эталонного актопротектора этилтиобензимидазола гидрохлорида в 1,4 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каркищенко НН, и др. Биомедицинское (доклиническое) изучению лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность: методические рекомендации. М.: ФМБА России, 2017.

2. Каркищенко НН, Уйба ВВ, Каркищенко ВН. и др. Очерки спортивной фармакологии. Том 2. Векторы фармакопротекции. М.; СПб.: Айсинг. 2014.

3. Оковитый СВ. Актопротекторы как синтетические адаптогены нового поколения. Психофармакология и биологическая наркология. 2003;3(1–2):510–516.

4. Оковитый СВ, Шустов ЕБ, Болотова ВЦ. Работоспособность. Утомление. Коррекция. М.: Кнорус. 2019.

5. Смирнов АВ. Влияние бемитила на перекрестную адаптацию к гипобарической гипоксии и физической нагрузке Фармакологическая коррекция гипоксических состояний (материалы второй всесоюзной конференции). Гордно. 1991:49–50..

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFECT OF ETHYLTHIOBENZIMIDAZOLE FUMARATE ON PHYSICAL PERFORMANCE

Bolotina Yu.D., 5th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The assessment of the preservation of the physical performance of laboratory animals with the use of ethylthiobenzimidazole fumarate (ETBIF) at a course administration was carried out. It was established that the studied pharmacological agent at dose of 25 mg/kg increases the endurance of animals by 1.4 times compared to ethylthiobenzimidazole hydrochloride.

Key words: *ethylthiobenzimidazole fumarate, physical performance, course administration.*

REFERENCES

1. Karkishchenko NN, et al. Biomedicinskoe (doklinicheskoe) izuchenie lekarstvennyh sredstv vliyayushchih na fizicheskuyu rabotosposobnost': metodicheskie recomendacii. Moscow: FBMA, 2017. (In Russ).

2. Karkishchenko NN, Ujba VV, Karkishchenko VN et al. Ocherki sportivnoj farmakologii. T 2. Vektory farmakoprotekcii. Sankt Peterburg: Ajsing, 2014. (In Russ).

3. Okovityj SV. Aktoprotektory kak sinteticheskie adaptogeny novogo pokoleniya. Psihofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya. 2003;3(1-2):510-516. (In Russ).

4. Okovityj SV, Shustov EB, Bolotova VC. Rabotosposobnost'. Utomlenie. Korrekciya. Moscow: Knorus, 2019 (In Russ).

5. Smirnov AV. Vliyanie bemitila na perekrestnuyu adaptaciyu k gipobaricheskoj gipoksii i fizicheskoj nagruzke. Farmakologicheskaya korrekciya gipoksicheskih sostoyanij (materialy vtoroj vsesoyuznoj konferencii) Gordno. 1991: 49–50. (In Russ).

ВЛИЯНИЕ ЭМПАГЛИФЛОЗИНА И ОРНИТИНА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

Гусева А.О., студ. 5 курса

Руководители: **Суханов Д.С.**, докт. мед. наук, проф., **Спасенкова О.М.**, канд. мед. наук, доц.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация

E-mail: guseva.aleksandra@pharminnotech.com

Исследованы некоторые показатели перекисного окисления белков и липидов печени мышей в норме и при неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Модель НАЖБП воспроизводилась при сочетании гиперкалорийной диеты и введения тетрахлорметана. Изучено влияние ингибитора натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (SGLT-2) эмпаглифлозина и L-орнитина на перекисное окисление белков и липидов при экспериментальной НАЖБП. Выявлено достоверное уменьшение свободно радикального окисления белков печени, под влиянием эмпаглифлозина в группе животных с НАЖБП.

Ключевые слова: *эмпаглифлозин, L-орнитин, неалкогольная жировая болезнь печени, свободно радикальное окисление, малоновый альдегид, альдо- и кетогидразоны.*

Неалкогольная жировая болезнь печени является самой распространенной патологией печени, которая затрагивает примерно 25% взрослого населения во всем мире. Спектр заболевания колеблется от простого стеатоза до стеатогепатита, фиброза и гепатоцеллюлярной карциномы, что является ведущими причинами для трансплантации печени. Единого механизма развития НАЖБП не существует, так как заболевание является сложным многофакторным процессом. В основе патогенеза НАЖБП лежит накопление избыточного количества триглицеридов и других производных холестерина в гепатоцитах. При этом, происходит повреждение митохондрий продуктами бета-пероксисомного окисления жирных кислот, повышение синтеза эндогенных жирных кислот или снижение высвобождения и утилизации их из печени. В прогрессировании НАЖБП важную роль играет активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) с одновременной депрессией ферментов антиоксидантной защиты печени [1]. Литературных данных по изучению окислительной модификации белков при НАЖБП к настоящему времени в доступной научной литературе практически нет. Поэтому изучение окислительной модификации белков, наряду с оценкой перекисного окисления липидов и состоянием антиоксидантной защитной системы организма при данных патологиях является чрезвычайно актуальным, так как полученные результаты позволят не только уточнить некоторые механизмы их развития, но и дадут возможность их использования для прогнозирования течения и лечения заболевания.

Целью данной работы было изучение процессов свободно радикального окисления липидов и белков на модели НАЖБП, воспроизведенной сочетанием гиперкалорийной диеты с введением тетрахлорметана, а также оценка влияния эмпаглифлозина и L-орнитина на биохимические показатели перекисного окисления липидов и белков при экспериментальном стеатозе печени.

Объект исследования. Эмпаглифлозин представляет собой (2S,3R,4R,5S,6R)-2-[4-хлоро-3-[[4-[(3S)-оксолан-3-ил] оксифенил]метил]фенил]-6-(гидроксиметил)оксан-3,4,5-триол. Молекулярная масса 451 г/моль, химическая формула представлена на рисунке.

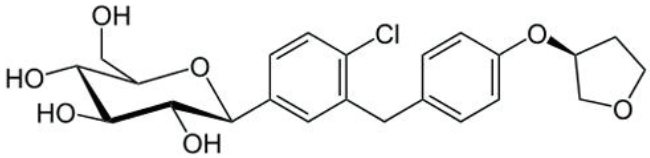


Рисунок. Химическая формула эмпаглифлозина

Препарат разработан компанией «БерингерИнгельхайм» и включен в анатомо-терапевтическо-химическую классификацию (АТХ) в 2014 году. Торговое наименование – Джардинс®. Является обратимым, высокоактивным, селективным

и конкурентным ингибитором натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (SGLT2). Препятствует реабсорбции глюкозы в проксимальных почечных канальцах.

Препарат вводился перорально через желудочный зонд в суточной дозе 2 мг/кг для мышей. В качестве референсного препарата было выбрано гепатопротекторное, гипоазотемическое средство орнитин в лекарственной форме гранул для приготовления раствора для приема внутрь в дозе 1,5 г/кг. Работа проведена на инбредных мышах-самцах линии C57Bl/6, массой тела 20-25 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область). Методом рандомизации животных разделили на 4 группы (по 25 мышей в каждой): 1-я группа – интактные животные, 2-я группа – экспериментальная, на которой была поставлена модель НАЖБП, 3-я – модель НАЖБП + эмпаглифлозин (Джардинс®, испытуемый препарат), 4-я – модель НАЖБП + L-орнитин. Исследуемый препарат и препараты сравнения вводили в течение всего эксперимента 1 раз в день в следующих дозировках: эмпаглифлозин 2мг/кг; L-орнитин 1,5г/кг. Моделирование НАЖБП проводили путем использования высокожировой западной диеты и инъекционного введения тетрахлорметана (CCl_4). Диета включала добавление 21,1% говяжьего жира топленого, 41% d-фруктозы и 1,25% холестерина к стандартному корму, а также 42 г/л d-фруктозы в питьевую воду. CCl_4 вводился один раз в неделю внутрибрюшинно в дозе 0,32 мг/г массы тела, предварительно растворенный в миндальном масле [2]. Интактные животные получали стандартный корм и питьевую воду без добавок. Длительность экспериментального исследования составила 20 недель.

Животных выводили из эксперимента методом декапитации. Для забора и извлечения органов использовали стерильные, предварительно заточенные инструменты. Для вскрытия полостей и захвата окружающих тканей задействовались пинцет с зубчиками (хирургический) и хирургические ножницы (Купера). Для выделения органов применялся пинцет с плоскими браншами (анатомический). После эвтаназии тело животного фиксировалось в положении на спине. Кожа нижней части живота захватывалась, приподнималась и надрезалась ножницами, после чего производился продольный разрез по срединной линии живота от паха до основания шеи. Печень отделялась от удерживающих ее связок и извлекалась целиком, промывалась в емкости со стерильным физиологическим раствором натрия хлорида 0,9%, обсушивалась с помощью фильтровальной бумаги, после чего подвергалась немедленной заморозке при -80°С для последующей оценки степени перекисного окисления белков и липидов (ПОЛ).

Оценку перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях печени определяли по содержанию конечного продукта ПОЛ – малонового альдегида [3]. Метод основан на том, что малоновый альдегид при взаимодействии с тиобарбитуровой кислотой образует окрашенный в розовый цвет комплекс, имеющий максимум поглощения при 530 нм.

Навеску ткани печени 1 г растирали в фарфоровой ступке и гомогенизировали в 3 мл 0,9% физиологического раствора. Приготовленный гомогенат помещали в центрифужные пробирки и добавляли 1 мл 20% ТХУ для осаждения белков. Осадок белков отделяли центрифугированием 10 мин при 4000g (Centrifuge 5413 «Eppendorf»). Надосадочную жидкость в количестве 2 мл переносили в пробирки, добавляли 1 мл 0,8% раствор тиобарбитуровой кислоты и помещали на кипящую баню на 10 мин. В качестве контроля использовали пробы, содержащие вместо надосадочной жидкости эквивалентный объем физраствора. После развития розовой окраски пробы охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при 530 нм (СФ-80 «Hitachi» или «Lambda», США, кювета с длиной луча 1 см) против контрольной пробы.

Расчет содержания малонового альдегида в пробах проводили по формуле

$$C = \frac{E * V1}{0{,}156 * V2}$$

где E – оптическая плотность при 530 нм;

V1 – общий объем исследуемых проб;

V2 – объем надосадочной жидкости, взятой на определение;

0.156 – молярный коэффициент экстинции 1 нмоль малонового альдегида в 1 мл при 530 нм.

Определение окислительной модификации белков печени, производили по оценке карбонильных группировок белков печени и определяли по методу с некоторыми модификациями [4]. Данные методы основаны на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофеннилгидразином (ДНФГ) с образованием окрашенных альдо- и кетогидразонов, которые регистрируют спектрофометрически при длинах волн 430 нм и 370 нм.

Гомогенат печени получали из расчета 1: 50, использованием 0,25 М раствора сахарозы в 50 мМтрис-солянокислом буфер, содержащем 1 мМ ЭДТА, pH=7,4. Гомогенат центрифугировали при 14000 об/мин на микрофуге Ependorf (США), в дальнейшей работе использовали полученную надосадочную жидкость.

При анализе спонтанной окислительной модификации белков печени в опытные и контрольные пробы добавляли 0, 5 мл супернатанта, далее прибавляли по 0,5 мл 2 М HCl (контроль) или 0,5 мл 10 мМ ДНФГ в 2 М HCl (опытная проба). Через 10 мин в контрольные и опытные пробы добавляли 1 мл 20% ТХУ. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре пробы центрифугировали при 3000 g в течение 15 минут и осадки промывали дважды смесью этанола и этилацетата (1:1). При этом, происходила экстракция ДНФГ и липидов, которые не прореагировали с карбонильными группами окисленных белков. Осадки подсушивали на воздухе, а затем растворяли в растворе 8 М мочевины. Оптическую плотность полученных растворов 2,4-динитрофенилгидразонов регистрировали спектрофотометрически (СФ-80 «Hitachi» или «Lambda», США) при λ =370 нм и 430 нм. О содержании карбонильных групп судили по соотношению оптической плотности нейтральных аминокислот полученных растворов при 370, алифатические альдегиды основных аминокислот при 430 нм и выражали в оптических единицах на 1 мг белка, определенного по методу Лоури.

Таблица – Уровень перекисного окисления белков и липидов в гомогенате печени лабораторных животных

Группа мышей	Содержание нейтральных карбонильных групп, $Д_{370}$ / мг белка	Содержание основных карбонильных групп, $Д_{430}$ / мг белка	Малоновый альдегид, нмоль/г тк.
1. Интактные крысы (стандартный корм)	2.2±0.25	1.0±0.12	5.9±0.61
2. Контроль, неалкогольная жировая болезнь печени	5.8±0.45*	4.9±0.36*	8.8±0.63*
3. Неалкогольная жировая болезнь печени +эмпаглифлозин	3.4±0.44**	2.2±0.32**	7.0±0.51
4. Неалкогольная жировая болезнь печени + L-орнитин	4.4±0.51	3.5.±0.41	8.6±0.65

*P<0.05 по отношению к интактной группе животных
**P<0.05 по отношению к интактной и контрольной группе животных

Данные биохимических исследований представлены в таблице. Анализ полученных результатов свидетельствует о повышение малонового альдегида печени в 1.5 раза у животных с НАЖБП по сравнению с интактными мышами, что свидетельствует о выраженном перекисном окислении липидов в группе животных со стеатозом печени. Действие эмпаглифлозина и L-орнитина достоверно не привело к нормализации этих показателей на фоне проведенного лечения. Однако, при лечении эмпаглифлозином отмечена положительная динамика к снижению малонового альдегида в 1.25 раза, в отличие от L-орнитина.

Показатели перекисного окисления белков печени увеличивались у животных с жировой болезнью печени по сравнению с интактными по нейтральным карбонильным группам в 2.6 раза и по основным в 4.9 раза. Влияние эмпаглифлозина приводило к уменьшению карбонильных групп в 1.7 раза, а основных в 2.2 раза по сравнению с контрольной группой животных. Действие L-орнитина не было таким выраженным и соответственно по группам анализа составило падание этих показателей в 1.3 и 1.4 раза.

Вследствие проведенных исследований, выявлено, что при стеатозе печени наряду с перекисным окислением липидов активируются процессы перекисного окисления белков, о чем свидетельствуют показатели резко активированных карбонильных групп у животных с НАЖБП.

Эмпаглифлозин оказывает положительное влияние при экспериментальных моделях стеатоза печени на свободнорадикальное окисление при постановке эксперимента, который заключается в гиперкалорийной диете и гиподинамии. Эмпаглифлозин также оказывает положительное влияние на показатели перекисного окисления белков и липидов при экспериментальной модели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мехтиев СН, Мехтиева ОА. Современный взгляд на перспективы терапии неалкогольной болезни печени. Эффективная фармакотерапия. 2011;2:50–58.
2. Castro RE, Diehl AM. Towards a definite mouse model of NAFLD. Journal of Hepatology. 2018;69:272–274.
3. Стальная ИД, Гаришвили ТГ. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М.: Издательство Медицина; 1977: 66–68.
4. Дубинина ЕЕ, Шугалей ИВ. Окислительная модификация белков. Успехи современной биологии. 1993;113(1):71–81.

SUMMURY

EFFECTS OF EMPAGLIFLOZIN AND ORNITHINE ON LIVER PROTEIN AND LIPID PEROXIDATION IN EXPERIMENTAL NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

Guseva A.O., 5th year student
St.Petersburg State Chemical and Pharmtaceutical University;
14, Prof. Popov St., St.Petersburg, 197376, Russian Federation

Some indicators of mice liver protein and lipid peroxidation in norm and at nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) were studied. The NAFLD model was reproduced with a combination of a hypercaloric diet and the injection of carbon tetrachloride. The effect of the sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitor (SGLT2) empagliflozin and L-ornithine on the peroxidation of proteins and lipids in experimental NAFLD was studied. There was a significant decrease in free radical oxidation of liver proteins under the influence of empagliflozin in the group of animals with NAFLD.

Key words: *empagliflozin, L-ornithine, nonalcoholic fatty liver disease, free radical oxidation, malondialdehyde, aldo- and ketohydrazones.*

REFERENCES

1. Mekhtiev SN, Mekhtieva OA. Sovremennyj vzglyad na perspektivy terapii nealkogol'noj bolezni pecheni. Effektivnaya farmakoterapiya. 2011;2:50–58. (In Russ)

2. Castro RE, Diehl AM. Towards a definite mouse model of NAFLD. Journal of Hepatology. 2018;69:272–274.
3. Stal'naya ID, Garishvili TG. Metod opredeleniya malonovogo dial'degida s pomoshch'yu tiobarbiturovoj kisloty. Sovremennye metody v biohimii. Moscow: Izdatel'stvo Medicina;1977:66–68. (In Russ)
4. Dubinina EE, SHugalej IV. Okislitel'naya modifikaciya belkov. Uspekhi sovremennoj biologii. 1993;113(1):71–81. (In Russ)

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЖЕНЬШЕНЯ, ДИОСКОРЕИ И ЯКОРЦЕВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АЛИМЕНТАРНОГО ОЖИРЕНИЯ

Демакова Н.В., студ. 5 курса, **Краснова М.В.**, аспирант 3 года обучения
Руководитель: **Ивкин Д.Ю.**, к.б.н., начальник центра экспериментальной фармакологии
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: demakova.natalya@pharminnotech.com

Проведено экспериментальное моделирование алиментарного ожирения у лабораторных животных с последующим введением водных экстрактов культур клеток растительного сырья диоскореи дельтовидной, якорцев стелющихся, женьшеня японского и сравнительной оценкой прироста массы тела, а также определенных с помощью биоимпедансометрической спектроскопии таких показателей, как: общее содержание воды в организме, объем внутри- и межклеточной жидкости, масса тела без жира, масса жира, индекс массы тела.

Ключевые слова: *алиментарное ожирение, биоимпедансометрическая спектроскопия, диоскорея дельтовидная, якорцы стелющиеся, женьшень японский.*

Ожирение – патологическое состояние хронического характера, характеризующееся избыточными жировыми отложениями в подкожной клетчатке, органах и тканях и прогрессирующее при естественном течении. Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения в 2016 году более 1,9 миллиарда взрослых старше 18 лет имели избыточный вес, из них свыше 650 миллионов страдали ожирением. В России, по данным на конец 2016 г., зарегистрировано 23,5 млн. лиц с ожирением. [1] Именно поэтому данная патология и ассоциированные с ней метаболические нарушения, являются актуальной проблемой медицины, на сегодняшний день. Как известно, фуростаноловые гликозиды, содержащиеся в растениях диоскореи дельтовидной и якорцах стелющихся, а также тритерпеновые гликозиды женьшеня японского способны влиять на обмен липидов, углеводов, проявляя гипохолистеринемическое и гипогликемическое действие. Поэтому, представляет интерес изучение и оценка эффективности фитопрепаратов диоскореи, якорцев и женьшеня на модели алиментарного ожирения у лабораторных животных.

Цель работы: Оценка эффективности фитопрепаратов на основе женьшеня, диоскореи и якорцев на экспериментальной модели алиментарного ожирения у крыс породы *Brown Norway rat.*

Задачами настоящей работы стали:
1. моделирование алиментарного ожирения
2. введение водных экстрактов культур клеток растительного сырья животным
3. проведение биоимпедансометрической спектроскопии (БИС) у животных и оценка массы тела животных.

Для моделирования алиментарного ожирения была использована гиперкалорийная высокожировая диета с избытком легкоусвояемых углеводов, которая воссоздавалась путем добавления к стандартному корму (63%) топленого свиного жира (19%), сахарозы (10%) и изолированного соевого белка (8%) [2]. Такая диета способствует развитию у животных стеатоза печени, дисгликемии, дислипидемии, инсулинорезистентности и ожирения. В качестве тест-системы были использованы крысы-самцы линии Brown Norway начальной массой 217,14 ± 5,76 г. Животные были рандомизированы на 5 групп:
1) контрольная группа, получавшая гиперкалорийную диету
2) группа, получавшая стандартный корм (интакт)
3) группа, получавшая гиперкалорийный корм и лечение суспензией культуры клеток диоскореи
4) группа, получавшая гиперкалорийный корм и лечение суспензией культуры клеток женьшеня
5) группа, получавшая гиперкалорийный корм и лечение суспензией культуры клеток якорцев

До начала введения введения водных экстрактов культур клеток растительного сырья животным и спустя 4 месяца было проанализировано изменение массы тела животных, а также проведен сравнительный анализ данных БИС с определением общего содержания воды в организме (TBW, %), объема внутри- и межклеточной жидкости (ECF, %; ICF, %), массы тела без жира (FFM, %), массы жира (FM, %) и индекса массы тела (BMI) с помощью спектроскопического импедансометра (ImpediVet BIS1, США). Прибор имеет 4 электрода, оснащенных иглами для введения в области носа, между ушей, в основание хвоста и копчиковой зоны. Выполнялись три последовательных измерения с интервалом в 3 секунды при заданных параметрах: пропорция тела (отношение длины к обхвату) 1,0; плотность тела 1,05 г/см^3; константа гидратации 0,732; коэффициенты сопротивления ϱ i = 325; ϱ e = 752.

Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью пакета программы «GraphPad Prism 8» с использованием непараметрического статистического критерия Манна–Уитни.

Полученные результаты представлены графически на рисунках 1, 2, 3.

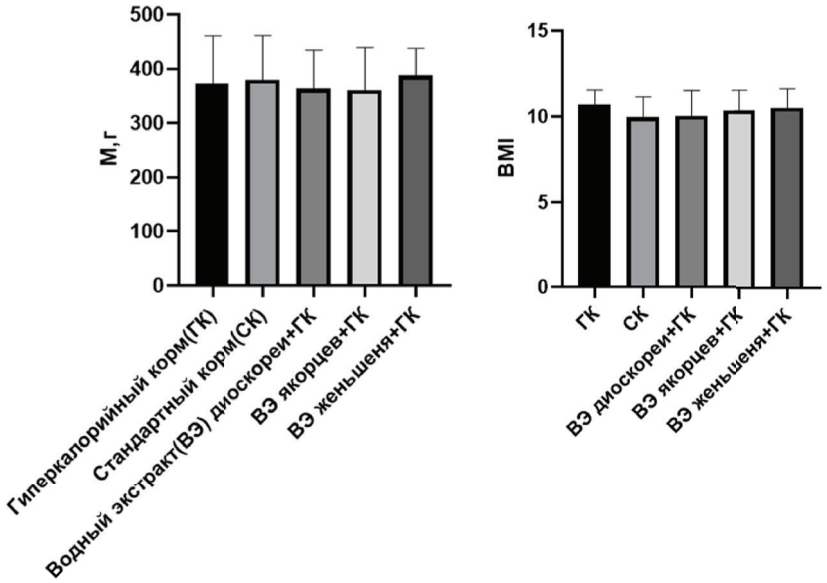


Рисунок 1. Масса животных различных групп (слева) и ИМТ животных (справа)

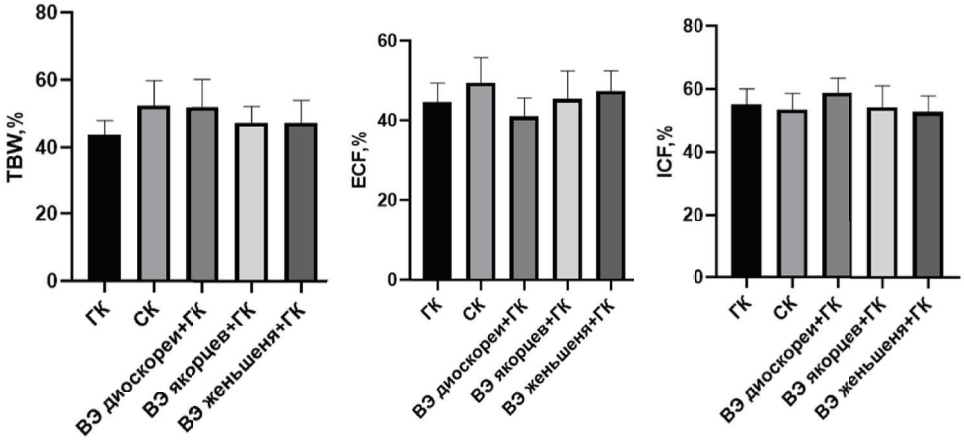


Рисунок 2. Процентное содержание общего количества воды (слева), внеклеточной жидкости (по центру) и внутриклеточной жидкости (справа) в организме животных

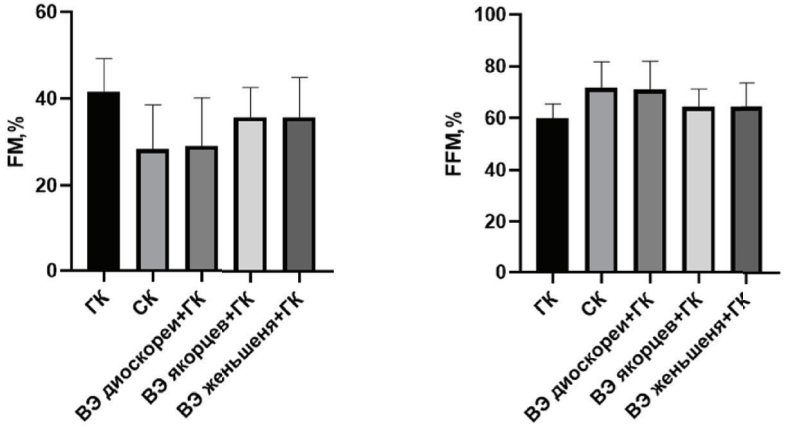


Рисунок 3. Процентное содержание массы жира (слева) и безжировой массы тела (справа)

Наибольшая эффективность на экспериментальной модели алиментарного нарушения была установлена у водного экстракта диоскореи дельтовидной. Показатели FM, % и BMI 29,07%±11,04% и 10,06±1,37 были наименьшими среди остальных экспериментальных групп в сравнении с контролем 41,54%±7,73% и 10,72±0,83 соответственно. Масса животных в группах, получавших водные экстракты диоскореи и якорцев, была на 4,45% и 5,03% меньше относительно контрольной группы. При этом, масса тела животных из группы, получавших водный экстракт женьшеня, была на 2,07% больше массы тела животных группы контроля. Из трех водных экстрактов экстракт женьшеня японского оказался наименее эффективным на экспериментальной модели алиментарного ожирения

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов ИИ, Мельниченко ГА, Шестакова МВ, Трошина ЕА. и др. Лечение морбидного ожирения у взрослых. Ожирение и метаболизм. 2018;15(1):53-70.

2. Xu X, Lu L, Dong Q, et al. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease andperiodontal disease and atherosclerosis. Lipids Health Dis. 2015 Dec. 3;14:158.

SUMMARY

EFFICACY OF GINSENG, DIOSCOREA AND ANCHORS PHYTOPREPARATIONS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ALIMENTARY OBESITY

Demakova N.V.[1], 5th year student, **Krasnova M.V.**[1], 3rd year postgraduate student
[1]St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popova St., 197376, St. Petersburg, Russian Federation

Experimental modeling of alimentary obesity in laboratory animals was carried out, followed by the introduction of aqueous extracts of cell cultures of plant raw materials of Dioscorea deltoidea, Tribulus terrestris, Panax ginseng and a comparative assessment of body weight gain, as well as indicators determined using bioimpedance spectroscopy, such as: total body water, volume of intra- and extracellular fluid, fat mass, fat free mass, body mass index.

Key words: *alimentary obesity, bioimpedance spectroscopy, Dioscorea deltoidea, Tribulus terrestris, Panax ginseng.*

REFERENCES

1. Dedov II, Mel'nichenko GA, Shestakova MV, Troshina EA et al. Russian national clinical recommendations for morbid obesity treatment in adults. 3rd revision. Morbid obesity treatment in adults. Obesity and metabolism. 2018;15(1):53-70. (In Russ.)

2. Xu X, Lu L, Dong Q et al. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease andperiodontal disease and atherosclerosis. Lipids Health Dis. 2015 Dec. 3;14:158.

ВЛИЯНИЕ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ДИНИТРАТА 2-ФЕНИЛ-9-ДИЭТИЛАМИНОЭТИЛИМИДАЗО[1.2]БЕНЗИМИДАЗОЛА НА ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ КРОЛИКОВ В УСЛОВИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ

Доманина А.М., асп. 1 года обучения
Руководитель: **Черников М.В.**, докт. мед. наук, доц.
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России,
357532 , г. Пятигорск, пр. Калинина д. 11, Российская Федерация
E-mail: lina.kirilyuk.00@mail.ru

Одним из важнейших показателей состояния организма является клинический анализ крови, который позволяет дать оценку состоянию организма. По картине периферической крови можно диагностировать различные патологические процессы в организме даже на начальной стадии. Также важнейшим параметром в системе кроветворения является гемостаз. Исследование проводили в условии хронической токсичности 180 дней на трех уровнях концентрации. Гематологические показатели определяли импедансометрическим, цианметгемоглобиновым методами. Гемостаз изучался на автоматическом анализаторе гемостаза. Фиксировали протромбиновое и тромбиновое время, фибриноген, АЧТВ. Анализ состава периферической крови и гемостаза показал, что все зафиксированные значения не выходят за границы физиологической нормы и не носят дозозависимого характера.

Ключевые слова: *гемостаз, гематология, импедансометрический метод, цианметгемоглобиновый метод, протромбиновое и тромбиновое время, АЧТВ, хроническая токсичность.*

Клинический анализ крови является одним из важнейших показателей, позволяющих оценить состояние организма. По картине периферической крови и гемостаза можно диагностировать воспалительные и инфекционные процессы, оценку которых ведут по изменению содержания лейкоцитов, лейкоцитарной формуле, СОЭ, идентифицировать онкологические процессы, функциональную активность костного мозга в условиях лучевой и химиотерапии опухолевых

заболеваний, и т.д. Поэтому, доклинических исследований ГЛФ новосинтезированной субстанции на основе динитрата 2-фенил-9- диэтиламиноэтилимидазо[1,2-А]бензимидазола [1] данные показатели необходимо определять для выявления патологических процессов на их начальном этапе. Проводимые исследования актуальны, так как они позволяют выявить побочное действие, ранее не изученную ГЛФ на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2- А] бензимидазола.

Цель. Определить влияние таблетированной лекарственной формы на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-А]бензимидазола на показатели периферической крови и гемостаза кроликов в условии хронической токсичности.

Объектом является готовая таблетированная лекарственная форма (ГЛФ) на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-А]бензимидазола. Исследование проводили на кроликах породы Советская Шиншилла обоего пола массой 2000-2500 г (возраст 10-12 недель). Все тест системы были выбраны в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [2]. С целью дальнейшего детального исследования показателей периферической крови и гемостаза в условиях хронической токсичности ГЛФ животные были распределены на группы по критерию массы тела, всего 8 групп, 1 и 2 группы являлись контрольными группами. Группы 1,3,5,7 кролики- самки, группы 2,4,6,8 кролики-самцы. Контрольная группа 1 кроликов-самок, контрольная группа 2 кроликов-самцов, поэтому данным группам не вводили исследуемую ГЛФ, следовательно, не находились в условиях хронической токсичность. Также оценку отклонений от нормы показателей периферической крови и гемостаза вели по контроьным группам 1 и 2. В каждой группе находилось по 4 особи, для большей выборке и снижения статистических ошибок в заключении анализа [3][4]. В соответствии с методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических средств, хроническая токсичность ГЛФ при ее системном применении исследовали в 3 дозах: 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг, рассчитанные с использованием межвидовых коэффициентов пересчета. На протяжении 180 дней ежедневно животным внутрежелудочно атравматическим зондом вводили 100 мл исследуемой суспензии таблеток, кроме группы 1 и 2. Сбор проб крови проводился на 91-й (группы 1-8), 181-й (группы 1-8) день эксперимента. У кроликов осуществлялся забор крови для анализа гематологический показателей и гемостаза. Кровь забиралась у животных из подъязычной вены.

Гематологические показатели (количество эритроцитов, цветовой показатель, уровень гемоглобина, количество тромбоцитов, количество лейкоцитов) определяли с использованием системы ветеринарного автоматического гематологического анализа BC 2800vet (Mindray), работа которого построена на использовании импедансометрического метода. Гемоглобин определяется в лизированном разведении 1:196 цианметгемоглобиновым методом. Гемостаз – состояние свертывающей системы изучался на автоматическом анализаторе гемостаза (коагулометр) ACL Elite Pro. Фиксировали протромбиновое и тромбиновое время, фибриноген, АЧТВ.

Полученные данные гематологических исследований периферической крови представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1 – Гематологические показатели при введении ГЛФ на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-А]бензимидазола в течение 90 дней

Показатели	Исследуемые группы кроликов, дозы							
	группа 1	группа 2	группа 3 5 мг/кг	группа 4 5 мг/кг	группа 5 25 мг/кг	группа 6 25мг/кг	группа 7 50 мг/кг	группа 8 50 мг/кг
Лейкоциты (109/л)	11,70 ± 1,00	9,60 ± 1,15	10,05 ± 0,56	11,60 ± 0,26	11,63 ± 1,83	10,43 ± 0,59	6,73 ±0,40*	13,25 ± 1,75
Лимфоциты %	47,48 ± 4,39	53,73 ± 7,84	62,7 ± 1,27*	60,60 ± 1,88	56,07 ± 3,22	54,38 ± 5,24	56,00 ± 0,81	54,35 ± 8,15
Моноциты %	5,93 ± 1,70	4,45 ± 1,73	2,25 ± 0,17	2,35 ± 0,05	2,33 ± 0,24	2,55 ± 0,32	3,10 ± 0,35	2,20 ± 0,10
Гранулоциты %	46,60 ± 3,03	41,38 ± 6,26	35,00 ± 1,27*	37,05 ± 1,83	41,60 ± 3,46	43,08 ± 5,33	40,90 ± 0,84	43,45 ± 8,25
Эритроциты (1012/л)	5,34 ± 0,18	5,51 ± 0,13	6,28 ± 0,08*	6,03 ± 0,19	5,57 ± 0,19	5,83 ± 0,22	5,38 ± 0,10	5,80 ± 0,07
Гемоглобин (г/л)	102,5 ± 4,97	107,00 ± 1,00	115,25 ± 1,55	110,00 ± 2,92	103,67 ± 4,41	105,75 ± 2,56	99,75 ± 4,27	106,00 ± 6,00
Гематокрит %	34,75 ± 1,73	36,10 ± 0,24	38,90 ± 0,38	38,10 ± 0,96	36,03 ± 1,54	37,95 ± 0,59	35,63 ± 1,48	38,35 ± 2,15
MCV (фл)	65,15± 1,00	65,70 ± 1,04	62,18 ± 0,23	63,33 ± 0,90	64,80 ± 0,53	65,45 ± 1,62	66,20 ± 1,62	66,05 ± 3,05
MCH (пг)	19,15 ± 0,27	19,40 ± 0,38	18,30 ± 0,16*	18,23 ± 0,27	18,57 ± 0,32	18,13 ± 0,30	18,48 ± 0,48	18,15 ± 0,85
Тромбоциты (109/л)	603,2 ± 79,91	468,50 ± 32,54	484,7 ± 55,04	491,50 ± 50,11	446,33 ± 37,36	509,25 ± 89,57	512,50 ± 122,75	657,00 ± 67,00*

Примечание: * – достоверность относительно контроля P<0,05

Группы 1,3,5,7 – кролики-самки; группы 2,4,6,8 – кролики самцы.

Таблица 2 – Гематологические показатели при введении ГЛФ на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-А]бензимидазола в течение 180 дней

Показатели	Исследуемые группы кроликов, дозы							
	группа 1	группа 2	группа 3 5 мг/кг	группа 4 5 мг/кг	группа 5 25 мг/кг	группа 6 25 мг/кг	группа 7 50 мг/кг	группа 8 50 мг/кг
Лейкоциты (109/л)	9,48 ± 1,36	10,13 ± 0,62	12,23 ± 1,17	9,65 ± 0,39	11,00 ± 0,51	11,65 ± 0,91	8,73 ± 1,04	10,53 ± 0,80
Лимфоциты %	61,25 ± 2,79	49,68 ± 2,79	55,80 ± 4,75	58,20 ± 5,31	53,57 ± 1,89	58,78 ± 2,72	45,23 ± 1,95*	63,03 ± 2,98*
Моноциты %	2,80 ± 0,16	3,58 ± 0,41	1,90 ± 0,15*	2,25 ± 0,33*	2,23 ± 0,23	2,05 ± 0,18*	3,15 ± 0,13	2,40 ± 0,20*
Гранулоциты %	35,95 ± 2,94	46,75 ± 3,04	42,30 ± 4,90	39,55 ± 5,09	44,20 ± 1,66	39,18 ± 2,87	51,63 ± 2,07*	34,58 ± 3,00*
Эритроциты (1012/л)	4,96 ± 0,52	5,52 ± 0,11	5,81 ± 0,05	5,78 ± 0,04	5,23 ± 0,03	5,60 ± 0,10	5,32 ± 0,14	5,39 ± 0,20
Гемоглобин (г/л)	92,50 ± 10,27	99,75 ± 1,44	103,33 ± 2,03	105,50 ± 1,85	93,67 ± 1,20	97,75 ± 0,75	94,75 ± 0,85	97,75 ± 0,85
Гематокрит %	32,35 ± 3,35	35,08 ± 0,52	37,07 ± 0,30	37,73 ± 0,77	33,20 ± 0,38	35,25 ± 0,37	34,55 ± 0,53	35,08 ± 0,40
MCV (фл)	65,43 ± 0,99	63,73 ± 1,06	63,87 ± 0,22	65,35 ± 1,08	63,57 ± 0,93	63,15 ± 1,58	65,05 ± 0,83	65,45 ± 2,92
MCH (пг)	18,60 ± 0,25	18,05 ± 0,28	17,73 ± 0,27	18,23 ± 0,25	17,83 ± 0,23	17,43 ± 0,39	17,78 ± 0,36	18,18 ± 0,74
Тромбоциты (109/л)	349,0 ± 31,74	434,50 ± 63,97	538,00 ± 139,94	323,25 ± 20,45	342,67 ± 33,23	328,50 ± 50,91	390,00 ± 72,46	443,43 ± 36,80

Примечание: * – достоверность относительно контроля P<0,05
Группы 1,3,5,7 – кролики-самки; группы 2,4,6,8 – кролики самцы.

Исследование состава периферической крови показало, что в опытных группах, получавших ГЛФ на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-А]бензимидазола в дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг зафиксированы периодические колебания лейкоцитарной формулы в сторону снижения или увеличения уровня лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. Следует, однако, отметить, все зафиксированные значения не выходят за границы физиологической нормы, не прослеживаются закономерности в изменении различных звеньев гемопоэза на разных этапах исследования, что может свидетельствовать о вариабельности данных, не связанных с гематотоксическими эффектами изучаемой ГЛФ на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-А]бензимидазола.

Влияние ГЛФ на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2- А]бензимидазола на свертывание крови. Полученные данные исследований представлены в таблицах 3,4.

Таблица 3 – Влияние ГЛФ на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-А]бензимидазола на показатели процесса свертывания крови при введении в течение 90 дней

Показате ли	Исследуемые группы кроликов, дозы							
	группа 1	группа 2	группа 3 5 мг/кг	группа 4 5 мг/кг	группа 5 25 мг/кг	группа 6 25 мг/кг	группа 7 50 мг/кг	группа 8 50 мг/кг
Протромбиновое время (сек)	10,03 ± 0,155	9,825 ± 0,144	10,500 ± 0,271	10,575 ± 0,287*	10,175 ± 0,202	10,875 ± 0,287	10,175 ± 0,048	10,275 ± 0,144
Тромбиновое время (сек)	17,950 ± 0,805	20,225 ± 0,439	18,875 ± 0,497	19,475 ± 1,436	17,675 ± 0,482	18,675 ± 0,484	17,975 ± 0,165	19,975 ± 1,287
АЧТВ (сек)	23,750 ± 0,809	24,275 ± 0,471	26,425 ± 1,379	22,925 ± 0,810	22,875 ± 0,820	19,475 ± 0,950*	27,750 ± 1,424	24,400 ± 1,636
Фибриноген (г/л)	3,017 ± 0,224	2,880 ± 0,371	2,815 ± 0,091	3,562 ± 0,151	3,181 ± 0,250	3,341 ± 0,419	2,759 ± 0,059	3,621 ± 0,386

Примечание: * – достоверность относительно контроля P<0,05
Группы 1,3,5,7 – кролики-самки; группы 2,4,6,8 – кролики самцы.

Таблица 4 – Влияние ГЛФ на основе динитрат 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2- А]бензимидазола на показатели процесса свертывания крови при введении в течение 180 дней

Показатели	Исследуемые группы кроликов, дозы							
	группа 1	группа 2	группа 3 5 мг/кг	группа 4 5 мг/кг	группа 5 25 мг/кг	группа 6 25 мг/кг	группа 7 50 мг/кг	группа 8 50 мг/кг
Протромбиновое время (сек)	11,250 ± 0,352	10,425 ± 0,347	10,875 ± 0,165	11,925 ± 0,417*	10,775 ± 0,103	11,350 ± 0,393	11,150 ± 0,393	11,400 ± 0,147
Тромбиновое время (сек)	16,950 ± 0,659	19,000 ± 1,123	18,150 ± 0,805	19,800 ± 1,168	16,150 ± 0,718	17,200 ± 0,859	16,975 ± 0,665	24,025 ± 2,421
АЧТВ (сек)	25,900 ± 2,309	24,750 ± 1,563	25,600 ± 1,353	24,650 ± 0,603	28,000 ± 1,182	20,925 ± 0,250	25,100 ± 0,846	23,425 ± 0,740
Фибриноген (г/л)	2,312 ± 0,111	2,417 ± 0,302	2,442 ± 0,139	3,005 ± 0,246	3,069 ± 0,281*	3,024 ± 0,120	2,452 ± 0,306	2,275 ± 0,056

Примечание: * – достоверность относительно контроля P<0,05
Группы 1,3,5,7 – кролики-самки; группы 2,4,6,8 – кролики самцы.

Анализ параметров свертывания крови при введении ГЛФ на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-А]бензимидазола в дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг в течение 90 и 180 дней, не выявил изменений продолжительности протромбинового, тромбинового времени, АЧТВ и содержания фибриногена, которые можно было бы трактовать, как результат токсического влияния исследуемого препарата.

Анализ состава периферической крови показал, что все зафиксированные значения не выходят за границы физиологической нормы, не прослеживаются закономерности в изменении различных звеньев гемопоэза на разных этапах исследования, что может свидетельствовать о вариабельности данных, не связанных с гематотоксическими эффектами изучаемой ГЛФ на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2- А]бензимидазола. Также изменение показателей гемостаза не носят системного, дозозависимого характера, а их значения находятся в диапазоне вариабельности физиологической нормы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Спасов АА, Петров ВИ, Анисимова ВА, Минкин ВИ, Черников МВ. Лекарственная субстанция для подавления геликобактероподобных эрозивно-язвенных повреждений слизистой оболочки желудка. Патент RU 2395282. 2010.
2. Миронов АН. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012:12-13.
3. Доманина АМ, Ремезова ИП, Черников МВ. Влияние таблетированной лекарственной формы на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2- А]бензимидазола на выживаемость и общее клиническое состояние кроликов: материалы IX Международной научно-практической конференции «Беликовские чтения». Пятигорск, 2020.
4. Национальный стандарт ГОСТ Р 50258-92 «Содержания лабораторных животных».

SUMMARY

EFFECT OF A TABLET DOSAGE FORM BASED ON 2-PHENYL-9- DIETHYLAMINOETHYLIMIDAZO[1.2] BENZIMIDAZOLE DINITRATE ON PERIPHERAL BLOOD PARAMETERS AND BLOOD CLOTTING IN RABBITS IN THE CONDITION OF CHRONIC TOXICITY

Domanina A.M., asp. 1 year of study
Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-Branch of the State Educational Institution of Higher Professional Education of the Russian Ministry of Health,
11 Kalinina Ave., Pyatigorsk, 357532, Russian Federation

One of the most important indicators of the state of the body is a clinical blood test, which allows you to assess the state of the body. According to the picture of peripheral blood, you can diagnose various pathological processes in the body, even at the initial stage. Also, the most important parameter in the hematopoietic system is hemostasis. The study was conducted under the condition of chronic toxicity for 180 days at three levels of concentration. Hematological parameters were determined by impedance metric, cyanmethemoglobin methods. Hemostasis was studied on an automatic hemostasis analyzer. Prothrombin and thrombin time, fibrinogen, and APTT were recorded. Analysis of the composition of peripheral blood and hemostasis showed that all the recorded values do not exceed the limits of the physiological norm and are not dose- dependent.

Key words: *hemostasis, hematology, impedance method, cyanomethemoglobin method, prothrombin and thrombin time, APTT, chronic toxicity.*

REFERENCES

1. Spasov AA, Petrov VI, Anisimova VA, Minkin VI, Chernikov MV. Medicinal substance for suppressing Helicobacter-like erosive and ulcerative lesions of the gastric mucosa Patent of Russia № 2395282. (In Russ)
2. Mironov AN. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. 2012:12-13. (In Russ)
3. Domanina AM, Remezova IP, Chernikov MV. The effect of a tablet dosage form based on 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-A]benzimidazole dinitrate on the survival and general clinical condition of rabbits: proceedings of the IX International Scientific and Practical Conference «Belikov Readings». Pyatigorsk, 2020. (In Russ)
4. National standard GOST R 50258-92 «Maintenance of laboratory animals». (In Russ)

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО АЛЛИЛМОРФОЛИНА НА КИШЕЧНУЮ ПЕРИСТАЛЬТИКУ У МЫШЕЙ

Кан А.В., студ. 5 курса, **Приходько В.А.**, асп. 2 года обучения
Руководитель: **Сысоев Ю.И.**, канд. биол. наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: kan.aleksandra@pharminnotech.com

Проведена оценка влияния нового производного аллилморфолина (*E*)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорида на кишечную перистальтику у мышей. Установлено, что исследуемое соединение в дозах 1 и 10 мг/кг угнетает перистальтику и замедляет транзит кишечного содержимого.

Ключевые слова: *производные аллилморфолина, кишечная перистальтика, нейропротекторные средства.*

Для ряда хромонсодержащих производных аллилморфолина (ПАМ) установлено *in vitro* наличие блокирующей активности в отношении ферментов ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы, а также рецепторов N-метил-D-аспартата [1]. Благодаря этому ПАМ представляют интерес в качестве потенциальных нейропротекторных средств, однако, их фармакологические эффекты *in vivo* в настоящее время мало изучены. Одной из характерных особенностей средств, влияющих на работу холинергической системы, является их способность влиять на кишечную перистальтику. В данном эксперименте мы хотели оценить косвенно влияние на холинергическую систему, используя далее описанный тест. В связи с этим, **целью** настоящей работы была оценка влияния нового ПАМ (*E*)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорида на кишечную перистальтику у мышей.

Эксперимент выполнен на 40 взрослых белых беспородных мышах-самках массой 20-25 г, рандомизированных на 4 группы по 10 особей. За 18 часов до эксперимента животные были оставлены без корма со свободным доступом к воде. Мышам вводили внутрибрюшинно исследуемое ПАМ в виде свежеприготовленного раствора в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг для трех опытных групп соответственно. Через 15 мин всем животным вводили внутрижелудочно маркер, представлявший собой 0.25 мл 4% суспензии активированного угля в 2% растворе крахмала. Через 40 мин мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации и извлекали тонкую кишку от пилорического до илеоцекального сфинктера [2]. Измеряли расстояние, пройденное маркером, и всю длину тонкой кишки, после чего рассчитывали индекс перистальтики (%) как отношение этих двух величин.

Исследуемое соединение в дозах 1 и 10 мг/кг угнетало перистальтику кишечника и замедляло продвижение маркера по желудочно-кишечному тракту. У животных данных экспериментальных групп было отмечено достоверное ($p<0.05$) снижение индекса перистальтики в среднем на 24% и 22% соответственно. Доза 0.1 мг/кг оказывала менее выраженный эффект (см. рисунок). Стоит отметить, что угнетение перистальтики кишечника не является характерным свойством ингибиторов ацетилхолинэстеразы, однако характерно для М-холиноблокаторов.

Производное аллилморфолина (*E*)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил] морфолин-4-ия хлорид в дозах 1 и 10 мг/кг угнетает перистальтику и замедляет транзит кишечного содержимого у мышей. Полученные данные могут говорить о том, что новое ПАМ является антагонистом М-холинорецепторов, однако необходимы дальнейшие исследования для подтверждения данного предположения, так как угнетение перистальтики кишечника – это только косвенный признак.

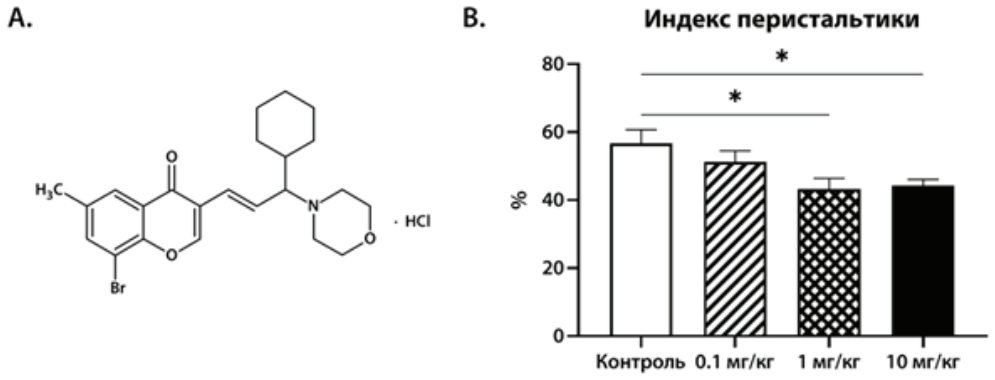


Рисунок. А – структурная формула исследуемого соединения;
В – влияние исследуемого соединения на индекс перистальтики

ЛИТЕРАТУРА

1. Chernov NM, Shutov RV, Barygin OI, et al. Synthesis of chromone-containing allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-type reaction. Eur. J. Org. Chem. 2018;2018(45):6304–6313. DOI: 10.1002/ejoc.201801159.

2. Козаева ЛП. Роль α2-адренорецепторов и имидазолиновых II-рецепторов в периферических эффектах моксонидина и агматина. Автореф. дис. канд. мед. наук. Москва; 2004: 9.

SUMMARY

EFFECTS OF A NEW ALLYLMORPHOLINE DERIVATIVE ON GASTROINTESTINAL MOTILITY IN MICE

Kan A.V., 5th year student, **Prikhodko V.A.**, 2nd year graduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A new chromone-containing allylmorpholine derivative, (*E*)-4-[3-(8-bromo-6-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)-1-cyclohexylallyl]morpholin-4-ium chloride, inhibits gastrointestinal motility in mice and slows down intestinal transit at 1 and 10 mg·kg^{-1} b.w.

Key words: *allylmorpholines, gastrointestinal motility, neuroprotective agents.*

REFERENCES

1. Chernov NM, Shutov RV, Barygin OI, et al. Synthesis of chromone-containing allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-type reaction. Eur. J. Org. Chem., 2018; 2018(45):6304–6313. DOI: 10.1002/ejoc.201801159.

2. Kozaeva LP. Rol' α2-adrenoretseptorov i imidazolinovykh II-retseptorov v perifericheskikh ehffektakh moksonidina i agmatina. Abstract of Ph.D. thesis. Moscow; 2004: 9 (in Russian).

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОНАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

Копаница М.А., ассистент
Руководители: **Черных И.В.**, канд. биол. наук, зав. каф., **Ершов А.Ю.**, докт. хим. наук, научн. сотрудник.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Рязанский государственный университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9, Российская Федерация
E-mail: kopanitsa412@yandex.ru

Разработан метод синтеза гликилированных наночастиц на основе коллоидного золота. Изучена цитотоксичность полученных гликонаночастиц по отношению к культуре опухолевых и нормальных клеток. Исследование проводилось на клеточной линии Caco-2. Для изучения противоопухолевой активности выбраны наночастицы золота, поверхность которых модифицирована гликолигандами, обладающими тропностью по отношению к лектинам опухолевых клеток. Цитотоксичность полученных гликонаночастиц золота оценивали с помощью МТТ-теста. Полученные результаты говорят о перспективности использования гликонаночастиц золота в качестве химиотерапевтических агентов.

Ключевые слова: *коллоидное золото, гликонаночастицы золота, клеточная линия Caco-2.*

В настоящее время, онкологические заболевания являются второй по частоте причиной смертности в мире после сердечно-сосудистых патологий и составляют более 15% в общей структуре летальности. На нанотехнологии в химио-

терапии обращают все большее внимание. Активно изучается применение наночастиц золота в качестве материалов для диагностики и лечения онкологических заболеваний, благодаря наличию у них специфических физических свойств, а также собственной противоопухолевой активности. Золотые наночастицы используются в качестве носителей для таргетной доставки лекарственных препаратов [1]. Развитая поверхность наночастиц позволяет проводить ее модификацию, что придает им новые полезные свойства, прежде всего, тропность к опухолевым клеткам, и делает потенциально избирательными и эффективными химиотерапевтическими агентами [2].

Цель исследования: синтез гликонаночастиц золота и оценка их цитотоксичности по отношению к нормальным и опухолевым клеткам.

Синтез золотых наночастиц с поверхностью, модифицированной углеводными остатками (гликонаночастиц) заключался в изолированном получении гликолигандов и коллоидного золота. Коллоидное золото было получено путем восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия, который является одновременно восстановителем и стабилизатором. Диаметр полученных частиц подтверждался с помощью метода динамического светорассеяния. Гликолиганды синтезировали из этилового эфира тиогликолевой кислоты и 3-меркаптопропионовой кислоты с дальнейшим получением гидразонов и добавлением эквивалентного количества сахара. Восстанавливающие сахара добвляли при кипячении в метаноле, в результате чего образовывались конечные гликолиганды. Для стабилизации гликолигандов их растворяли в лаурилсульфате. Далее смешивали полученные гликолиганды с коллоидным золотом [3]. Вхождение сахаров подтверждали с помощью ЯМР-спектроскопии.

В качестве испытуемых веществ использовались золотые гликонаночастицы, содержащие остатки рамнозы, фукозы, N-ацетилманнозы, лактозы, галактозы. Выбор моносахаридов связан с особенностями строения опухолевых лектинов, обладающих тропностью именно к данным молекулам. Исследование цитотоксичности проводилось с помощью МТТ-теста, основанного на способности клеточных ферментов восстанавливать нитротетразолевый синий до формазана, по концентрации которого оценивают дыхательную активность. Для исследования использовали клетки линии Caco-2 (аденокарцинома ободочной кишки человека), которые культивировали при 37ºС и 5% содержании CO_2 в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с содержанием глюкозы 4,5 г/л, L-глутамина (4 ммоль/л), 15% бычьей сыворотки и по 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина соответственно [4].

Клетки линии Caco-2 культивировали в 96-луночном планшете до момента образования монослоя (культура опухолевых клеток) и в течение 21 суток после формирования монослоя (при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в физиологически поляризованный монослой, подобный эпителию тонкого кишечника). После получения данных о концентрациях гликонаночастиц, оказывающих цитостатическое действие на опухолевые клетки аналогичные концентрации исследовали на нормальных клетках.

Перед проведением МТТ-теста клетки инкубировали с растворами гликонаночастиц в течение 2 ч. В каждой серии исследований было выполнено по 5 анализов. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5%-го изотонического раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 100 мкл диметилсульфоксида. Оптическую плотность растворов измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре с дифференциальным фильтром на 620 нм.

Полученные результаты обрабатывались в программе Statistica 13.0. Распределение данных анализировали, используя критерий Шапиро-Уилка. Сравнение метаболической активности клеток проводили с помощью критерия Даннета. Приемлемым уровнем значимости считали $p<0,05$.

В результате синтеза были получены монодисперсные сферические наночастицы золота, диспергированные в водном растворе, размером 10–20 нм.

МТТ-тест показал, что цитотоксичность по отношению к культуре клеток аденокарциномы ободочной кишки человека проявили растворы гликонаночастиц с рамнозой в концентрации 400 мкг/мл (82,5% живых клеток, по сравнению с контролем; $p = 0,044$), фукозой – в концентрациях 200 и 400 мкг/мл (70,7% и 82,2% живых клеток по сравнению с контролем; $p = 0,027$ и $p = 0,0002$ соответственно) и лактозой – в концентрации 400 мкг/мл (84,0% живых клеток по сравнению с контролем; уровень тенденции: $p = 0,076$). Для исследования цитотоксичности по отношению к энтероцитам тонкого кишечника были взяты концентрации растворов гликонаночастиц, которые задерживали рост клеток опухоли: 400 мкг/мл для раствора золотых гликонаночастиц с рамнозой и лактозой, 200 и 400 мкг/мл – для раствора золотых гликонаночастиц с фукозой.

Было обнаружено, что ни одна из указанных концентраций не снижала выживаемость энтероцитов. Напротив, интенсивность клеточного метаболизма клеток была достоверно выше, чем в контроле в 2,92 раза (частицы с рамнозой 400 мкг/мл) ($p = 0,00001$), в 2,10 раза (частицы с фукозой 400 мкг/мл) ($p = 0,00001$), в 1,39 раза (частицы с фукозой 200 мкг/мл) ($p = 0,0097$) и в 1,49 раза (частицы с лактозой 400 мкг/мл) ($p = 0,002$).

Таким образом, синтезированные гликонаночастицы золота, модифицированные рамнозой, фукозой и лактозой, обладают способностью подавлять метаболизм опухолевых клеток, при этом, повышая метаболическую активность клеток кишечного эпителия. Полученные данные говорят о перспективности использования золотых гликонаночастиц в качестве химиотерапевтических агентов и создает предпосылки для изучения механизмов, реализующих их противоопухолевую активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курапов ПБ, Бахтенко ЕЮ. Наночастицы золота для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Вестник РГМУ. 2018;6:86−92.
2. Dykman LA, Khlebtsov N. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: Recent Advances and Perspectives. ChemInform. 2012,43.
3. Мартыненков АА, Ершов АЮ, Лагода ИВ, Копаница МА, и др. Synthesis of Aldose 11-Mercaptoundecanoyl Hydrazones as Promising Glycoligands of Noble Metal Nanoparticles. Chemistry Select. 2019;4:С.1-5.
4. Sambuy Y, et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biology and Toxicology.2005;21(6):1-26.

SUMMARY

ANTITUMOR ACTIVITY OF GOLD GLYCONANOPARTICLES

Kopanitsa M.A., assistant
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ryazan State University named after Academician I. P. Pavlov" of the Ministry of Health of the Russian Federation,
9 Vysokovoltnaya str., Ryazan, 390026, Russian Federation

A method for the synthesis of glycylated nanoparticles based on colloidal gold has been developed. The cytotoxicity of the obtained glyconanoparticles in relation to the culture of tumor and normal cells was studied. To study the antitumor activity, gold nanoparticles were selected, the surface of which is modified by glycoligands that are tropic to the lectins of tumor cells. The cytotoxicity of the obtained gold glyconanoparticles was evaluated using the MTT test. The results obtained indicate the prospects of using gold glyconanoparticles as chemotherapeutic agents.

Key words: *colloidal gold, gold glyconanoparticles, cell line Caco-2.*

REFERENCES

1. Kurapov PB, Bakhtenko EYu. Gold nanoparticles for the diagnosis and therapy of oncological diseases. Bulletin of RSMU. 2018;6:86−92. (In Russ)
2. Dickman LA, Crispbread NN. Gold Nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. Cheminform. 2012,43.
3. Martynenko AA, Ershov AY, Lagoda IV, Kopanitsa MA, et al. Synthesis of aldose 11-Mercaptoundecanoylhydrazones as promising glycoligands of noble metal nanoparticles. Chemistry Select. 2019;4:1-5. (In Russ)
4. Sambuy Yu, et al. Cell line Caco-2 as a model of the intestinal barrier: the influence of cellular and cultural factors on the functional characteristics of Caco-2 cells. Cell biology and Toxicology. 2005;21(6):1-26.

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИЙ АНТИСЕПТИКОВ НА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Кравченко Р.В., аспирант 1 года обучения
Руководитель: **Ржеусский С.Э.**, канд. фарм. наук, доц.
Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет
210009, Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27, Республика Беларусь
E-mail: xolelo2014@gmail.com

Проанализирована минимальная ингибирующая концентрация ряда антисептиков (хлоргексидина биглюконата, фурацилин, мирасептин, димексид и раствор наночастиц серебра сферической формы со средним размером частиц 5 нм.) и их комбинированное антимикробное действие по отношению к грамотрицательным микроорганизмам (*Klebsiella pneumoiniae (ATCC 700603)* и *Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)*).

Ключевые слова: *антимикробная активность, антисептик, комбинированное действие.*

Послеоперационная фармакологическая помощь пациентам стоматологической хирургической практики зачастую подразумевает заживление ран. В процессе этого ранозаживления, важным аспектом является сохранение чистоты раны и не допущение возникновения инфекций в раневой поверхности.

В последние два десятилетия, исследователями во всем мире отмечается значительное изменение эпидемиологии нозокомиальных инфекций. Самые тяжелые угрожающие жизни инфекции вызываются группой резистентных микроорганизмов, которых Американское общество по инфекционным болезням (IDSA) обозначило как «ESKAPE»-патогены (от англ. escape – ускользать, спасаться), поскольку они эффективно «избегают» воздействия антибактериальных средств (АБС). К ним относятся, в том числе, *K.pneumonia* и *P.aeruginosa*. Полирезистентность инфекционных патогенов «ESKAPE» к АБС и, как следствие, неадекватная эмпирическая АБТ является причиной увеличения длительности госпитализации, высокой летальности, ведет к значимым экономическим потерям и снижению качества жизни. Кроме того, скорость

распространения резистентности между бактериями этой группы выше, в то время как резерв эффективных АБС значительно ограничен [1].

В связи с ростом числа антибиотикорезистентных штаммов поиск новых субстанций или их комбинаций, которые бы использовались с целью лечения заболеваний, вызванных микроорганизмами, является актуальным вопросом для современной медицины и фармации [2].

Объектами исследования являлся ряд антисептиков (хлоргексидина биглюконата, фурацилин, мирасептин, димексид, раствор наночастиц серебра сферической формы со средним размером частиц 5 нм.) и их комбинаций.

Определение антимикробной активности антисептиков и их комбинаций проводили методом двукратных разведений [3]. Комбинированное действие антисептиков на музейные штаммы *Klebsiella pneumoiniae (ATCC 700603)* и *Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)* изучали согласно методике «шахматной доски» [4]. В соответствии с методикой индекс фракционной подавляющей концентрации рассчитывается по формуле:

$$\Sigma ФПК = МПК_{АБ} / МПК_{А} + МПК_{БА} / МПК_{Б}, \text{ где}$$

$МПК_{А}$ – МПК антибиотика А;
$МПК_{Б}$ – МПК антибиотика Б;
$МПК_{АБ}$ – МПК антибиотика А в присутствии антибиотика Б;
$МПК_{БА}$ – МПК антибиотика Б в присутствии антибиотика А;
ФПК – фракционная подавляющая концентрация;
ΣФПК – индекс фракционной подавляющей концентрации).

Интерпретация результатов расчетов проводятся в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Интерпретация результатов определения чувствительности к комбинации из двух антибиотиков

	Интерпретация
≤0,5	Синергизм
>0,5 и ≤1,0	Аддитивный эффект
>1,0 и ≤4,0	Нейтральный эффект
>4,0	Антагонизм

Статистическую обработку данных проводили в программе MicrosoftExcel.

Была изучена МИК хоргексидина биглюконата, мирасептина, димексида и наночастиц серебра по отношению *Klebsiella pneumoiniae* и *Pseudomonas aeruginosa.* Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – МИК антисептиков по отношению к *Klebsiella pneumoiniae* и *Pseudomonas aeruginosa*

Исследуемое вещество	**МИК, мкг/мл**	
	Klebsiella pneumoiniae	*Pseudomonas aeruginosa*
Хлоргексидин биглюконат	62,5	12,5
Мирасептин	12,5	25,0
Димексид	125000,0	125000,0
Наночастицы серебра	62,5	2,5
Фурацилин	50,0	100,0

Показано, что наименьшей ингибирующей концентрацией по отношению к *Klebsiella pneumoiniae* среди исследуемых антисептиков обладает мирасептин. По отношению к *Pseudomonas aeruginosa* наименьшей ингибирующей концентрацией обладают наночастицы серебра. Худшей антимикробной активностью по отношению к двум изучаемым микроорганизмам обладает раствор димексида. Стоит отметить, что фурацилин действует на пределе растворимости в воде.

Далее было исследовано комбинированное действие антисептиков, представленное в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Комбинированное действие антисептиков (ФПК) по отношению к *Klebsiella pneumoiniae*

	Хлоргексидин биглюконат	**Мирасептин**	**Димексид**	**Наночастицы серебра**
Хлоргексидин биглюконат		1,75	2,50	0,60
Мирасептин			2,00	1,13
Димексид				2,00
Наночастицы серебра				

Таблица 4 – Комбинированное действие антисептиков (ФПК) по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*

	Хлоргексидин	Мирасептин	Димексид	Наночастицы серебра
Хлоргексидин биглюконат		1,50	1,17	0,88
Мирасептин			1,67	0,69
Димексид				1,50
Наночастицы серебра				

Показано, что изученные комбинации антисептиков обладают схожим совместным действием по отношению к изученным микроорганизмам. Димексид в комбинации с исследуемыми антисептиками не обладает ни аддитивным (ФПК 0,5 – 1,0), ни синергическим (ФПК <0,5) действием, но при этом и не снижает свое антимикробное действие (ФПК <4,0). Комбинации наночастиц серебра с хлоргексидином биглюконатом или мирасептином обладают аддитивным действием по отношению к *Pseudomonas aerugino.* Только комбинация наночастиц серебра и хлоргексидина биглюконата по отношению к *Klebsiella pneumoiniae* обладает аддитивным. Стоит отметить, что механизм их антимикробного действия схож и связан с воздействием на клеточную стенку бактерий. Наносеребро в комбинации с хлоргексидином биглюконатом по отношению к *Klebsiella pneumoiniae* усиливает свое действие в 4 раза, по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* – в 2 раза. Мирасептин в комбинации с наносеребром по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* усиливает свое действие в 4 раза. Хлоргексидина биглюконат в комбинации с наносеребром по отношению к *Klebsiella pneumoiniae* усиливает свое действие в 4 раза, по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* – в 2 раза. Комбинация хлоргексидина биглюконата и мирасептина обладает нейтральным действием.

Определено, что наименьшей МИК среди изученного ряда антисептиков по отношению *Klebsiella pneumoiniae* обладает мирасептин, по отношению *Pseudomonas aeruginosa* – наночастицы серебра. Среди изученных комбинаций антисептиков самой перспективной является комбинации наночастица серебра с хлоргексидином биглюконатом или мирасептином, поскольку обладают аддитивным совместным действием по отношению к изученным микроорганизмам.

ЛИТЕРАТУРА

1. О мерах по снижению антибактериальной резистентности микроорганизмов : Приказ МЗ РБ № 1301 ; 29.11.2015.

2. Бурасова ЕГ, и др. Микробный пейзаж и уровень антибиотикорезистентности в отделениях хирургического стационара. Бюллетень восточно-сибирского научного центра сибирского отделения российской академии наук. 2010;72(2):15–16.

3. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований : учеб. пособие. Под ред. АС Лабинской, ЛП Блинковской, АС Ещиной. М.: Медицина, 2004.

4. Тапальский ДВ, Лагун ЛВ. Методы определения чувствительности к комбинациям антибиотиков грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью : инструкция по применению. Гомель, 2017.

SUMMARY

STUDY OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF ANTISEPTIC COMBINATIONS ON GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS

Kravchenko R.V., 1 year postgraduate student
Vitebsk State Order of Friendship of Peoples Medical University
27 Frunze Ave., Vitebsk, 210009, Republic of Belarus

The minimum inhibitory concentration of a number of antiseptics (chlorhexidine bigluconate, furacilin, miraceptin, dimexide, and a solution of spherical silver nanoparticles with an average particle size of 5 nm) and their combined antimicrobial action against Gram-negative microorganisms (Klebsiella pneumoiniae (ATCC 700603) and Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)) were analyzed.

Key words: *antimicrobial activity, antiseptic, combined action.*

REFERENCES

1. On measures to reduce antibacterial resistance microorganisms: Order of the Ministry of Health of the Republic of Belarus No. 1301. 29.11.2015. (In Russ)

2. Burasova EG, et al. Microbial landscape and the level of antibiotic resistance in the departments of a surgical hospital. Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian branch of the Russian Academy of Sciences. 2010;72(2)15-16. (In Russ)

3. General and sanitary microbiology with the technique of microbiological research: textbook. Textbook. Under the editorship of AS Laba, LP human rights, AS Edinoi. Moscow: Medicine, 2004. (In Russ)

4. Tapalsky DV, Lagun LV. Methods for determining the sensitivity to combinations of antibiotics of gram-negative bacteria with extreme and complete antibiotic resistance: instructions for use. Gomel, 2017. (In Russ)

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИКИ ИДИОПАТИЧЕСКОГО СКОЛИОЗА

Ли А.О., асп. 1 года обучения
Руководитель: **Хальчицкий С.Е.**, канд. биол. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: alina.zablockaja@pharminnotech.com

Деформация позвоночника, происходящая в результате аномалий в его развитии, является одной из распространенных ортопедических патологий детского возраста. Результаты ряда генетических исследований не показали значительной взаимосвязи между различными изученными полиморфизмами и скоростью прогрессирования идиопатического сколиоза (ИС). Изучение новых генетических маркеров ИС – важная и актуальная задача. Целью данного исследования явилось изучение некоторых генов нейромедиаторов. Проведено исследование полиморфизма генов, участвующих в рецепции и метаболизме нейромедиаторов (*SLC6A4, MAOA*) у больных ИС. Выявлены различия в распределении генотипов у больных ИС и в контрольной группе, что может служить одним из диагностических маркеров предрасположенности к развитию сколиотической болезни.

Ключевые слова: *идиопатический сколиоз, гены предрасположенности, полиморфизмы, метаболизм нейромедиаторов, диагностические маркеры.*

Среди ортопедических заболеваний искривление позвоночника является одной из самых распространенных патологий у детей и подростков 10-18 лет. Идиопатический сколиоз (ИС) имеет высокую частоту 2-3% в популяции. Природа и развитие спинальной деформации у больных ИС различна: у некоторых больных искривление позвоночника носит быстро прогрессирующий характер, у других – состояние деформации почти не изменяется до окончания процесса роста позвоночника [1].

С точки зрения определения тактики лечения пациента с ИС очень важно своевременно оценить характер течения деформации позвоночника на ранних стадиях развития деформации и выбрать группу пациентов с прогрессирующим характером заболевания [2]. Это необходимо для проведения адекватной терапии, направленной на исправление искривления и предотвращения дальнейшего развития заболевания.

Выявление этиологических факторов ИС невозможно без углубленных молекулярно-генетических исследований, позволяющих выявить биологические основы патологического процесса. На сегодняшний день проведено множество исследований, освещающих эту проблему с разных сторон [3]. Различные группы исследователей выполнили работы по анализу генов соединительной ткани, таких как коллаген 1 типа А1 и А2 (*COL1A1, COL1A2*), коллаген 2 типа А1(*COL2A1*), эластин (*ELN*), аггрекан (*ACAN*), фибриллин (*FBN1*). и других. Однако результаты этих исследований не показали значимой взаимосвязи между различными изученными полиморфизмами и скоростью прогрессирования ИС [4].

В генетической лаборатории НМИЦ детской травматологии и ортопедии им. Г.И. Турнера были проведены исследования полиморфизма генов фолатного цикла *MTHFR, MTR, MTRR,* а также гена интерлейкина *IL-6*. Эти исследования выявили определенные различия в распределении генотипов у больных ИС по сравнению с контролем, особенно для гена MTR. Тем не менее, исследования генов, связанных с этиологией и патогенезом ИС продолжаются.

В последние годы было выявлено, что дисбаланс нейромедиаторов может являться фактором прогрессии сколиотической деформации. Нейромедиаторы в патологических процессах играют универсальную роль, т.к. от них зависит нервная и мышечная проводимость, эмоциональное и психическое состояние, пищеварение и др. функции. Известно, что ингибирование транспорта серотонина приводит к изменению архитектуры и снижению минерального состава кости, массы кости и механической прочности кости. В связи с этим обстоятельством прогрессия сколиоза по ряду данных была связана именно со снижением минеральной плотности костей. Мутации генов синтеза мелатонина, являющегося метаболическим производным нейротрансмиттеров, также влияют на прогрессирование сколиоза [5].

Подтверждение этих данных может служить одним из диагностических маркеров ИС, а количественный анализ мутаций позволит предопределить характер течения искривления позвоночного столба.

Целью работы является оценка роли нейромедиаторов на примере изучения полиморфизмов генов их рецепции, транспорта и метаболизма в прогрессии идиопатического сколиоза. Задачи исследования: Провести сравнительный анализ полиморфизмов генов метаболизма нейромедиаторов – *SLC6A4, MAOA* у пациентов с прогрессирующими формами идиопатического сколиоза и в контрольной группе.

Пациенты

Обследовались пациенты с третьей и четвертой стадией ИС (дуга искривления более 25°) в возрастной группе от 14 до 18 лет с законченным костным ростом. Пациенты проходили лечение в Национальном медицинском исследовательском центре детской травматологии и ортопедии им. Г.И. Турнера, Санкт-Петербург.

Контрольную группу составили здоровые добровольцы без ортопедической патологии.

Генотипирование

Были исследованы полиморфизмы генов транспортера серотонина *SLC6A4* Stin2 VNTR и моноаминоксидазы А (*MAOA*) VNTR.

Геномную ДНК выделяли из клеток периферической крови с помощью набора реагентов «ДНК-Экстран-1» («Синтол», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Выделенную ДНК использовали для обнаружения полиморфизмов выбранных генов с помощью ПЦР.

Определение полиморфизма STin2 VNTR гена SLC6A4 проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Использовали набор реагентов «Encyclo Plus PCR kit» и пару праймеров, специфичных для данной последовательности. Праймеры, синтезированные ООО «Евроген» (Россия), имели следующие последовательности:

F 5 `- CAATGTCTGGCGCTTCCCCTACATAT -3`

R 5`- GACATAATCTGTCTTCTGGCCTCTCAAG -3`

Следующие условия ПЦР были применены для исследования VNTR STin2:

Первоначальная денатурация при 95 ° С в течение 4 минут сопровождалась 31 трехступенчатым циклом, который включал денатурацию в течение 30 секунд при 95 ° С, отжиг в течение 30 секунд при 67 ° С и элонгацию в течение 40 секунд при 72 ° С. На последнем цикле этап элонгации проводился при 72 ° С в течение 5 минут.

Результаты ПЦР оценивали с помощью ДНК-гель-электрофореза в 12% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием SYBR Green I (Lumiprobe, Россия) и визуализацией фрагментов с помощью леддера ДНК 100 п.н. (СибЭнзим, Россия), используемого для определения длины фрагментов.

Амплифицированные фрагменты распределялись следующим образом: 222 п.н. – 9 повторов, 261 п.н. – 10 повторов, 300 п.н. – 12 повторов.

ПЦР для определения полиморфизма MAOA-μVNTR проводили с использованием набора реагентов «Encyclo Plus PCR kit» и пары праймеров, синтезированных компанией «Евроген» (Россия).

F 5`-ACAGCCTGACCGTGGAGAAG-3`

R 5`-GAACGGACGCTCCATTCGGA-3`

Следующие условия ПЦР были применены для выявления MAOA-μVNTR:

За начальной денатурацией при 95 ° С в течение 3 минут следовали 30 трехступенчатых циклов, которые включали денатурацию в течение 30 секунд при 95 ° С, отжиг в течение 30 секунд при 60 ° С и элонгацию в течение 40 секунд при 72 ° С. На последнем цикле этап элонгации проводился при 72 ° С в течение 5 минут.

Метод визуализации результатов ПЦР не отличался от описанного выше для STin2 VNTR. Амплифицированные фрагменты распределялись следующим образом:

291 п.н. – 2 повтора, 321 п.н. – 3 повтора, 336 п.н. – 3,5 повтора, 351 п.н. – 4 повтора, 381 п.н. – 5 повторов.

Результаты генотипирования пациентов с ИС и лиц контрольной группы по полиморфизму STin 2 VNTR гена *SLC6A4* представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Частота генотипов полиморфизма STin 2 VNTR гена *SLC6A4* в группе больных ИС и контрольной группе

Генотипы полиморфизма *SLC6A4* STin2 VNTR из 17 п.н. повторов	Больные ИС		Контрольная группа	
	n	%	n	%
12R /12R	43	40.19	70	44.59
12R/10R	46	42.99	64	40.76
12R/9R	4	3.74	3	1.91
10R/10R	12	11.22	16	10.19
10R/9R	2	1.87	4	2.55
Всего	107		157	

По литературным данным STin2.12 обладает большей транскрипционной активностью, чем STin2.10. Как видно из таблицы, у больных ИС по сравнению с контрольной группой преобладают аллели с 10 повторами, что может говорить о меньшей транскрипционной активности гена транспортера серотонина и возможной недостаточности серотонина в синапсах.

Результаты генотипирования пациентов с ИС и лиц контрольной группы по полиморфизму μVNTR гена *MAOA* представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Частота генотипов μVNTR полиморфизма 30 п.н. гена *MAOA* в группах больных ИС и контрольной группе

Генотипы полиморфизма *MAOA-μVNTR* 30 п.н., количество повторов	Больные ИС		Контрольная группа	
	n	%	n	%
4R	46	68.66	37	66.07
3R	21	31.34	19	33.93
Всего	67	100.0	56	100.0

Ген *MAOA*, кодирующий моноаминоксидазу А (МАОА) и расположенный на коротком плече Х-хромосомы, содержит VNTR размером 30 п.н. с 2, 3, 3,5, 4 или 5 повторяющимися копиями. Самый распространенный варианты – это аллели с тремя и четырьмя повторами, последний отвечает за более высокую активность фермента. Напротив, наличие аллеля с тремя повторами приводит к снижению активности МАОА и приводит к увеличению уровня серотонина в синапсах. Как видно из Таблицы 2, у больных ИС преобладает аллель с четырьмя повторами и несколько выше, чем в контрольной группе, что говорит о более высокой активности фермента МАОА и возможной недостаточности серотонина в синапсах.

В совокупности с предыдущим полиморфизмом эти данные могут свидетельствовать о некоторой недостаточности серотонина в синапсах у больных ИС, сниженной нейротрансмиссии, что может определенным образом влиять на предрасположенность к развитию сколиоза.

Проведенное исследование некоторых полиморфизмов генов нейротрансмиссии выявило определенные различия в распределении генотипов у больных ИС и в контрольной группе. Эти различия могут влиять на активность нейротрансмиссии и быть предрасполагающим фактором к развитию ИС. Дальнейшие исследования в этой области, в частности генов *COMT, DRD4, HTR2A*, которые мы планируем, позволят уточнить картину характера нейротрансмиссии у больных ИС и, возможно, выявить новые факторы предрасположенности к развитию ИС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Negrini S, De Mauroy JC, Grivas TB, Knott P, Kotwicki T, Maruyama T, et al. Actual evidence in the medical approach to adolescents with idiopathic scoliosis. Eur J Phys Rehabil Med. 2014;50(1):87-92.

2. Vissarionov SV, Nadirov NN, Belyanchikov SM, Kokushin DN, Murashko VV, Kartavenko KA. Surgical treatment of children with idiopathic thoracolumbar scoliosis using transpedicular spinal systems. Pediatric Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery. 2015;3(3):15-20.

3. Fadzan M, Bettany-Saltikov J. Etiological Theories of Adolescent Idiopathic Scoliosis: Past and Present. Open Orthop J. 2017;11:1466-89.

4. Gorman KF, Julien C, Moreau A. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. Eur Spine J. 2012;21:1905-19.

5. Morningstar M. Neurotransmitter status and idiopathic scoliosis: A commentary on pathways, testing, clinical utility, and treatment. Curr Pediatr Res. 2016;20(1&2):14-19.

SUMMARY

SOME ASPECTS OF GENETICS OF IDIOPATHIC SCOLIOSIS

Li A.O., 1th year aspirant
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Spinal deformity resulting from anomalies in its development is one of the most common orthopedic pathologies in childhood. The results of a number of genetic studies have not shown a significant relationship between the various polymorphisms studied and the rate of progression of idiopathic scoliosis (IS). The study of new genetic markers of IP is an important and urgent task. The aim of this study was to study several neurotransmitter genes. A study of the polymorphism of genes involved in the reception and metabolism of neurotransmitters (SLC6A4, MAOA) in patients with IS was carried out. Differences were revealed in the distribution of genotypes in patients with IS and in the control group, which can serve as one of the diagnostic markers of predisposition to the development of the scoliotic disease.

Key words: *idiopathic scoliosis, predisposition genes, polymorphisms, neurotransmitter metabolism, diagnostic markers.*

REFERENCES

1. Negrini S, De Mauroy JC, Grivas TB, Knott P, Kotwicki T, Maruyama T, et al. Actual evidence in the medical approach to adolescents with idiopathic scoliosis. Eur J Phys Rehabil Med. 2014;50(1):87-92.

2. Vissarionov SV, Nadirov NN, Belyanchikov SM, Kokushin DN, Murashko VV, Kartavenko KA. Surgical treatment of children with idiopathic thoracolumbar scoliosis using transpedicular spinal systems. Pediatric Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery. 2015;3(3):15-20.

3. Fadzan M, Bettany-Saltikov J. Etiological Theories of Adolescent Idiopathic Scoliosis: Past and Present. Open Orthop J. 2017;11:1466-89.

4. Gorman KF, Julien C, Moreau A. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. Eur Spine J. 2012;21:1905-19.

5. Morningstar M. Neurotransmitter status and idiopathic scoliosis: A commentary on pathways, testing, clinical utility, and treatment. Curr Pediatr Res. 2016;20(1&2):14-19.

ЭКПРЕССИЯ БЕЛКОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ПРОХОЖДЕНИЕ ФАЗЫ G1 КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА HCT116 И H5

Литвинова М.В., студ. 5 курса
Руководитель: **Арсениев Н.А.**, к.б.н., доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
Руководитель: **Попов Б.В.**, д.б.н.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии РАН»
194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. д.4, Российская Федерация
E-mail: litvinova-masha@bk.ru

Показана возможная роль белков Cyclin E, Cyclin D1, cdk4, cdk2, E2F1 и USP28 в развитии аденокарциномы кишечника человека на нормальных клетках кишечника (HCT116) и с ингибированной деубиквитиназой (H5).

Ключевые слова: *аденокарцинома кишечника, деубиквитиназа Usp28, иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг, рак кишечника, клеточный цикл.*

Главным звеном патогенеза опухолевого роста является нарушение механизмов регуляции нормального клеточного цикла. Прогрессия клеточного цикла в фазе G1 осуществляется благодаря накоплению циклинов D и E. Они образуют комплексы с циклин-зависимыми киназами (cdk4, cdk2), которые фосфорилируют продукты семейства гена ретинобластомы (pRb). Последние ингибируют тормозящее влияние pRb на прогрессию клеточного цикла за счет высвобождения активных транскрипционных факторов (E2F1). Показано, что существенную роль в прогрессии опухолевого роста играет деубиквитиназа Usp28 [2]. Через изменения активности лигазы Fbw7 она осуществляет прямое деубиквитинилирование и стабилизацию его субстратов (циклин E) [3]. Нарушение экспрессии данных белков способствует развитию и поддержанию злокачественного роста. Разработка фармакологических агентов, точечно прерывающих это молекулярное звено патогенеза, является одной из актуальных задач современной таргетной противоопухолевой терапии.

Целью данной работы было изучение роли белков Usp28, Cyclin E, Cyclin D1, Cdk4, cdk2 и E2F1 в развитии аденокарциномы кишечника.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. С помощью иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) определить изменение уровней Cyclin E, Cyclin D1, Cdk4,cdk2, E2F1, USP28 в ходе клеточного цикла в 12h точке.
2. С помощью иммуноблотинга определить изменение уровней данных белков в G1/S переходе клеточного цикла.
3. Охарактеризовать по уровню продукции в клетках Usp28 возможную взаимосвязь между Usp28, Cyclin E, Cyclin D1, Cdk4,cdk2 и E2F1.

Определение изменения уровней в ходе клеточного цикла в 12h точке с помощью иммунофлуоресцентного анализа

В результате 48 ч культивирования в «голодной» ростовой среде (РС) клеток линий HCT116 и H5 аккумулируются в фазе G0/G1. После ретимуляции фетальной бычьей сывороткой (ФБС), они вступают в G1/S переход в 12 ч точке. Первые антитела в блокирующем растворе с учетом разведения оставляли на ночь. Вторые антитела на 60 минут. Анализ производили на Конфокальном микроскопе – Leica TCS SP5.

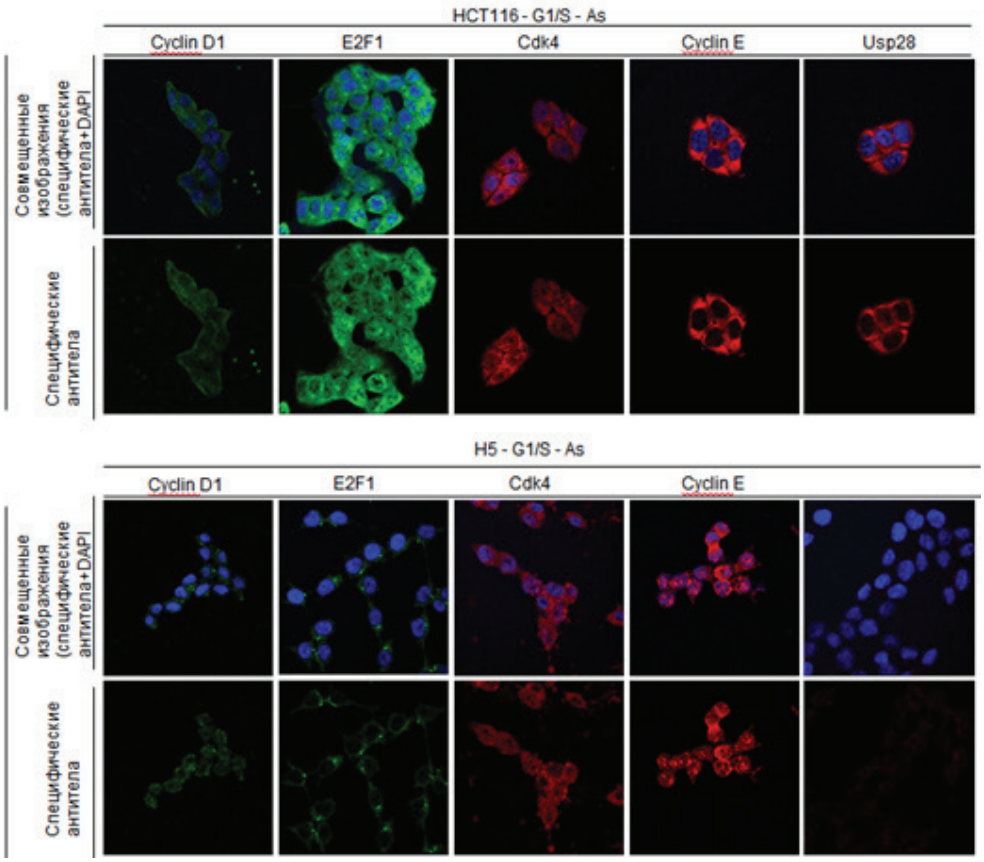


Рисунок 1. Экспрессия белков Cyclin E, Cyclin D1, Cdk4 и E2F1 в HCT116 и H5 клетках в As точке

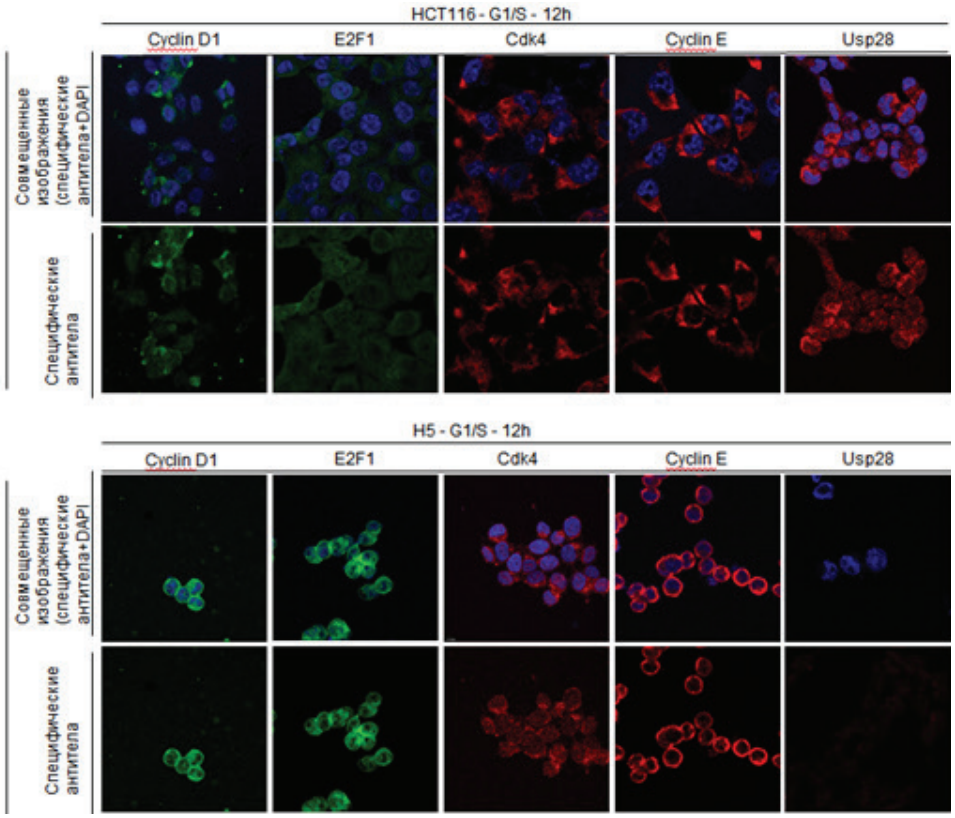


Рисунок 2. Экспрессия белков Cyclin E, Cyclin D1, Cdk4 и E2F1 в HCT116 и H5 клетках в 12h точке

Вестерн-блоттинг (WB). Получали экстракты, используя Ripa-буфера для лизиса и коктейли ингибиторов протеаз. Определяли концентрацию белка в экстрактах методом Бредфорд. Электрофорез проводили в 10% ПААГ с SDS при силе тока 30А на один гель. В качестве стандартов на одну из дорожек наносили по 3 мкл Protein standards for SDS-PAGE. В качестве стандарта использовали Protein standards for SDS-PAGE (Thermo Fisher Scientific,США).

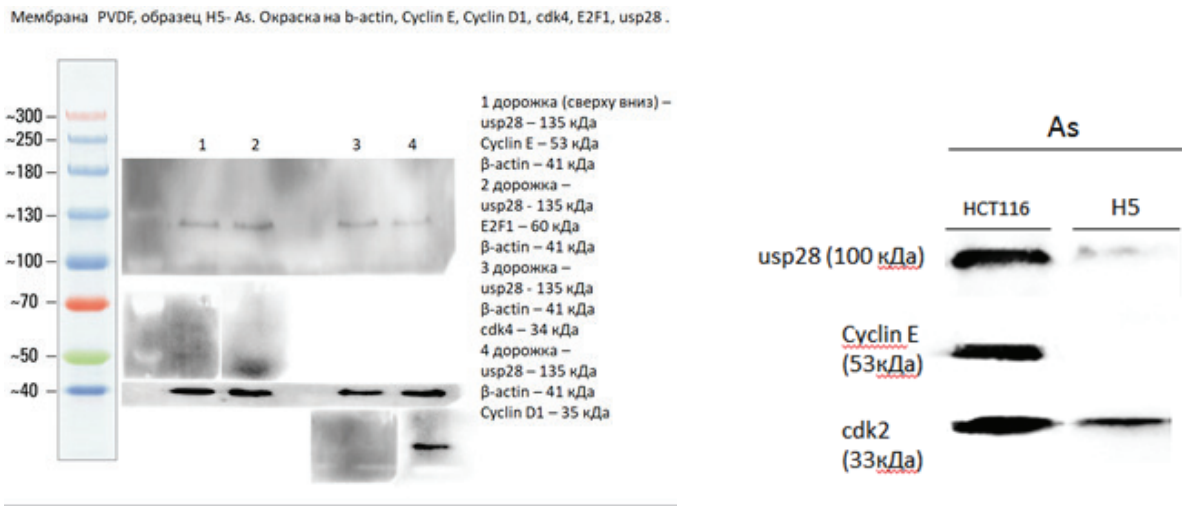


Рисунок 3. Слева – Экспрессия белков Usp28, Cyclin E, Cyclin D1, Cdk4 и E2F1 в клетках H5; справа –Экспрессия белков Usp28, Cyclin E, Cdk2 в клетках H5 и HCT116

Установлено, что экспрессия специфических антител при ИФА у исследуемых белков в асинхронном состоянии выше у HCT116. В 12-часовой точке, по сравнению с асинхронной, в обеих линиях экспрессия белков увеличивается. У линии HCT116 экспрессия более выражена, особенно для Cyclin E и cdk4. Деубиквитиназа USP28 в H5 ингибирована, по сравнению с HCT116.

Результаты WB показали, что в клетках H5 в асинхронной точке экспрессия Cyclin E, E2F1, cdk4, cdk2 проявляется слабо в отличие от HCT116.

Результаты ИФА дают основание предположить, что в клетках аденокарциномы кишечника -HCT116, деубиквитиназа Usp28 и способствует переходу G1/S в клеточном цикле, стимулируя пролиферацию клеток и ускоряя развитие злокачественной опухоли.

По результатам Вестерн-блота, в клетках с ингибированной деубиквитиназой Usp28 , экспрессия исследуемых белков слабо выражена.

Наблюдается прямая зависимость между изменением количества экспрессируемой деубиквитиназы и исследуемых белков в ходе клеточного цикла в фазе перехода G1/S.

Результаты исследования позволяют считать, что Usp28 играет важную роль в регуляции уровня и функциональной активность белка Cdc25A, контролирующего вход клетки в фазу репликации ДНК. С большой вероятностью можно предположить, что деубиквитиназу Usp28 следует рассматривать как наиболее перспективный кандидат на мишень для таргетной фармакотерапии аденокарциномы кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benjamin R, Zatulovskiy E, Cristea S, Cyclin D-Cdk4,6 Drives Cell-Cycle Progression via the Retinoblastoma Protein's C-Terminal Helix, Mol Cell. 2019 May 16;74(4):758–770.e4.

2. Qingguo Li, Yaqi Li ,Jing Li, Yanlei Ma, FBW7 suppresses metastasis of colorectal cancer by inhibiting HIF1α/CEACAM5 functional axis, International Journal of Biological Sciences 2018,14(7):726-735.

3. Diefenbacher ME, Chakraborty AA, Blake SM, Usp28 counteracts Fbw7 in intestinal homeostasis and cancer, Cancer research. 2015.

SUMMARY

EXPRESSION OF PROTEINS THAT REGULATE THE PASSAGE OF THE G1 PHASE OF THE CELL CYCLE IN INTESTINAL ADENOCARCINOMA CELLS HCT116 AND H5

Litvinova M.V., 5th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation
Federal State Budgetary Institution of Science "Institute of Cytology RAS"
4, Tikhoretsky pr.,St. Petersburg, 194064, Russian Federation

The possible role of the protein Cyclin E, Cyclin D1, Cdk4, E2F1 in the development of human intestinal adenocarcinoma in normal intestinal cells (HCT116) and with inhibited deubiquitinase (H5) has been shown.

Key words: *intestinal adenocarcinoma, Usp28 deubiquitinase, immunofluorescence analysis, western blotting, bowel cancer, cell cycle.*

REFERENCES

1. Benjamin R, Zatulovskiy E, Cristea S, Cyclin D-Cdk4,6 Drives Cell-Cycle Progression via the Retinoblastoma Protein's C-Terminal Helix, Mol Cell. 2019 May 16;74(4):758–770.e4.

2. Qingguo Li, Yaqi Li ,Jing Li, Yanlei Ma, FBW7 suppresses metastasis of colorectal cancer by inhibiting HIF1α/CEACAM5 functional axis, International Journal of Biological Sciences 2018,14(7):726-735.

3. Diefenbacher ME, Chakraborty AA, Blake SM, Usp28 counteracts Fbw7 in intestinal homeostasis and cancer, Cancer research. 2015.

ОЦЕНКА ПЛОЩАДИ РАНЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Никитин И.Д., студ. 2 курса, **Свотин А.А.**, студ. 3 курса

Руководители: **Селиванова И.А.**, док. фарм. наук, проф., **Терехов Р.П.**, препод.

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),

119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Российская Федерация

E-mail: nikitin_i_d@student.sechenov.ru

Проведено сравнение методов измерения площади раневой поверхности в эксперименте *in vivo*, основанных на аналоговых и цифровых технологиях. Определены затратность, трудоемкость и точность измерений, выявлены преимущества и недостатки каждого из них. На основании статистических данных в эксперименте *in vivo* на крысах линии Wistar доказана применимость обоих методов для целей фармакологического исследования.

Ключевые слова: *доклинические исследования, ожоги, методология эксперимента in vivo, терапевтическая эффективность, крысы, цифровые технологии.*

Ожоги являются одним из самых распространенных травматических поражений кожных покровов, поэтому для их лечения требуется эффективная терапия [1]. В литературе описаны контактные и бесконтактные методы оценки раневой поверхности [2]. Для определения динамики изменения площади раны все чаще используют инновационные методы с привлечением цифровых технологий.

Цель работы состояла в поиске оптимального метода оценки раневой поверхности у подопытных животных в эксперименте *in vivo*.

Испытания проводили на базе вивария Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Дизайн эксперимента представлен на рисунке 1. Крыс линии Wistar содержали в соответствии с ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014. Животные были поделены на 2 группы по 5 особей в каждой. Группа I – отрицательный контроль, группа II – лечение стандартным противоожоговым фитопрепаратом (облепиховое масло) [3]. Проведение эксперимента было одобрено Локальный этический комитет Сеченовского Университета (протокол №19-20 от 02.07.2020). Ожог моделировали по распространенной методике, путем нанесения раскаленного металлического бруска на предварительно выбритый участок кожи [4].

Рисунок 1. Дизайн эксперимента

При определении размеров раневой поверхности использовали два способа: контактный метод Л.Н. Поповой и бесконтактный метод цифрового фотографирования с эталоном площади с последующей компьютерной обработкой результата [2]. В соответствии с методом Л.Н. Поповой на ожоговую поверхность накладывали прозрачную полиэтиленовую пленку и контур раны обводили маркером. Площадь фигуры рассчитывали с помощью миллиметровой бумаги. При бесконтактном методе на первом этапе получали изображения ожогов вместе с внутренним стандартом размера. Далее с помощью программы GNU Image Manipulation Program (v.2.10.18, GNOME Foundation, США) вычисляли площадь раневой поверхности.

Для сравнения выборок, полученных независимыми методами, использовали *U*-критерий Манна-Уитни, расчет которого производили по формуле:

$$U = (n_1 \cdot n_2) + \frac{n_x \cdot (n_x + 1)}{2} - Tx,$$

где n_1, n_2 – число измерений, осуществленных контактным и бесконтактным методом, соответственно; Tx – большая из двух ранговых сумм; n_x – число измерений в группе с большей ранговой суммой. Рассчитанное значение ($U_{эмп}$) сравнивали с критическим ($U_{кр}$) при уровне значимости 0,05. Различия считали недостоверными, если $U_{эмп} > U_{кр}$.

Затратность. Для проведения контактного метода необходимы полиэтиленовая пленка, перманентный маркер, миллиметровая бумага, что обходится примерно в 250 р на весь эксперимент. Использование бесконтактного метода обходится значительно дороже: для него требуются фотоаппарат, штатив, осветительный прибор, компьютер и специализированное программное обеспечение.

Трудоемкость. Бесконтактный метод является менее трудоемким, так как лишен скрупулезной работы по обведению контуров раневой поверхности и рутинных измерений на миллиметровой бумаге. В целом, время, затрачиваемое на получение результатов, контактным методом составляет около 4 минут на 1 крысу, а бесконтактным – почти в 3 раза меньше.

Точность измерений. При использовании каждого из методов возникает погрешность, содержащая как систематическую, так и случайную составляющие. Она обусловлена переносом контуров раны и преобразованием площади поверхности раны на 3D-объекте в плоскостной формат для контактного (σ = 3,13 см^2) и бесконтактного метода (σ = 3,02 см^2), соответственно. Полученные данные однородны, так как доверительные интервалы средних площадей раневой поверхности совпадают (табл. 1).

Таблица 1 – Динамика изменения площади раневой поверхности

Группа	Метод	Площадь раны, см^2			
		День 1	День 8	День 14	День 24
I	контактный	7,7±1,0	6,4±0,5	3,2±0,6	0,6±0,8
	бесконтактный	8,1±1,2	5,5±1,3	2,8±0,7	0,5±0,2
II	контактный	8,9±1,0	5,7±0,3	3,0±1,5	0,6±0,6
	бесконтактный	7,6±1,4	6,7±1,5	3,3±1,5	0,6±0,7

При статистической обработке рассчитали *U*-критерий для сравнения значений, полученных в каждый из 4 дней. Результаты представлены в таблице 2. Критическое значение *U*-критерия для двух выборок, каждая из которых включает 5 чисел, равно 4. Во всех 8 случаях $U_{эмп} > U_{кр}$, что свидетельствует о недостоверности различий.

Таблица 2 – Мониторинг *U*-критерия

Группа	Эмпирическое значение критерия Манна-Уитни ($U_{эмп}$)			
	День 1	День 8	День 14	День 24
I	10	5	6,5	10
II	4,5	5,5	10,5	12

Также при статистической обработке результатов была построена диаграмма «ящик с усами», иллюстрирующая изменение раневой площади в соответствии с данными по каждому из методов (рис. 2). Символом «X» обозначается среднее арифметическое по выборке, а отрезком внутри «ящика» – медиана. Можно заметить, что по мере проведения эксперимента данные величины выравниваются. Вероятно, уменьшение раневых поверхностей сопровождается уменьшением вклада ранее упомянутых ошибок в неточность измерений.

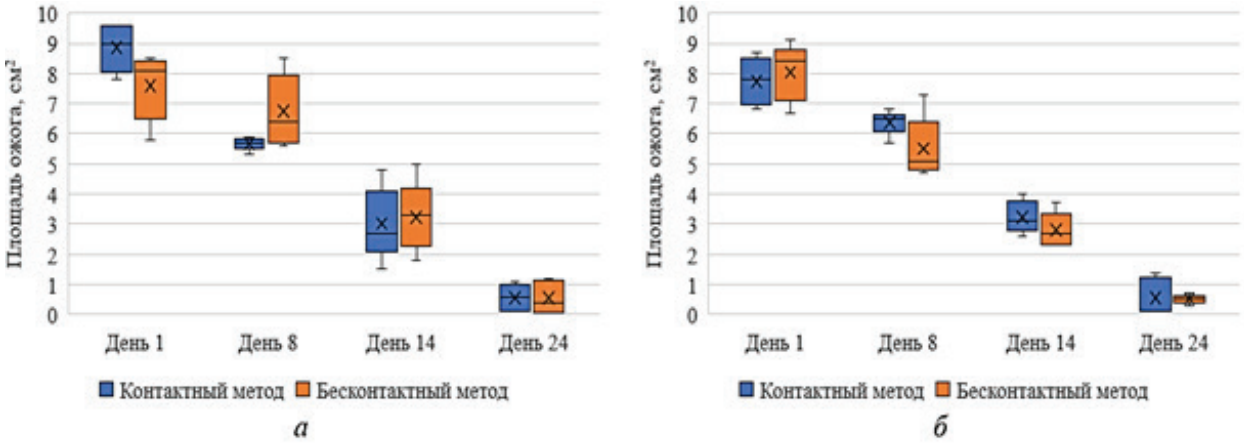


Рисунок 2. Мониторинг заживления ран: а – группа I, б – группа II

При масштабировании эксперимента по оценке ранозаживляющей способности препаратов целесообразно использование обоих методов расчета площади ожоговой поверхности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федоров ВД, Алексеев АА, Лавров ВА, Тюрников ЮИ. Ожоги как проблема медицины катастроф. Скорая медицинская помощь, 2006; 7(3): 36-36.

2. Савченко ЮП, Федосов СР. Методы определения размеров раневой поверхности. Вестник хирургии имени ИИ Грекова, 2007; 166 (1).

3. Машковский МД. Лекарственные средства изд. М.: Медицина; 1993,ЧII: 54.

4. Alemzadeh E, Oryan A, Mohammadi AA. Hyaluronic acid hydrogel loaded by adipose stem cells enhances wound healing by modulating IL-1β, TGF-β1, and bFGF in burn wound model in rat. J Biomed Mater Res A, 2020; 108 (2): 555-567. DOI: 10.1002/jbm.b.3441.

SUMMARY

WOUND HEALING MEASURING: CONTACT AND NON-CONTACT METHODS

Nikitin I.D., 2th year student, **Svotin A.A.,** 3th year student
Sechenov University; 8-2, Moscow, Trubetskayast., 119991, Russia

Comparing of defining the methods of wound surface area based on analog and digital technologies was performed while *in vivo* experiment. The complexity, cost and accuracy of each of them are determined.

Key words: *burns, in vivo experiment methodology, therapeutic efficacy, rats, digital technologies.*

REFERENCES

1. Fedorov VD, Alekseev AA, Lavrov VA, Tyurnikov Yu.I. Ozhogi kak problema mediciny katastrof. Skoraya medicinskaya pomoshch', 2006; 7(3): 36-36.

2. Savchenko YuP, Fedosov SR. Metody opredeleniya razmerov ranevoj poverhnosti. Vestnik hirurgii imeni II Grekova, 2007; 166 (1).

3. Mashkovskij MD. Lekarstvennye sredstva izd. M.: Medicina; 1993,PII: 54.

4. Alemzadeh E, Oryan A, Mohammadi AA. Hyaluronic acid hydrogel loaded by adipose stem cells enhances wound healing by modulating IL-1β, TGF-β1, and bFGF in burn wound model in rat. J Biomed Mater Res A, 2020; 108 (2): 555-567. DOI: 10.1002/jbm.b.3441.

ИЗУЧЕНИЕ КРОВООСТАНАВЛИВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПЕНЫ МЕДИЦИНСКОЙ

Новицкая В.А., магистрант кафедры ОЭФ с курсом ФПК и ПК, **Гвоздев С.В.**, асп. кафедры общей хирургии,
Красновская М.А., студ. 5 курса, **Пуйдак Д.В**., студ. 5 курса
Руководитель: **Ржеусский С.Э.**, канд. фарм. наук, доц.
Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
210009, Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Республика Беларусь
E-mail: veronikanovitskaya1998@gmail.com

Целью работы было оценить специфическую активность пены медицинской с хлоридами алюминия и железа (III) с помощью методики моделирования паренхиматозного кровотечения на печени крыс. Было протестировано 7 концентраций и определён наиболее эффективный состав гемостатического лекарственного препарата местного действия.

Ключевые слова: *паренхиматозное кровотечение, пена медицинская, моделирование кровотечения, алюминия хлорид, железа хлорид, доклинические исследования.*

Кровотечение паренхиматозных органов (печень, селезёнка, почки), которое может быть вызвано как хирургическими манипуляциями, так и криминальными и транспортными происшествиями, способно угрожать жизни пациента и должно быть остановлено. Исходом неконтролируемого кровоизлияния может быть развитие ДВС-синдрома, геморрагического шока, ишемии с последующим некрозом тканей. Даже в лучших медицинских центрах летальность от травм печени составляет 25-45%, что является высоким показателем [1, 2].

Одним из наиболее походящих способов достижения гемостаза является использование местных гемостатических препаратов. Это могут быть растворы, губки, гели-клеи, порошки и другие лекарственные формы. Их применение уменьшает время проведения операции и упрощает её технику. Однако, не все аппликационные материалы обладают достаточными адгезивными свойствами или могут использоваться, например, при эндоскопических хирургических вмешательствах или сквозных повреждениях органа. Некоторые из них способны вызывать хронические воспаления из-за неполной деградации полимеров, входящих в состав таких средств достижения гемостаза. Всё это обуславливает актуальность разработки новых кровоостанавливающих препаратов местного действия [4].

Целью данного исследования является оценка эффективности кровоостанавливающей медицинской пены, содержащей в своём составе соли алюминия и железа (III).

На основе Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств доктора медицинских наук, профессора А.Н. Миронова была проведена оценка специфической фармакологической активности кровоостанавливающих препаратов местного действия с использованием крыс [5]. Животным, находящимся под тиопентало-

вым наркозом, который вводился внутрибрюшинно из расчёта на килограмм массы тела, выполняли лапаротомию при помощи продольного разреза по белой линии живота. После этого в рану выводили часть печени и проводили её резекцию скальпелем. Срезанный сегмент в вертикальной проекции имел вид круга или эллипса. Общая площадь образованной кровоточащей раны с ровными краями и равномерной кривизной составляла около 1 см^2. Глубина её была приблизительно 0,1 см.

Для каждого животного определяли время достижения гемостаза и послеоперационную активность (0 баллов – активны, 1 балл – пассивны в первые сутки после операции, 2 балла – пассивны на протяжении всего времени от операции до вскрытия).

Выведение из эксперимента проводили на 3 сутки с использованием метода цервикальной дислокации под наркозом. После этого оценивались следующие параметры послеоперационных осложнений по шкале от 0 до 3 для каждой крысы:

- наличие и количество спаек (0 – отсутствуют, 1 – 1-2 спайки, 2 – от 3 до 5, 3 – более 5);
- наличие и степень воспаления (0 – отсутствует, 1 – небольшое воспаление в районе раны, 2 – воспаление, затрагивающее близлежащие здоровые ткани, 3 – обширное воспаление раны и его наличие его признаков в брюшной полости);
- наличие фибринозного налёта (0 – отсутствует, 1 – локализован лишь на ране, 2 – выходит за пределы раны на здоровые ткани);
- наличие кровяных сгустков (0 – отсутствуют, 1 – имеются).

По каждой экспериментальной группе было определёно среднее время достижения гемостаза и общий балл показателей послеоперационных осложнений (вычислялся посредством суммированиях средних баллов по группе для каждого показателя).

С помощью данной методики была проведена оценка следующих составов пены медицинской: группа 1 – алюминия хлорида 5% и железа(III) хлорида 0% (4 крысы); группа 2 – $AlCl_3$ 10% и $FeCl_3$ 0% (4 крысы); группа 3 – $AlCl_3$ 0% и $FeCl_3$ 5% (4 крысы); группа 4 – $AlCl_3$ 5% и $FeCl_3$ 5% (4 крысы); группа 5 – $AlCl_3$ 10% и $FeCl_3$ 5% (5 крыс); группа 6 – $AlCl_3$ 5% и $FeCl_3$ 10% (5 крыс); группа 7 – $AlCl_3$ 10% и $FeCl_3$ 10% (4 крысы). В 8 контрольной группе было оценено время достижения гемостаза без применения каких-либо гемостатических средств и мер.

Результаты оценки специфической активности пены медицинской по каждой группе представлены в таблице.

Таблица – Значение показателей послеоперационных осложнений и среднего времени достижения гемостаза для каждой из изученных групп

	Наличие и количество спаек	Наличие и степень воспаления	Наличие фибринозного налёта	Наличие кровяных сгустков	Послеоперационная активность	Общий показатель послеоперационных осложнений, балл	Среднее время достижения гемостаза, с
Группа 1 ($AlCl_3$ 5% и $FeCl_3$ 0%)	1-2 (1 балл)	1 балл	Небольшой налёт (0,75 балла)	Нет (0 баллов)	Активны (0 баллов)	2,75	40
Группа 2 ($AlCl_3$ 10% и $FeCl_3$ 0%)	Нет (0 баллов)	0,3 балла	Небольшой налёт (1 балл)	Нет (0 баллов)	Активны (0 баллов)	1,3	22,5
Группа 3 ($AlCl_3$ 0% и $FeCl_3$ 5%)	1-2 (0,67 балла)	1 балл	Нет (0 баллов)	Нет (0 баллов)	0,67 балла	2,34	90
Группа 4 ($AlCl_3$ 5% и $FeCl_3$ 5%)	Более 5 (1,75 балла)	1,75 балла	0,25 балла	Нет (0 баллов)	Активны (0 баллов)	3,75	30
Группа 5 ($AlCl_3$ 10% и $FeCl_3$ 5%)	Единичный случай (0,5 балла)	0,25 балла	0,75 (налёт фибрина выходит за пределы области раны)	Нет (0 балла)	Активны (0 баллов)	1,5	32
Группа 6 ($AlCl_3$ 5% и $FeCl_3$ 10%)	3 и более (1,3 балла)	1,3 балла	1 (налёт фибрина у двух крыс, у одной из них слой плотный и выходит за пределы раны)	Нет (0 баллов)	Активны (0 баллов)	3.6	24,6
Группа 7 ($AlCl_3$ 10% и $FeCl_3$ 10%)	2 и более (1 балл)	1 балл	Обширный налёт (1,75 балла)	Нет (0 баллов)	Активны (0 баллов)	3,75	32,75
Группа 8 (контрольная)	–	–	–	–	–	–	261,75

В среднем, на выполнение одной операции затрачивалось около 20 мин. Общая переносимость выполненной процедуры отмечалась как хорошая.

В группе номер 2 в момент операции после оценки времени достижения гемостаза была задета артерия у одной из крыс, и животное было выведено из эксперимента без оценки данных послеоперационных осложнений. В группе номер 3 показатели одного из подопытных животных исключены из-за чрезмерной глубины нанесения раны.

Установлено, что самое короткое время остановки кровотечения наблюдалось в группах 2 ($AlCl_3$ 10% и $FeCl_3$ 0%) и 6 ($AlCl_3$ 5% и $FeCl_3$ 10%). Диапазоны значений времени гемостаза находятся в интервале 17-25 с и 10-40 с соответственно, среднее время в группах – 22,5 с и 24,6 с. В группах 3 и 6 при нанесении исследуемых лекарственных препаратов наблюдалось почернение поверхности печени.

В послеоперационный период крысы чувствовали себя в пределах нормы, их поведение не отличалось от поведения здоровых животных. Исключением являлись двое животных группы 3, у которых активность восстановилась лишь к 3-м суткам. Предположительно, это связано с большой кровопотерей из-за длительного времени остановки кровотечения (около 90 секунд).

При исследовании послеоперационных осложнений установлено, что наиболее щадящими являются составы номер 2 и 5 с содержанием алюминия хлорида 10%. В этих группах практически не наблюдались признаки воспаления и только у одного животного обнаруживались спайки.

Отмечено, что состав номер 6, обладающий хорошим временем достижения гемостаза (24,6 с), вызывал воспаление. Печень была покрыта слоем фибрина, обнаруживались множественные спайки.

Установлено, что состав экспериментального лекарственного препарата с содержанием $AlCl_3$ 10% и $FeCl_3$ 0% обладал наилучшим временем остановки кровотечения, при этом он практически не вызывал воспалительных реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шаймарданов РШ, Губаев РФ, Шарафиев СЗ, и др. Хирургическая тактика при травматических повреждениях печени. Вестник современной клинической медицины. 2015;8 (1):104-108.

2. Липатов ВА, Ершов МП, Сотников КА, и др. Современные тенденции применения локальных аппликационных кровоостанавливающих средств. INNOVA. 2016;2(3):64-69. DOI: 10.21626/innova/2016.2/07.

3. Липатов ВА, Кудрявцева ТН, Северинов ДА. Применение карбоксиметилцеллюлозы в экспериментальной хирургии паренхиматозных органов. Наука молодых. 2020;8(2):269-283. DOI: 10.23888/HMJ202082269-283.

4. Миронов АН. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. Москва: Гриф и К, 2013.

SUMMARY

STUDY OF THE HEMOSTATIC EFFECT OF MEDICAL FOAM

Novitskaya V.A., Master's degree student, Department of OEF with the course of FCE and RP,
Gvozdev S.V., postgraduate doctoral student, Department of General Surgery,
Krasnovskaya M.A., 5th year student, **Puydak D.V.**, 5th year student
Vitebsk State Order of People's Friendship Medical University, 27, Frunze Ave., 210009, Republic of Belarus

The aim of the work was to evaluate the specific activity of medical foam with aluminum and iron (III) chlorides using the method of modeling parenchymal bleeding in rat liver. 7 concentrations were tested and the most effective composition of a topical hemostatic drug was determined.

Key words: *parenchymal bleeding, medical foam, modeling of bleeding, aluminum chloride, iron chloride, preclinical studies.*

REFERENCES

1. Shaimardanov RSh, Gubaev RF, Sharafiev SZ. et al. Surgical tactics for traumatic liver injuries. Bulletin of Contemporary Clinical Medicine. 2015;8(1):104-108. (In Russ)

2. Lipatov VA, Ershov MP, Sotnikov KA. et al. Current trends in the use of local application hemostatic agents. INNOVA. 2016;2(3):64-69. DOI: 10.21626 / innova / 2016.2 / 07. (In Russ)

3. Lipatov VA, Kudryavtseva TN, Severinov DA. The use of carboxymethyl cellulose in experimental surgery of parenchymal organs. Science of the Young. 2020;8(2):269-283. DOI: 10.23888 / HMJ202082269-283. (In Russ)

4. Mironov AN. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1. Moscow: Grif and K, 2013. (In Russ)

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АЛЛИЛМОРФОЛИНА НА ПОВЕДЕНИЕ *DANIO RERIO* В ТЕСТЕ «НОВЫЙ АКВАРИУМ»

Приходько В.А., асп. 2 года обучения, **Кан А.В.**, студ. 5 курса
Руководитель: **Оковитый С.В.**, д-р мед. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

Изучено влияние пяти производных аллилморфолина различной структуры на поведение рыб *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум». Установлено наличие седативной активности у исследуемых соединений.

Ключевые слова: *производные аллилморфолина, Danio rerio, поведенческие тесты, новый аквариум, седативные средства.*

Антихолинэстеразные средства и антагонисты рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) являются широко используемыми препаратами в неврологической практике. Для ряда производных аллилморфолина (ПАМ) *in vitro* показана блокирующая активность в отношении как ацетилхолинэстеразы, так и NMDA-рецепторов [1], что делает их потенциально перспективными нейропротекторными средствами. В связи с этим **целью** данной работы стало изучение влияния различных ПАМ на поведение *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум».

Объектами исследования стали 5 ПАМ: (*E*)-4-[1-(6-хлор-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолиния хлорид (9a), (*E*)-4-[1-(8-бром-6-метил-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолин-4-ия хлорид (9j), (*E*)-4-[1-(6,7-дифтор-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолин-4-ия хлорид (9l), (*E*)-4-[3-(6-хлор-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорид (33a), (*E*)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорид (33b) (см. рисунок).

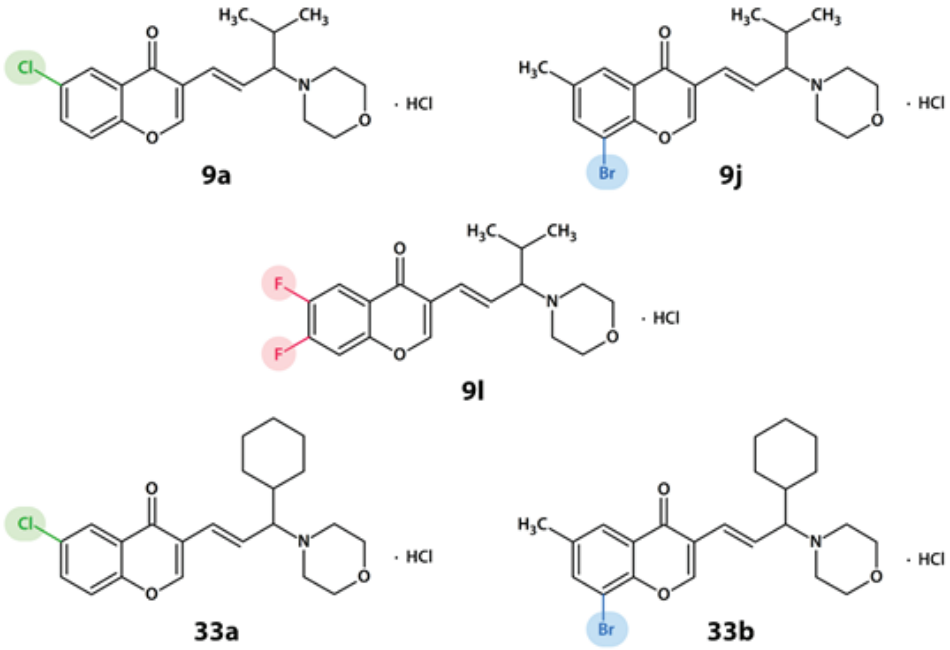


Рисунок. Структурные формулы производных аллилморфолина 9a, 9j, 9l, 33a и 33b

Эксперименты были выполнены на 320 взрослых рыбах *Danio rerio*, рандомизированных на 4 группы по 16 особей (всего 64 особи) для каждого соединения. Активность фармакологических агентов оценивали с помощью теста «Новый аквариум» (НА) [2]. Непосредственно перед тестированием рыб на 20 мин помещали в пластиковые контейнеры, наполненные 500 мл воды (контрольная группа) либо растворами испытуемых веществ в различных концентрациях (9a: 1, 10, 20 мг/л; 9j, 9l и 33a: 1, 10, 100 мг/л; 33b: 1, 10, 100 мкг/л). Концентрации были выбраны с учетом ранее определенных значений медианных летальных доз LD_{50}, а также растворимости ПАМ в воде. Запись движения рыб в НА вели в течение 5 мин при помощи видеокамеры (Canyon, КНР). Анализ видеозаписей проводили с помощью программы EthoVision XT 11 (Noldus Information Technology, Нидерланды). Для каждой рыбы оценивали проплытую дистанцию (см), среднюю и максимальную скорость (см/с), время, проведенное в неподвижном состоянии (с), время, проведенное в верхней части аквариума (с), число переходов из нижней части аквариума в верхнюю и латентность первого такого перехода (с) [3].

Все исследуемые соединения достоверно уменьшали проплытую дистанцию, среднюю и (кроме 33b) максимальную скорость движения рыб. Изученные ПАМ увеличивали время, проводимое рыбами в неподвижном состоянии, а

соединения 9a, 33a и 33b – также уменьшали время, проводимое в верхней части НА. Данные ПАМ, а также соединение 9l снижали число переходов рыб из нижней в верхнюю часть НА. Кроме этого, соединения 9a, 9j и 9l увеличивали латентность первого такого перехода. Перечисленные изменения в поведении *Danio rerio* свидетельствуют о наличии седативной активности у исследуемых ПАМ. Такой вид активности описан для NMDA-антагонистов кетамина и мемантина [4].

Результаты изучения влияния пяти различных ПАМ на поведение *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум» и обнаружение у них седативной активности с учетом полученных ранее *in vitro* данных позволяют предположить, что ПАМ реализуют свои центральные эффекты через NMDA-рецепторы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chernov NM, Shutov RV, Barygin OI. et al. Synthesis of chromone-containing allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-type reaction. Eur. J. Org. Chem. 2018;2018(45):6304–6313. DOI: 10.1002/ejoc.201801159.

2. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. Behav. Brain Res. 2009;205(1):38–44. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.06.022.

3. Demin KA, Kolesnikova TO, Khatsko SL et al. Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes. Neurotoxicol. Teratol. 2017;62:27–33. DOI: 10.1016/j.ntt.2017.04.002.

4. Bruera E, Strasser F, Shen L et al. The effect of donepezil on sedation and other symptoms in patients receiving opioids for cancer pain: a pilot study. J. Pain Symptom Manage. 2003;26(5):1049–54. DOI: 10.1016/s0885-3924(03)00332-4.

SUMMARY

EFFECTS OF ALLYLMORPHOLINE DERIVATIVES ON ZEBRAFISH BEHAVIOUR IN NOVEL TANK TEST

Prikhodko V.A., 2nd year graduate student, **Kan A.V.**, 5th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Five structurally different allylmorpholine derivatives have been shown to cause sedation in zebrafish (*Danio rerio*) in the Novel tank test.

Key words: *allylmorpholines, zebrafish, Danio rerio, behavioural testing, novel tank test, sedatives.*

REFERENCES

1. Chernov NM, Shutov RV, Barygin OI. et al. Synthesis of chromone-containing allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-type reaction. Eur. J. Org. Chem. 2018;2018(45):6304–6313. DOI: 10.1002/ejoc.201801159.

2. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. Behav. Brain Res. 2009;205(1):38–44. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.06.022.

3. Demin KA, Kolesnikova TO, Khatsko SL et al. Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes. Neurotoxicol. Teratol. 2017;62:27–33. DOI: 10.1016/j.ntt.2017.04.002.

4. Bruera E, Strasser F, Shen L et al. The effect of donepezil on sedation and other symptoms in patients receiving opioids for cancer pain: a pilot study. J. Pain Symptom Manage. 2003;26(5):1049–54. DOI: 10.1016/s0885-3924(03)00332-4.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В КЛЕТКАХ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ПАКЛИТАКСЕЛУ

Романова А.А., асп. 1 года обучения, **Сагайдак А.А.**, асп. 2 года обучения
Руководитель: **Григорьева Т.А.**, канд. хим. наук., ст. научный сотр.
Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
НИЛ «Молекулярная фармакология»
190013, Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26, Российская Федерация
E-mail: romangelina25@gmail.com

Проведено исследование взаимосвязи резистентности опухолевых клеток линии HCT116 к цитостатическому препарату паклитакселу с уровнями экспрессии генов ABC-транспортеров (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2*) и регулятора клеточного цикла (*CDKN1A*).

Изучена чувствительность клеток к паклитакселу путем оценки жизнеспособности и роста клеток под воздействием исследуемого препарата.

С помощью ОТ-ПЦР в реальном времени показано, что снижение чувствительности опухолевых клеток к паклитакселу связано с развитием ABC-опосредованной лекарственной устойчивости. Уровень экспрессии гена *ABCG2* значи-

тельно превышал уровень других генов; что позволяет предположить его ключевую роль в развитии резистентности к паклитакселу в клетках аденокарциномы толстой кишки человека.

Ключевые слова: *множественная лекарственная устойчивость, ABC-транспортеры, p53, остановка клеточного цикла.*

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – одна из основных причин низкой эффективности химиотерапии у онкологических больных. Чаще всего в ее развитии участвуют белки – представители семейства ABC-транспортеров: MDR1 (*ABCB1*), MRP1 (*ABCC1*), BCRP (*ABCG2*) [1]. Другим механизмом является нарушение баланса про- и антиапоптотических белков, в частности изменение транскрипционной активности антионкогенного белка p53, регулирующего запуск программируемой клеточной гибели опухолевой клетки путем активации таких генов-мишеней, как регулятор клеточного цикла p21 (*CDKN1A*) [2].

В настоящем исследовании мы изучали устойчивые к цитостатическому препарату паклитакселу линии раковых клеток, чтобы оценить вклад в формирование химиорезистентности белка p21, ответственного за остановку клеточного цикла, и ABC-транспортеров, регулирующих эффлюкс многих лекарственных препаратов из клетки.

Для достижения поставленной цели сформулировали следующие задачи:

1. Вывести клеточные линии, резистентные к паклитакселу в различных концентрациях (0.06, 0.24 и 0.48 мкмоль/л);
2. Количественно оценить транспортную активность по уровню накопления красителя Hoechst33342 в клетках;
3. Идентифицировать профиль экспрессии генов, соответствующий химиорезистентному фенотипу.

Клетки рака толстой кишки человека HCT116 культивировали в среде DMEM (ThermoFisher Scientific, США) с добавлением смеси антибиотиков (пенициллин 50000 ед/фл и стрептомицин 50 мг/фл), 150 мг L-глутамина и 10% эмбриональной бычьей сывороткой при 37°C в CO_2-инкубаторе. Для получения резистентных линий клетки HCT116 рутинно культивировали в присутствии паклитаксела (MedChemExpress, США), постепенно повышая концентрацию препарата. Для экспериментов использовали линии, резистентные к препарату в концентрациях 0.06 мкмоль/л, 0.24 мкмоль/л и 0.45 мкмоль/л.

Изменение транспортной активности устанавливали с помощью планшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) и системы высокосодержательного анализа Operetta CLS (PerkinElmer Inc., США) (фильтры: brightfield (excit./emmis. – transmission/650-760 нм), используя краситель Hoechst33342 (Invitrogen, США) (excit./emmis. – 360-400 нм/410-480 нм). Измерение флуоресценции на планшетном ридере осуществляли в двух режимах – фиксирование центрального участка лунки, фиксирование участка лунки по окружности [3]. Интенсивности свечения резистентых клеток относили к свечению материнской линии HCT116wt.

Для определения уровней экспрессии мРНК генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* и *CDKN1A* проводили полимеразные цепные реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ).

Экстракцию суммарной РНК исследуемых линий проводили с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США). Синтез комплементарной ДНК (кДНК) осуществляли согласно протоколу, прилагаемому к набору для постановки реакции обратной транскрипции «MMLV RT kit» (Евроген, Россия). В реакционную смесь (20 мкл) вносили 1 мкг РНК.

ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 Touch Real-Time RCR Detection System (Bio-Rad, США) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). ПЦР смесь (25 мкл) включала 0.8 мкл матрицы, 1x смесь для ПЦР в реальном времени и 1 мкл каждого праймера.

Количественную оценку экспрессии исследуемых генов получали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta CT}$, относительно экспрессии референсного гена *GAPDH* [4].

Используемые праймеры:

GAPDH (F:GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT, R:TTGAGGTCAATGAAGGGGTCA);
CDKN1A (F:TGTCCGTCAGAACCCATGC, R:AGTCGAAGTTCCATCGCTC);
ABCB1 (F: GGGAGCTTAACACCCGACTTA, R: GCCAAATCACAAGGGTTAGCTT);
ABCC1 (F: TCAGGAGCACACGAAAGTCC, R: AAGAAGCTCATGGGTGACCG);
ABCG2 (F: AAGCCACAGAGATCATAGAGCC, R: TCTTCTTCTCACCCCCGGAA).

В ходе работы выявлена корреляция между концентрацией паклитаксела, используемой при выведении линии, и уровнем поглощения флуоресцентного красителя. Представленные на рисунке данные подтверждают снижение накопления красителя в клетке из-за развития резистентности клеток.

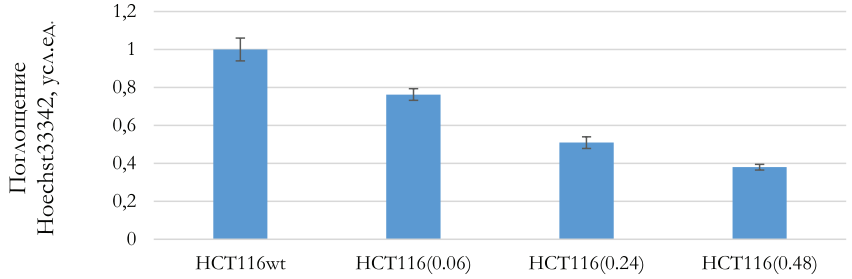


Рисунок. Зависимость поглощения Hoechst33342 клетками HCT116 от концентрации паклитаксела, используемого при рутинном культивировании

Во всех изученных нами линиях клеток, устойчивых к препарату, мы наблюдали повышенные уровни транскриптов *ABCB*1 и *ABCG2*, при этом их соотношение (1:2) сохранялось при всех исследуемых концентрациях паклитаклела.

Данные по экспрессии гена *CDKN1A* позволили сделать вывод о том, что транскрипционная активность белка p53 в созданных условиях изменяется незначительно и не влияет на формирование резистентности к паклитакселу.

В ходе работы выведены линии клеток HCT116, резистентные к паклитакселу в концентрациях 0.06, 0.24 и 0.48 мкмоль/л. В полученных клетках также подтверждено снижение накопления красителя.

В резистентных клеточных линиях отмечена сверхэкспрессия *ABCG2* и в меньшей степени *ABCB1*, при этом существенных изменений в экспрессии *ABCC1* и *CDKN1A* не отмечено.

Таким образом, в результаты работы получены новые клеточные линии, химиорезистентность которых обусловлена активацией эффлюкса.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-73-10150).

ЛИТЕРАТУРА

1. Grigoreva T, Romanova A, Sagaidak A, Vorona S, Novikova D, Tribulovich V. Mdm2 inhibitors as a platform for the design of P-glycoprotein inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters [Internet]. Elsevier BV. 2020;30 (18):127424. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127424

2. Шувалов ОЮ, Федорова ОА, Петухов АВ и др. Негативные регуляторы онкосупрессора p53 в контексте направленной противоопухолевой терапии. Цитология. 2015;57(12):847-854.

3. Müller H, Klinkhammer W, Globisch C, Kassack MU, Pajeva IK, Wiese M. New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342. Bioorganic & Medicinal Chemistry [Internet]. Elsevier BV. 2007;15(23):7470–7479. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.07.024

4. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature Protocols [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2006;1(3):1559–1582. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.236

SUMMARY

ABC TRANSPORTER GENES EXPRESSION IN CELLS RESISTANT TO PACLITAXEL

Romanova A.A., P.G. 1st year student; **Sagaidak A.A.**, P.G. 2nd year student
St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Research Laboratory "Molecular Pharmacology"
190013, St. Petersburg, Moskovsky pr., 26, Russian Federation

A study was conducted on the relationship between the resistance of HCT116 tumor cells to the cytostatic drug paclitaxel with the levels of gene expression for ABC transporters (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2*) and the cell cycle regulator (*CDKN1A*). The sensitivity of cells to paclitaxel was studied by assessing the viability and growth of cells under the influence of the studied drug. Real-time PCR has shown that a decrease in the sensitivity of tumor cells to paclitaxel is associated with the development of ABC-mediated drug resistance. The level of expression of the *ABCG2* gene was significantly higher than the level of other genes; it can be assumed that it plays a key role in the development of paclitaxel resistance in human colon adenocarcinoma cells.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 19-73-10150).

Key words: *multidrug resistance, ABC transporters, p53, cell cycle arrest, paclitaxel.*

REFERENCES

1. Grigoreva T, Romanova A, Sagaidak A, Vorona S, Novikova D, Tribulovich V. Mdm2 inhibitors as a platform for the design of P-glycoprotein inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters [Internet]. Elsevier BV. 2020;30 (18):127424. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127424

2. Shuvalov O, Fedorova O, Petukhov A et al. Negative regulators of tumor suppressor p53 in the context of anticancer therapy. Cytology. 2015;57(12):847-854. (In Russ)

3. Müller H, Klinkhammer W, Globisch C, Kassack MU, Pajeva IK, Wiese M. New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342. Bioorganic & Medicinal Chemistry [Internet]. Elsevier BV. 2007;15(23):7470–7479. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.07.024

4. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature Protocols [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2006;1(3):1559–1582. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.236

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА «ФИТОФРУФОЛ»

Сапаева Л.У., магистр 1 года обучения
Руководитель: **Муллажонова М.Т.**, канд. фарм. наук, доц., **Турсунова М.Х**., канд. мед. наук
Ташкентский фармацевтический институт,
100015, Ташкент, ул. Айбек, д. 45, Республика Узбекистан
e-mail: robiya1903@gmail.com

Изучена острая токсичность нового растительного сбора «ФИТОФРУФОЛ» в эксперименте на белых мышах. Результаты экспериментов показали, что настой сбора при однократном внутрижелудочном введении, приготовленного из расчёта 5 г:50 мл в дозах: 2000 мг/кг; 3000 мг/кг и 4000 мг/кг видимых изменений в поведении и функциональном состоянии животных не вызвал.

Ключевые слова: *растительный сбор «ФІТОФРУФОЛ», острая токсичность, белые беспородные мыши.*

«Фитофруфол» – иммуномодулирующий сбор – средство растительного происхождения, лечебные свойства которого обусловлены, входящими в его состав лекарственными средствами. Оказывает иммуномодулирующее действие.

Острую токсичность сбора «Фитофруфол» изучали общепринятым методом, описанным в литературе, однократным введением лекарственных препаратов с определением класса токсичности [1].

Вид и количество животных: для эксперимента использовали белых беспородных мышей самцов и самок, массой тела 19 – 21 г, выдержанных на карантине в течение 14 дней. До и в период экспериментов мыши находились в виварии при температуре воздуха +20 – 22ºС, влажности – не более 50%, объёме воздухообмена (вытяжка: приток) – 8:10, в световом режиме – день – ночь. Мышей размещали в стандартных пластиковых клетках и содержали на стандартном рационе. Приготовление водного раствора: из сбора «Фитофруфол» приготовили 10% водный настой, из расчёта 5г + 50 мл воды очищенной.

Проведение эксперимента: животных разделили на 3 группы по 6 голов, которым вводили водный настой сбора «Фитофруфол» следующим образом:

2 группа (6 мышей) – per os в дозе 2000 мг/кг (0,4 мл);

3 группа (6 мышей) – per os в дозе 3000 мг/кг (0,6 мл);

4 группа (6 мышей) – per os в дозе 4000 мг/кг (0,8 мл).

Введение большей дозы не представлялось возможным, поскольку согласно литературным данным, объём вводимой жидкости в желудок мышей, массой тела 20 – 25г не должен превышать 0,6 мл.

За мышами всех групп наблюдали ежечасно в течение первого дня эксперимента в условиях лаборатории, при этом в качестве показателей функционального состояния животных использовали выживаемость в течение опыта, общее состояние, возможные судороги и гибель. Со второго дня наблюдение вели ежедневно, в течение 2-х недель в условиях вивария, при этом, вели наблюдение за общим состоянием и активностью, особенностями поведения, реакцией на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частотой и глубиной дыхательных движений, ритмом сердечных сокращений, состоянием волосяного и кожного покрова, положением хвоста, количеством и консистенцией фекальных масс, частотой мочеиспускания, изменением массы тела и др. показателями. Все подопытные животные содержались в одинаковых условиях и на общем рационе питания со свободным доступом к воде и пище [2,3].

После завершения эксперимента определяли LD_{50} и класс токсичности препарата.

Проведенные опыты показали, что после однократного внутрижелудочного введения водного настоя сбора «Фитофруфол», приготовленного из расчёта 5г + 50 мл воды в объёмах 0,4мл; 0,6мл и 0,8 мл в поведении и функциональном состоянии животных видимых изменений не наблюдалось.

Результаты анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Определение острой токсичности иммуномоделирующего сбора «Фитофруфол» (LD_{50})

№ гуппы жив-ных	Доза		Путь введения	Результат
	мг/кг	Мл		
1	2000	0,4	Per os	0/6
2	3000	0,6	Per os	0/6
3	4000	0,8	Per os	0/6
LD_{50}	>4000 мг/кг			

При введении настоя в объёме 0,8 мл у животных наблюдалась временная слабость и малоподвижность, которая объясняется переполнением желудка. Гибели животных во всех группах ни в первые сутки, ни в последующие дни не наблюдалось. Согласно классификации токсичности веществ исследуемый сбор «Фитофруфол» относится к V классу токсичности – практически нетоксичные.

Таким образом, изучение острой токсичности лекарственного средства «Фитофруфол»-иммуномодулирующий сбор, показало что при однократном внутрижелудочном введении настоя препарата, приготовленного из расчёта 5 г : 50 мл в дозах: 2000 мг/кг; 3000 мг/кг и 4000 мг/кг видимых изменений в поведении и функциональном состоянии животных не вызвал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький МЛ. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1963: 81-90.
2. Гуськова ТА. Токсикология лекарственных средств. Москва, 2008: 27-30.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора РУ. ХАБРИЕВА. Издание второе, переработанное и дополненное. М: ОАО «Издательство «Медицина», 2005: 41-45.

SUMMARY

THE STUDY OF ACUTE TOXICITY OF THE NEW HREBAL COLLECTION «FITOFRUFOL»

Sapaeva L.U., 1nd year student of master degree
Tashkent Pharmaceutical Institute;
45 Oybek street, Tashkent, 100015, Republic of Uzbekistan

There was studied the acute toxicity of the new herbal collection «FITOFRUFOL» at five dose levels. It was showed that the infusion of collection with a single intragastric administration of the drug infusion, prepared at the rate of 5 g: 50 ml in doses: 2000 mg / kg; 3000 mg / kg and 4000 mg / kg did not cause visible changes in the behavior and functional state of the animals.

Key words: *herbal collection "FITOFRUFOL", acute toxicity, white autologous mice.*

REFERENCES

1. Belenky ML. Elements of a quantitative assessment of the pharmacological effect. Leningrad, 1963: 81-90. (In Russ)
2. Guskova TA. Drug toxicology. Moscow, 2008: 27-30. (In Russ)
3. Guidelines for the experimental study of the immunotropic activity of pharmacological substances/In the Manual for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances Edited by Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences, Professor RU. Khabriev. Second edition, revised and enlarged. Moscow: JSC "Medicine" Publishing House, 2005: 501-515. (In Russ)

ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ НОВОГО ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО АНАЛОГА ТИМОГЕНА В УСЛОВИЯХ КОЖНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Смахтина А.М., студ. 4 курса, **Чуланова А.А.**, асп. 3 года обучения
Руководители: **Маль Г.С.**, докт. мед. наук, проф., **Смахтин М.Ю.**, докт. биол. наук, проф.
Курский государственный медицинский университет,
305041, Курск, ул. Карла Маркса, д. 3, Российская Федерация
E-mail: smaxtina2012@yandex.ru

В статье рассмотрены иммунотропные эффекты нового аналога тимогена, модифицированного D-Ala с С-конца молекулы, и указана перспективность дальнейшего выявления его эффектов. У пептида H2N-L-Glu-L-Trp-D-Ala-COOH по сравнению с тимогеном (H2N-L-Glu-L-Trp-COOH) не наблюдалось снижения активности в отношении исследованных показателей фагоцитоза нейтрофилов крови (фагоцитарный индекс и число, завершенность фагоцитоза) и отмечалось более выраженное действие нового аналога в отношении кислородзависимых механизмов защиты нейтрофилов, оцениваемых по уровню НСТ-теста.

Ключевые слова: *тимоген, аналог тимогена, кожные раны, функция нейтрофилов, фагоцитарный индекс, фагоцитарное число, НСТ-тест.*

Травматизм распространен как среди взрослого, так и среди детского населения и нередко приводит к инвалидности. Скорость ранозаживления зависит от состояния иммунитета организма и прежде всего от активности нейтрофилов. В настоящее время, реальным является синтез биорегуляторов пептидной природы, многие из которых обладают высокой активностью в отношении регенерации поврежденных тканей. Лекарственные препараты пептидной природы уже активно используются в клинической практике [1]. Так, широко известен такой фармакологический препарат как тимоген – дипептид, состоящий из L-конфигураций глутаминовой кислоты и триптофана и оказывающий иммуномодулирующее действие. Дальнейшее выявление эффектов новых аналогов этого пептида представляется актуальным.

Цель исследования – выявление иммунотропных эффектов нового аналога тимогена, модифицированного D-аланином с С-конца молекулы, в условиях экспериментальной травмы кожи.

В эксперимент было включено 70 крыс Вистар, у которых под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг массы тела) моделировалось кожное повреждение на холке стандартного размера 1 см^2 [1]. Исследование длилось 10 дней. На протяжении этого промежутка времени животным вводились пептиды: доза тимогена (производитель – фирма МБНПК «Цитомед» ЗАО, Россия) составила 1 мкг/кг массы тела экспериментального животного, а разовая доза его аналога, который был синтезирован в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета, составляла 1,2 мкг/кг и была эквимолярной дозе тимогена. Пептиды вводились сразу после нанесения кожной раны. Крысы из группы контроля получали физиологический раствор в эквивалентном объеме.

После инкубации крови с латексом готовили мазки, окрашивали их по Романовскому и определяли фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ) и завершенность фагоцитоза. В каждом мазке подсчитывали 100 нейтрофилов [2].

На аппарате Multiscan MC 400 (Финляндия) проводили НСТ-тест, с использованием нитросинего тетразолия (НСТ), для изучения кислородзависимой активности нейтрофилов. В качестве иммуностимулятора использовался зимозан [3].

а. Результаты исследования статистически обрабатывались с помощью программы STATISTICA 6.0 (StatSoftInc.). Достоверность различий между группами оценивали по расхождению границ доверительных интервалов и при помощи критерия Манна-Уитни.

Работа выполнена в соответствии с принципами этики и гуманности, опубликованными в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации.

В ходе исследования было установлено, что в условиях экспериментадьной травмы кожи ни тимоген, ни его аналог с общей формулой H2N-L-Glu-L-Trp-D-Ala-COOH достоверно не влияли на ФИ (таблица 1).

Таблица – Эффекты тимогена и его аналога на поглотительную и кислородзависимую активность нейтрофилов

Условия опыта	ФЧ, абс.	ФИ, %	НСТ-тест, оп.
Контроль (NaCl)	4,53±0,43	67,1±3,8	0,22±0,015
Тимоген	6,55±0,9^{*1}	67,9±2,9	0,24±0,023
Аналог тимогена	5,7±0,55^{*1}	69,6±2,5	0,29±0,009^{*1,2}

* – достоверность разницы при $p<0,05$, цифра рядом – номер группы сравнения

Наблюдалось достоверное повышение ФЧ и процента завершенности фагоцитоза (рисунок 1) как при введении тимогена, так и при введении его аналога, то есть пептиды не увеличивали количество клеток, участвующих в фагоцитозе, но активировали фагоцитарную способность нейтрофилов, участвующих в поглощении чужеродных частиц ($p<0,05$). Эффекты пептидов на данные показатели были сопоставимы. В отношении кислородзависимых механизмов защиты нейтрофилов были выявлены существенные отличия эффектов: в этих условиях достоверного влияния тимогена на уровень НСТ-теста не было установлено, но его аналог обладал выраженным действием, достоверно повышая показатели кислородзависимой активности нейтрофилов.

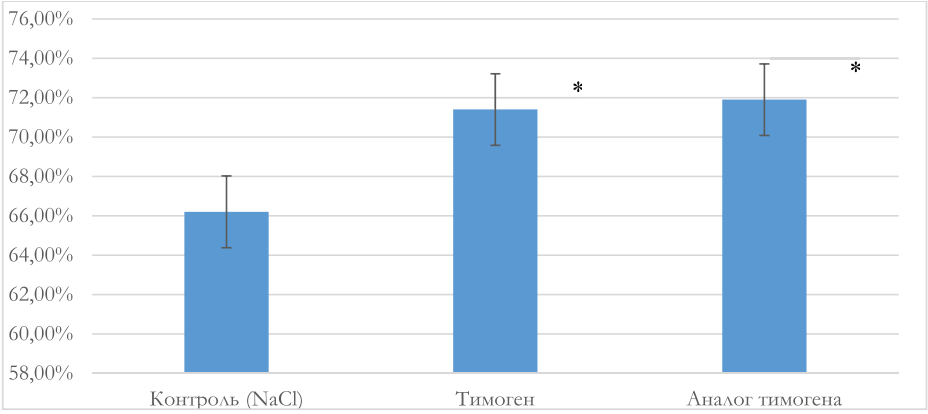


Рисунок. Влияние тимогена и его аналога на завершенность фагоцитоза при внутрибрюшинном введении в условиях кожного повреждения

Проведенное исследование показало, что введение D-аланина в молекулу тимогена привело к повышению его иммустимулирующей (кислородзависимой) активности, по уровню НСТ-теста нейтрофилов крови. На поглотительную стадию фагоцитоза нейтрофилов (фагоцитарный индекс и число, завершенность фагоцитоза) оба препарата оказывали сопоставимое стимулирующее действие, что может быть использовано для повышения активности нейтрофилов при кожных повреждениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чердаков ВЮ, Смахтин МЮ, Дубровин ГМ, Бобынцев ИИ. Синергичное иммунотропное и репаративное действие тимогена, даларгина и регуляторного пептида GLY-HIS-LYS при экспериментальной травме кожи. Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье». 2013;1:38–42.

2. Курцева АА, Смахтин МЮ, Иванов АВ, Беседин АВ. Влияние аминокислот, составляющих пептид глицил-гистидил-лизин, на регенерацию кожных ран и функцию нейтрофилов. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2008;3:5–10.

3. Зинкин ВЮ, Годков МА. Способ количественной оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов человека. Клиническая лабораторная диагностика. 2004;8:26–29.

SUMMARY

IMMUNOTROPIC EFFECTS OF A NEW CHEMICALLY MODIFIED THYMOGEN ANALOGUE IN CONDITIONS OF SKIN INJURY

Smakhtina A.M., 4th year student, **Chulanova A.A.**, 3th year Ph.D. student
Kursk State Medical University; 3, st. Karl Marx, Kursk, 305041, Russian Federation

The article discusses the immunotropic effects of a new analogue of thymogen, modified with D-Ala from the C-terminus of the molecule, and indicates the prospects for further revealing its effects. The peptide H2N-L-Glu-L-Trp-D-Ala-COOH compared with thymogen (H2N-L-Glu-L-Trp-COOH) did not show a decrease in activity in relation to the studied parameters of phagocytosis of blood neutrophils (phagocytic index and number , completeness of phagocytosis) and a more pronounced effect of the new analogue was noted in relation to oxygen-dependent mechanisms of protection of neutrophils, assessed by the level of the NBT test.

Key words: *thymogen, thymogen analog, skin wounds, neutrophil function, phagocytic index, phagocytic number, NBT test.*

REFERENCES

1. Cherdakov VYu, Smakhtin MYu, Dubrovin GM, Bobyntsev II. Synergistic immunotropic and reparative effects of thymogen, dalargin and GLY-HIS-LYS regulatory peptide in experimental skin injury. Kursk Scientific and Practical Bulletin «Man and Health». 2013;1:38-42. (In Russ)

2. Kurtseva AA, Smakhtin MYu, Ivanov AV, Besedin AV. The effect of the amino acids that make up the glycyl-histidyl-lysine peptide on the regeneration of skin wounds and the function of neutrophils. Kursk scientific and practical bulletin «Man and his health». 2008;3:5-10. (In Russ)

3. Zinkin VYu, Godkov MA. Method for quantitative assessment of oxygen-dependent metabolism of human neutrophilic granulocytes. Clinical laboratory diagnostics. 2004;8:26-29. (In Russ)

ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ С ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ

Сухоруков А.А., студ. 4 курса
Руководитель: **Дубровский Я.А.**, с.н.с., и.о. директора НОЦ МКТ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: suhorukov.anton@pharminnotech.com

Был разработан электрофоретический метод, позволяющий разделять низкомолекулярные пептиды с последующей идентификацией молекул при помощи времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем.

Ключевые слова: *масс-спектрометрия, электроспрей, гель-электрофорез, дефенсины, низкомолекулярные пептиды.*

Биологически активные низкомолекулярные пептиды представляют собой полимеры, состоящие из, примерно, 50 аминокислотных последовательностей и образующие разнообразные группы соединений. К таким соединениям можно отнести как глутатион, состоящий из 3 аминокислот и выполняющий антиоксидантные функции, образуя аддукты [1], так и инсулин, являющийся важнейшим гормоном, регулирующий метаболизм человека. Инсулин человека представлен димером, состоящим из 21 и 30 аминокислотных остатков, масса человеческой молекулы составляет около 5800 Да. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) используется для разделения и контроля качества лекарственных веществ с инсулином, при этом для множества исследований интерес представляет разделение инсулина при помощи электрофореза в полиакриламидном геле. Наиболее распространенный метод – денатурирующий электрофорез с добавлением додецилсульфат натрия (SDS-PAGE) в трис-глициновой системе затруднителен для дифференциации пептидов с молекулярной массой ниже 10 кДа [2], представляется задача разделить пептиды иным электрофоретическим методом. На примере инсулина становится понятно, что низкомолекулярные пептиды трудно отделимы друг от друга.

Многие низкомолекулярные пептиды представляют исследовательский интерес в связи с перспективными свойствами молекул. Дефенсины являются катионными пептидами, проявляющие антибактериальные свойства, являясь частью иммунной системы многих организмов таких, как млекопитающие, насекомые, растения и грибы. Антимикробные полипептиды перспективны своим иммуномодулирующими и противоопухолевыми свойствами [3], а различные классы дефенсинов состоят из 30-35 аминокислотных остатков и могут отличаться последовательностью в несколько пептидов [4].

Таким образом становится актуальной проблема разделения и детекции компонентов, представляющие собой низкомолекулярные пептиды.

Объектом исследования служил фильтрат альфа дефенсинов крыс предоставленный сотрудниками НОЦ МКТ. Для разделения белковых молекул используются различные методы электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). SDS-PAGE не способен разделить близкие массы пептидов. Напротив, электрофорез в кислых условиях с добавлением мочевины (AU-PAGE) осуществляется при низком pH и разделяет белки в основном на основе их катионного заряда, тем самым позволяя лучше разделить пептиды, которые различаются лишь незначительно по размеру и массе молекул [3].

Гель для UA-PAGE готовился по следующей прописи: стоковый раствор акриламида 60%, N,N'метиленбисакриламид 1,5%, ледяная уксусная кислота (100%), персульфат аммония (ПСА) 10%, N,N,N',N'Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) 100%. Буфер для проб включал 3М мочевину в 5% уксусной кислоте с добавлением красителя метилового зеленого. Гель-электрофорез проводился 40 минут под напряжением 200 V в электрофоретической ячейке Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad. В качестве буфера использовалась 5% уксусная кислота. Преэлектрофорез проводился в течение 40 минут.

Окрашивание геля для визуализации электрофореграммы проводилось в растворе Кумасси (CBB R-250) в течение 20-30 минут. Остаток геля отмывался в 5% уксусной кислоте.

В результате электрофореза были обнаружены две интенсивные белковые полосы, которые могут соответствовать искомым дефенсинам.

Процесс пробоподготовки включал этапы [5], представленные на рисунке 1:

1. Вырезание полос геля. Каждая полоса помещалась в отдельный эппендорф;
2. Обесцвечивание оставшегося визуализационного пятна. Обесцвечивание проводилось 5 % уксусной кислотой при интенсивном встряхивании в три этапа;
3. Удаление обесцвечивающего раствора, измельчение геля;
4. Добавление экстрагента. Состав экстрагента: 0,1% муравьиная кислота и 50% ацетонитрил. Объём экстрагента составил 200 мкл;
5. **Экстракция при интенсивном встряхивании на** высокоскоростном шейкере для малых объемов **BioSan MPS-1 в течение 3-4 часов;**
6. Внесение экстракта в виалу для ВЭЖХ-МС.

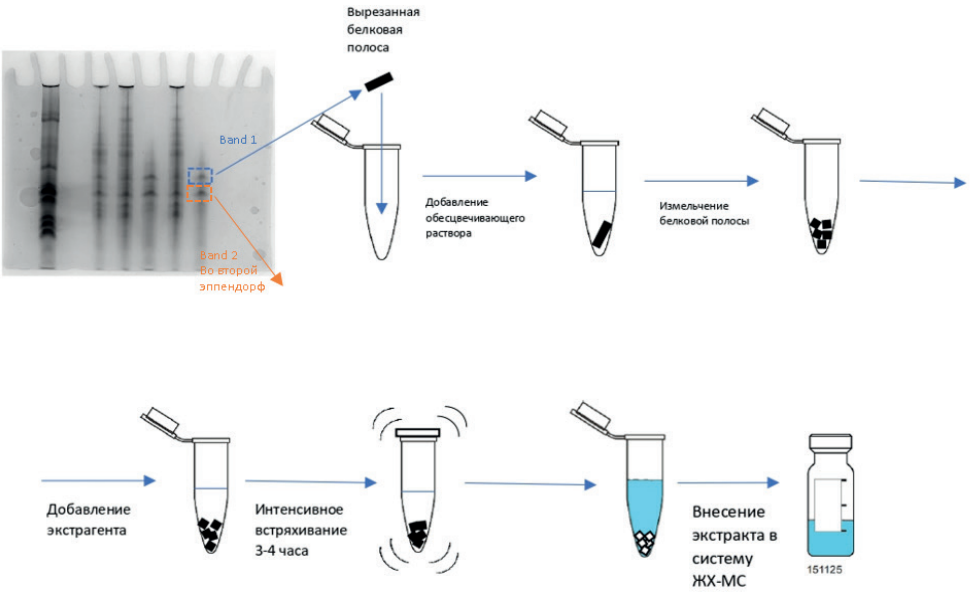


Рисунок. SEQ Рисунок * ARABIC 1 Схема обесцвечивания и экстракции белковых полос геля

Виала помещалась в жидкостной хроматограф Bruker Elute (UHPLC), подсоединённый к квадрупольно-времяпролетному масс-спектрометру с ионизацией электроспреем Bruker maxis impact. Время хроматографии одного образца составило 6 минут.

Из полученных хроматограмм, производилась экстракция интересующих масс пептидов, соответствующих различным зарядным состояниям молекулы (отношение массы к заряду). Информация об аминокислотных последовательностях была получены из базы данных UniProt, а также исследовательских работ [4]. Данные по дефенсинам представлены в таблице.

Таблица 1 – Установленные аминокислотные последовательности альфа дефенсинов

Обозначение дефенсина	Уникальный код UniProt	Мнемонический идентификатор записи UniProt	Аминокислотная последовательность	Брутто-формула	Количество дисульфидных связей	Моноизотопная нейтральная масса Да
RtNP-1*			TCYCRST RCGFRERLSG ACGYRGRIYR LCCR	C150H240N55O41S6	3	3659.671003

RtNP-2	Q62715	DEF2_RAT	VTCYCRST RCGFRERLSG ACGYRGRIYR LCCR	C155H249N56O42S6	3	3758.739417
RtNP-3	Q9Z1F1	DEF3B_RAT	CSCRTSSCRFGE RLSGACRLNG RIYRLCC	C130H215N48O39S6	3	3264.464030
RtNP-4	Q62714	DEF4_RAT	ACYCRIGA CVSGERLTGA CGLNGRIYRL CCR	C136H224N47O39S6	3	3331.531382
	Q62716	DEF1_RAT	VTCYCRRTRC GFRERLSGAC GYRGRIYRLCCR	C158H256N59O41S6	3	3827.808500
	P82106	DEF5_RAT	LRDLKCFCRRKSCNWGEGI MGICKKRYGSPILCCR	C174H285N56O44S7	3	4086.983019
	Q4JEI2	DFAL1_RAT	LRVRRTLQCSCRRVCRNTCS CIRLSRSTYAS	C145H256N57O43S5	2-3	3643.820110

Примечание: * – аминокислотная последовательность приведена в статье [4].

При помощи калькулятора масс Compass Isotope Pattern, пользуясь данными аминокислотных последовательностей были определены брутто-формулы каждого дефенсина, учитывая присутствие в молекуле дисульфидных связей.

Программное обеспечение масс-спектрометра позволило выделить сигналы, соответствующие возможным пептидам.

В качестве контроля, исходный фильтрат вводился в ЖХ-МС систему без электрофоретического разделения. Было установлено 2 типа дефенсинов RtNP-3 и RtNP-4 (рис. 2 а), другие типы дефенсинов не обнаружены, либо интенсивность сигнала на уровне шумов.

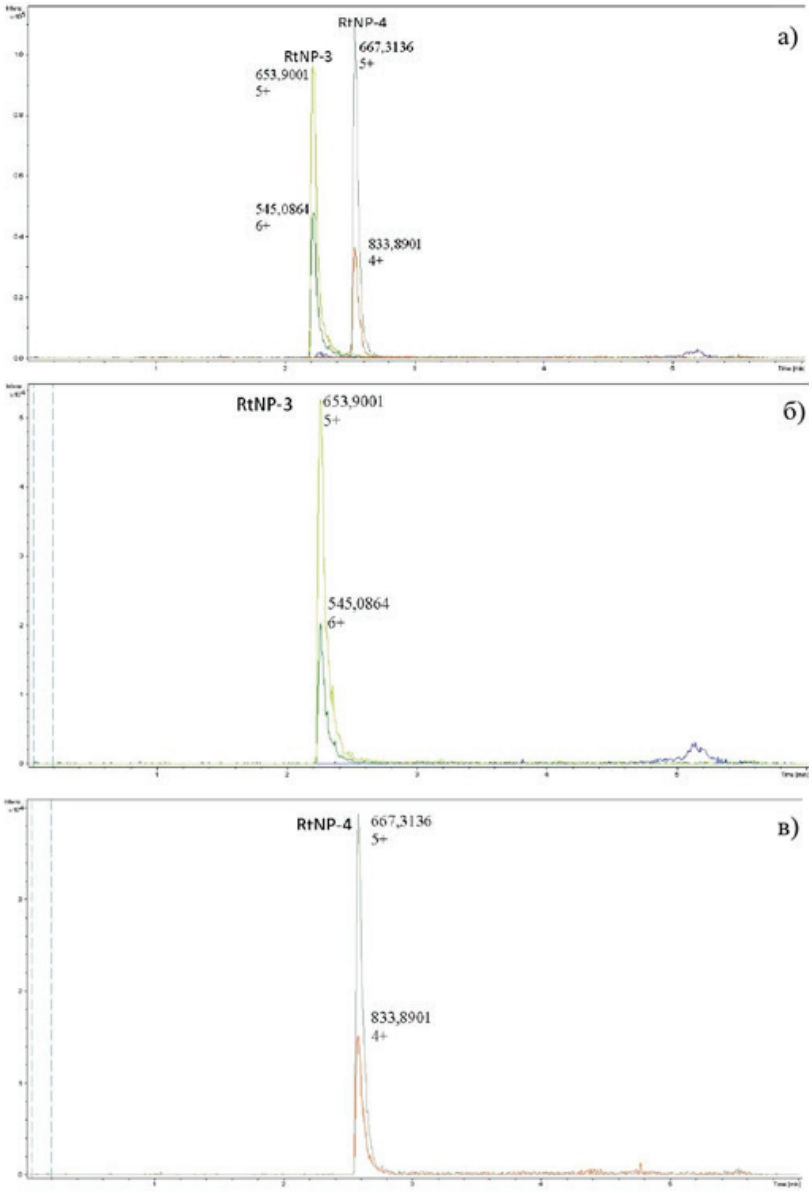


Рисунок 2. ЖХ-МС спектры, полученные экстракцией различных зарядных состояний дефенсинов.
а) Исходный фильтрат без электрофоретического разделения. Детектированы сигналы RtNP-3 и RtNP-4;
б) Полоса геля 2 с детектированным сигналом RtNP-3; в) Полоса геля 1 с детектированным сигналом RtNP-4

В результате анализа отдельно вырезанных полос из геля, установлено соответствие двух типов дефенсинов (рис. 3).

Полоса 2 соответствует дефенсину RtNP-3, время выхода хроматографического пика – 2,2 минуты, наиболее интенсивные сигналы принадлежат пяти и шестизарядному состоянию дефенсина (рис. 2 б). Иных дефенсинов в полосе геля не установлено.

Полоса 1 соответствует дефенсину RtNP-4, время выхода хроматографического пика составило 2,5 минуты, наиболее интенсивные сигналы принадлежат четырёх и пяти зарядному состоянию дефенсина (рис. 2 в). Иных дефенсинов в полосе геля не установлено.

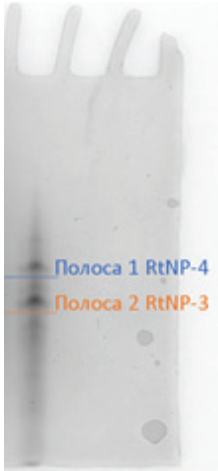


Рисунок 3. Электрофореграмма фильтрата дефенсинов крыс.
Установлено, что полоса 1 соответствует дефенсину RtNP-4, полоса 2 соответствует дефенсину RtNP-3

На примере фильтрата дефенсинов крыс был разработан электрофоретический метод, позволяющий разделять низкомолекулярные пептиды с последующей идентификацией молекул при помощи времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blair I. Endogenous Glutathione Adducts. Current Drug Metabolism [Internet]. Bentham Science Publishers Ltd. 2006 Dec 1;7(8):853–72. Available at: http://dx.doi.org/10.2174/138920006779010601

2. Quan Chi & Prof. Kaixun Huang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Insulin, Analytical Letters. 2007;40(1):95-102, DOI: 10.1080/00032710600952432

3. Porter E, Valore EV, Anouseyan R, Salzman NH. Detection of Antimicrobial (Poly)Peptides with Acid Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis Followed by Western Immunoblot. Salmonella [Internet]. Springer New York. 2014 Sep 8;105–15. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1625-2_7

4. Eisenhauer PB, Harwig SS, Szklarek D, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. Infection and Immunity [Internet]. American Society for Microbiology. 1989;57(7):2021–7. Available at: http://dx.doi.org/10.1128/iai.57.7.2021-2027.1989

5. Cohen SL, Chait BT. Mass Spectrometry of Whole Proteins Eluted from Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis Gels. Analytical Biochemistry [Internet]. Elsevier BV. 1997 May;247(2):257–67. Available at: http://dx.doi.org/10.1006/abio.1997.2072

SUMMARY

GEL ELECTROPHORETIC SEPARATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT PEPTIDES WITH SUBSEQUENT MASS SPECTROMETRY.

Sukhorukov A.A., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

An electrophoretic method was developed that allows the separation of low molecular weight peptides with subsequent identification of molecules using time-of-flight mass spectrometry with electrospray ionization.

Key words: *mass spectrometry, electrospray, gel electrophoresis, defensins, low molecular weight peptides.*

REFERENCES

1. Blair I. Endogenous Glutathione Adducts. Current Drug Metabolism [Internet]. Bentham Science Publishers Ltd. 2006 Dec 1;7(8):853–72. Available at: http://dx.doi.org/10.2174/138920006779010601

2. Quan Chi & Prof. Kaixun Huang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Insulin, Analytical Letters. 2007;40(1):95-102, DOI: 10.1080/00032710600952432

3. Porter E, Valore EV, Anouseyan R, Salzman NH. Detection of Antimicrobial (Poly)Peptides with Acid Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis Followed by Western Immunoblot. Salmonella [Internet]. Springer New York. 2014 Sep 8;105–15. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1625-2_7

4. Eisenhauer PB, Harwig SS, Szklarek D, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. Infection and Immunity [Internet]. American Society for Microbiology. 1989;57(7):2021–7. Available at: http://dx.doi.org/10.1128/iai.57.7.2021-2027.1989

5. Cohen SL, Chait BT. Mass Spectrometry of Whole Proteins Eluted from Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis Gels. Analytical Biochemistry [Internet]. Elsevier BV. 1997 May;247(2):257–67. Available at: http://dx.doi.org/10.1006/abio.1997.2072

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ АТИВНОСТИ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ФУМАРОВОЙ КИСЛОТЫ

Усачева Д.В., студ. 4 курса, **Огородникова А.П.**, студ. 4 курса
Руководитель: **Анисимова Н.А.**, доц., канд. биол. наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: usacheva.diana@pharminnotech.com

Проведена первичная оценка потенциала гипогликемизирующего действия производных 2-этилтиобензимидазола. Получены данные о токсичности данных соединений.

Ключевые слова: *противодиабетические средства, бемитил фумарат, этомерзол фумарат, метформин, адреналиновая гипергликемия, пероральный глюкозотолерантный тест.*

Сахарный диабет – приоритетное неинфекционное заболевание[1]. У существующих противодиабетических средств немало побочных эффектов, необходим поиск новых средств. Производные 2-этилтиобензимидазола (2-ЭТБ) – синтетические адаптогены с широким спектром биологической активности[2], в том числе, гипогликемизирующей. Активность увеличивается при комбинации производных 2-ЭТБ и фумаровой кислоты, восстановливающей обмен веществ.

Цель работы: оценка возможной гипогликемической активности сложных эфиров производных 2-этилтиобензэмидазола и фумаровой кислоты, определение их острой токсичности.

Объекты исследования:2-этилтиобензимидазола фумарат (бемитил фумарат, БФ) и 5-этокси-2-этилтиобензимидазола фумарат (этомерзол фумарат, ЭФ).

Гипогликемическая активность определялась на 150 крысах-самцах на модели адреналиновой гипергликемии и пероральном глюкозотолерантном тесте (ПГТТ).В обоих случаях проводилось 3 отдельных серии эксперимента с дозами испытуемых веществ 10, 25, 50 мг/кг, препарат сравнения – метформин. Контрольная группа получала физиологический раствор.

Адреналиновая гипергликемии моделировалось введением адреналина в дозе 1 мг/кг подкожно. Испытуемые вещества и физиологический раствор вводили за 30 минут до введения адреналина. Определяли исходный уровень глюкозы в крови через 1, 2 ,3 часа после введения адреналина.

В ПГТТ измерение уровня глюкозы в крови проводилось натощак и через 30, 60, 90, 120 мин. после введения глюкозы в дозе 3 г/кг. Предварительно вводили испытуемые вещества.

Острую токсичность изучали на 16 мышах. Водные растворы препаратов вводились однократно натощак внутрижелудочно в дозе 1000,2000мг/кг. Уровень токсичности определяли экспресс-методом В. Б. Прозоровского[4].

В результате установлено, БФ и ЭФ оказывают дозозависимый гипогликемический эффект. На модели адреналиновой гипергликемии и в ПГТТ лучшие результаты получены при введении БФ и ЭФ в дозе 25 мг/кг..В условиях адреналиновой гипергликемии наиболее выраженный гипогликемический эффект проявил ЭФ. Уровень глюкозы в крови на его фоне по сравнению с контролем снизился на 24,6%,на БФ на 18%. В ПГТТ гипогликемический эффект веществ сопоставим с эффектом метформина (рис. 1). Через 2 часа после начала эксперимента уровень глюкозы в крови в контрольной группе, в группе метформина, БФ, ЭФ на 72,7%,10%, 7,7%, 21,6% соответственно ($P > 0,05$).

У веществ в дозе 10, 50 мг/кг гипогликемическая активность в условиях адреналиновой гипергликемии. ПГТТ снижалась.

Испытуемые вещества в дозе 2000 мг/кг не вызывали гибели животных – препараты малотоксичны.

Установлено наличие гипогликемических свойств у БФ и ЭФ, оптимальная доза 25 мг/кг.

При определении острой токсичности установлено, что БФ и ЭФ являются малотоксичными соединениями.

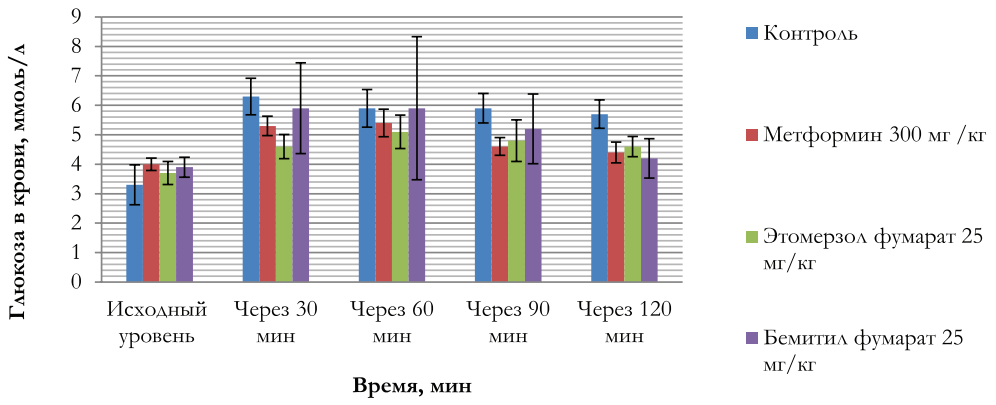


Рисунок 1. Изменение концентрации глюкозы в крови в ПГТТ в дозе 25 мг/кг

ЛИТЕРАТУРА

1. Chaudhury A et al. Clinical review of antidiabetic drugs: Implications for type 2 diabetes mellitus management. Frontiersinendocrinology. 2017;8:6-8.

2. Галенко-Ярошевский ПА, Чекман ИС, Горчакова НА. Очерки фармакологии средств метаболической терапии. М.: Медицина, 2001: 214.

3. Смирнов АВ. Бемитил: механизм действия и связанные с ним эффекты. Физиологически активные вещества. Киев. 1993;25: 5-9.

4. Прозоровский ВБ, Прозоровская МП, Демченко ВМ. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. Фармакология и токсикология. 1978;34(2):497-502.

SUMMARY

STUDY OF ACUTE TOXICITY AND HYPOGLYCEMIC ACTIVITY OF FUMARIC ACID ESTERS

Usacheva D.V., 4th year student, **Ogorodnikova A.P.**, 4th year student
St.Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St.,St.Petersburg, 197376, Russian Federation

A primary analysis of the hypoglycemic potential of 2-ethylthiobenzimidazole derivatives was performed. Information on the toxicity of these compounds has been established.

Key words: antidiabetic drugs, bemityl fumarate, etomerzol fumarate, metformin, epinephrine hyperglycemia, oral glucose tolerance test

REFERENCES

1. Choudhury A et al. Clinical review of antidiabetic drugs: Implications for type 2 diabetes mellitus management. Frontiers in endocrinology. 2017;8:6-8.

2. Galenko-Yaroshevsky PA, Chekman IS, Gorchakova NA. Essays on pharmacology of means of metabolic therapy. Moscow: Meditsina, 2001: 214. (In Russ)

3. Smirnov AV. Bemitil: mechanism of action and related effects. Physiologically active substances. Kiev. 1993;25:5-9. (In Russ)

4. Prozorovsky VB, Prozorovskaya MP, Demchenko VM. Express method for determining the average effective dose and its errors. Pharmacology and toxicology. 1978;34(2):497-502. (In Russ)

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

Шиц Д.Д., студ. 2 курса
Руководитель: **Кириллова Н.В.**, докт. биол. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: darya.shic@spcpu.ru

Цель данной статьи – обобщить данные, имеющиеся в литературе, для поиска наиболее эффективных мишеней фармакотерапии депрессивных расстройств. В работе приведен обзор, в ходе которого были проанализированы некото-

рые молекулярно- биологические механизмы, объясняющие развитие и патогенез депрессии, и сделан вывод по поводу их взаимовлияния. Также были рассмотрены некоторые современные методы фармакотерапии.

Ключевые слова: *депрессия, антидепрессанты, моноамины, BDNF, глюкокортикоиды, глутамат.*

В наше время, депрессивные расстройства являются серьезной проблемой общественного здравоохранения. По данным ВОЗ от них страдает около 350 миллионов человек, что делает депрессию одной из основных причин потери трудоспособности в мире. Основными проявлениями депрессивных расстройств являются потеря интереса к жизни, апатия, заторможенность, утрата социальных связей, суицидальные мысли и наклонности, что делает эти заболевания одной из причин инвалидности и основной причиной суицидов у больных во всем мире [1].

Сегодня на рынке представлено большое количество препаратов, облегчающих симптомы депрессии – антидепрессантов (АД). Механизм действия большинства из них основан на моноаминовой теории депрессии, т.е. увеличивает синаптическую доступность эндогенных моноаминов, таких как серотонин (5-HT), дофамин (DA) и норадреналин [2].

Несмотря на то, что данные антидепрессанты на протяжении долгих лет помогали человечеству справляться с проявлениями депрессивных расстройств, они могут быть не всегда эффективны. Многие больные оказываются резистентными к подобной фармакотерапии, а терапевтический эффект препаратов порой очень сильно отсрочен во времени. Также пациенты могут выходить в не долгосрочную ремиссию, по завершению которой депрессивная симптоматика возвращается.

Поэтому важной задачей является разработка новых потенциально эффективных препаратов для лечения депрессивных расстройств, но она невозможна без ясного понимания физиологических причин болезни.

Целью данной работы является обобщить и систематизировать имеющиеся в литературе данные для более подробного понимания патогенеза депрессии.

Патогенез депрессивных расстройств

Депрессия – это психологическое расстройство, которое характеризуется постоянно сниженным настроением (гипотимией), утратой способности получать удовольствие (ангедонией), негативным восприятием себя и окружающих и снижением двигательной активности [3]. Очень часто депрессивная симптоматика может сопровождать и другие заболевания, например, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), шизофрению.

Когнитивные дисфункции, такие как частичная утрата способности обрабатывать и запоминать информацию, нарушение концентрации, при депрессивных расстройствах могут свидетельствовать о биохимических и нейрофизиологических изменениях в ЦНС человека.

У больных отмечается снижение активности головного мозга и уменьшение его объема, в частности в таких структурах, как префронтальная кора, базальные ганглии и гиппокамп [4].

Моноаминовая теория возникновения депрессии

Первой гипотезой, выдвинутой еще в 50-х годах XX века и объясняющей процессы, происходящие в ЦНС больного депрессией, была моноаминовая теория. Согласно ей, депрессивная симптоматика является следствием нарушения метаболизма нейромедиаторов 5-HT, DA и норадреналина. В основу моноаминовой теории легли наблюдения о том, что препараты, повышающие количество моноаминов в синаптической щели, улучшают состояние пациентов, а препараты, понижающие количество нейромедиаторов, – ухудшают.

Как известно, серотонин является тормозящим нейромедиатором, тесно связанным с контролем болевой чувствительности и нейрогормональной регуляцией, а также оказывает влияние на эмоциональное состояние. При высоком уровне серотонина развивается так называемый “серотониновый синдром”, сопровождающийся повышением нервной и физической активности и галлюцинациями. Дофамин – нейромедиатор, играющий большую роль в когнитивной деятельности, вовлечен в патогенез таких нейродегенеративных заболеваний, как шизофрения и болезнь Паркинсона. Норадреналин участвует в контроле уровня бодрствования и процессах селективного внимания. Зная о влиянии этих нейромедиаторов на организм, можно предположить, что их недостаток вносит значительный вклад в формирование депрессивной симптоматики [5].

На нарушение обмена моноаминергических нейромедиаторов могут оказывать влияние такие факторы, как высокая активность моноаминоксидазы (МАО) или снижение числа постсинаптических рецепторов. На основании моноаминовой теории было разработано большое количество антидепрессантов, наиболее популярными из них являются антидепрессанты из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС), например циталопрам, флуоксетин, сертралин и многие другие. Механизм их действия – благодаря блокированию обратного захвата серотонина, повышается концентрация последнего в синаптической щели, за счет чего устраняются симптомы депрессии. Так же известны трициклические антидепрессанты (амитриптилин, кломипрамин, дибензепин) и ингибиторы МАО (ипрониазид, ниаламид) [2].

Минусами этой классической концепции являются отсроченный во времени эффект антидепрессантов, недостаточная эффективность препаратов и отсутствие точного объяснения причины дефицита моноаминов в ЦНС (непонятно, является это причиной заболевания или его следствием).

Нейропластичность. Влияние нейротрофического фактора на возможность развития депрессивной симптоматики

Нейропластичность – это особое свойство человеческого мозга изменяться: восстанавливать и реконструировать нейрональные связи. Еще совсем недавно считали, что структура мозга остается неизменной с момента ее полного формирова-

ния, но последние несколько десятилетий возрос интерес к такому понятию, как "нейрогенез". Нейрогенез – это сложный ступенчатый процесс, включающий в себя все этапы от трансформации нервных стволовых клеток до интеграции готовых нейронов. Нейрогенез – важная функция, участвующая в процессах обучения, памяти, изменения психических состояний, восстановления после травм и нейродегенеративных заболеваний, которая у здорового человека продолжается на протяжении всей жизни и регулируется сигнальными молекулами мозгового и периферического происхождения – нейромедиаторами, нейропептидами, половыми гормонами, гормонами коры надпочечников [6].

Оказалось, что у людей, находящихся в состоянии депрессии, процесс нейрогенеза подавлен, что приводит к снижению нейропластичности и проявлению когнитивной дисфункции. На основании этого была предложена гипотеза, согласно которой подавление нормального функционирования нейронных сетей является фактором, предшествующим развитию депрессивных расстройств [7]. С другой стороны, депрессия и сама может являться причиной когнитивных нарушений. Заболевание способно прогрессировать за счет изменений в структурах мозга, ответственных за регуляцию эмоций и когнитивных функций [8].

Одним из основных нейротрофических белков, участвующих в процессах нейропластичности, является нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Основными задачами BDNF в организме являются поддержание выживаемости нейронов, регуляция роста дендритов и аксонов, обеспечение синаптической пластичности и образование новых синапсов. При исследовании полиморфизма Val66Met гена BDNF экспериментально была выявлена тенденция к снижению частоты встречаемости гомозиготного фенотипа Met/Met и аллеля Met у пациентов, страдающих депрессивными расстройствами по сравнению со здоровыми людьми [9]. Проведенные исследования показали сниженное содержание BDNF в плазме и сыворотке крови у больных большим депрессивным расстройством (БДР) [10]. Вероятно, снижение синтеза этого белка может служить молекулярной основой нарушения нейропластичности и, как следствие, структурных изменений в головном мозге больных депрессией.

Кортикостероиды и стресс

За регуляцию уровня стресса в организме отвечает гипоталамо-гипофизарно- надпочечниковая (ГГН) ось. Механизм эндогенного ответа на стресс проявляется в увеличении продукции и секреции кортикостероидов. Последние же, проникая через гематоэнцефалический барьер, влияют на мозг посредством связывания с двумя типами рецепторов: глюкокортикоидными и минералокортикоидными. Этот механизм необходим для преодоления стрессовых ситуаций, однако при дисфункции ГГН могут возникать различные депрессивные расстройства у человека [11]. Решающую роль в дисфункции ГГН оси играют глюкокортикоидные рецепторы (GR) и FK506 связывающий белок 51 или FKBP5. FKBP5 функционирует как ко-шаперон, связываясь с головкой шаперона hsp90, он снижает чувствительность глюкокортикоидных рецепторов к кортикостероидам [12], в следствии чего человек продолжает испытывать стресс. Экспериментальные данные показывают, что длительное воздействие глюкокортикоидов так же способствует снижению выработки BDNF [13].

Роль глиальных клеток в процессе развития депрессивных расстройств

Нейроглия является важной функциональной тканью ЦНС. Существуют сведения о том, что глия моделирует нейрогенез в гиппокампе. Астроциты оказывают влияние на пролиферацию стволовых клеток, приверженность нейронному фенотипу и выживаемость. Было показано, что блокада высвобождения везикул из астроцитов ухудшает выживаемость нейронов и созревание дендритов за счет уменьшения ветвления дендритов и количества дендритных шипиков у новых нейронов [14].

Микроглия так же участвует в пролиферации и выживании нервных стволовых клеток за счет высвобождения нейротрофических факторов и противовоспалительных цитокинов. Ее роль заключается и в поглощении стволовых клеток и незрелых нейронов после их смерти. В качестве ответа на повреждение или заболевание микроглия продуцирует цитокины (такие как, интерлейкин (IL) – 1β, 1L-6 и фактор некроза опухоли – α (TNF – α)), которые способны нарушать продукцию новых нейронов и выживаемость этих клеток. Новые нейроны могут регулировать нейротоксические эффекты микроглии связыванием нейрального хемокина фракталина с микроглиальным рецептором Cx3cr1. Генетическое нарушение этого рецепторанижает способность организма к нейрогенезу, что подтверждает важность коммуникации микроглии и нейронов в регуляции данного процесса [14].

Астроциты так же отвечают за поглощение большей части внеклеточного глутамата через транспортеры глутамата, таким образом, сохраняя его внеклеточную концентрацию на низком уровне и предотвращая эксайтотоксичность. Известно, что в ГАМКергических нейронах под действием глутамат-декарбоксилазы из глутамата синтезируется гамма- аминомасляная кислота (ГАМК) [15]. Показателем этого цикла является соотношение глутамин/глутамат. Имеется данные о снижение соотношения глутамин/глутамат у больных большим депрессивным расстройством (БДР) [15]. При избыточном воздействии глутамата на NMDA-рецепторы происходит открытие кальциевых каналов, что способствует притоку ионов Ca^{2+} и Na^{+} в нейроны. С нарастанием уровня кальция изменяется активность внутриклеточных ферментов, что в дальнейшем приводит к разрушению мембран и деполяризации нейронов, которая инициирует механизм эксайтотоксичности посредством дальнейшего высвобождения возбуждающих нейромедиаторов [16]. Так же был выявлен повышенный уровень глутамата в сыворотке крови больных различными расстройствами шизофренического спектра и биполярным аффективным расстройством [17].

Цитокины, продуцируемые микроглией, способны влиять так же на ГГН ось. Они могут оказывать подавляющее действие на обратную отрицательную связь от гиппокампа к паравентрикулярному ядру гипоталамуса, вызывая усиленное выделение КТРФ, АТГК иглюкокортикоидов (кортизола у человека) [18]. В свою очередь, на гиперпродукцию цитокинов, возможно, влияет окислительный стресс [19].

Новые методы фармакотерапии депрессии

В настоящее время, активно обсуждается возможность использования кетамина в качестве быстродействующего антидепрессанта [20, 21]. Одним из возможных механизмов такого действия кетамина может быть его влияние на глутаматергическую систему, в частности на NMDA-рецепторы, и последующее усиление синаптической пластичности. Но минусом этого препарата является его диссоциативное действие. За рубежом ведется разработка лекарственных средств на основе производных кетамина и некоторые из них уже одобрены для применения в других странах (США) [22]. Для лечения депрессий, резистентных к фармакотерапии, применяется замена одного препарата на другой, совмещение нескольких препаратов, добавление лития [23].

Перспективным направлением является разработка лекарственных веществ, способных положительно влиять на нейропластичность, так как этот аспект патогенеза депрессии является самым пагубным и имеющим большие последствия для больного на протяжении многих лет даже после долгой ремиссии.

Таким образом, в настоящее время в качестве биомаркеров депрессивных расстройств могут быть использованы такие показатели, как повышенный уровень глюкокортикоидов, цитокинов, глутамата и пониженный уровень BDNFв сыворотке крови, плазме или ликворе больных.

Вероятнее всего, как показывают проведенные исследования, развитие депрессивной симптоматики происходит на фоне недостатка положительных эмоций, под влиянием постоянного стресса и при наличии других нейродегенеративных заболеваний, таких как БП, БА и шизофрения. В последнем случае депрессия может возникать как следствие уже существующего нейродегенеративного процесса. В первых двух случаях важнейшую роль играют такие факторы, как недостаток положительного подкрепления (дофамина), и в следствие, ухудшение когнитивных функций и гиперактивация ГГН оси, ввиду чего повышается уровень кортизола и понижается его способность связываться с GR рецепторами. Это приводит в нейровоспалительному процессу и выработке цитокинов, которые также оказывают негативное действие на ГГН ось, не позволяя организму нормально отреагировать на стресс. Понижается активность транспортеров глутамата, и, как следствие, повышается его эксайтотоксичность. Параллельно снижается синтез нейротрофических факторов, в частности BDNF, что существенно ослабляет нейрогенез. Уменьшается объем гиппокампа и нарушается его функционирование, например, нормальная выработка нейромедиаторов. Таким образом, запускается, так называемый, «порочный круг».

Однако, патогенез депрессии и его молекулярные, клеточные, иммунные механизмы все еще не изучены до конца, данные в литературе по этому вопросу очень разрознены, поэтому они требуют более подробного анализа для разработки эффективных методов фармакотерапии депрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирная организация здравоохранения. Доступно по: www.who.int/ru/

2. Табеева ГР, Вейн АМ. Фармакотерапия депрессии. Психиатрия и психофармакотерапия. 2000;(1).

3. МКБ 10. Расстройства настроения [аффективные расстройства] (F30-F39). Доступно по: https://mkb-10.com/index.php?pid=4193.

4. Lorenzetti V, et al. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: A selective review of recent MRI studies. Journal of Affective Disorders. 2009;117(1-2):1–17. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2008.11.021.

5. Ушакова ВМ, Морозова АЮ, Резник АМ, Костюк ГП, Чехонин ВП. Молекулярно- биологические аспекты депрессивных состояний: современный взгляд на проблему. Молекулярная биология [Internet]. The Russian Academy of Sciences; 2020;54(5):725–49. Доступно по: http://dx.doi.org/10.31857/s0026898420050110.

6. Белова АН, Балдова СН, Хрулев СЕ. Нейродегенеративные свойства хронической

Боли и депрессии. Современные проблемы науки и образования. 2013;3.

7. Поздеева ЕА. Гипотеза аффективных расстройств, основанная на нейропластичности. Новый взгляд на терапию депрессии. Психиатрия и психофармакотерапия им. П.Б. Ганнушкина. 2007;(1);49-58.

8. Вялова НМ, Левчук ЛА. Роль BDNF в формировании депрессивных расстройств. Фундаментальные исследования. 2014;10(4);771-775.

9. Шмиголь МВ, Левчук ЛА, Лебедева ЕВ и др. Исследование полиморфизма гена мозгового нейротрофического фактора у лиц с депрессивными и коморбидными сердечно-сосудистыми заболеваниями. Фундаментальные исследования. 2012;(5);388–392.

10. Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, et al. Serum and plasma BDNF levels in major depression: A replication study and meta-analyses. The World Journal of Biological Psychiatry [Internet]. Informa UK Limited. 2010 Mar 25;11(6):763–73. Available at: http://dx.doi.org/10.3109/15622971003611319.

11. Иванова СА, Лосенков ИС, Левчук ЛА и др. Депрессивные расстройства: гипотезы патогенеза и потенциальные биологические маркеры. Изд. СО РАН. 2018.

12. Binder EB. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. Psychoneuroendocrinology [Internet]. Elsevier BV. 2009 Dec;34:S186–S195. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.021.

13. Li J, Chen J, Ma N, Yan D, Wang Y, Zhao X, et al. Effects of corticosterone on the expression of mature brain-derived neurotrophic factor (mBDNF) and proBDNF in the hippocampal dentate gyrus. Behavioural Brain Research [Internet]. Elsevier BV. 2019 Jun;365:150–6. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.010.

14. Cope EC, Gould E. Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. Cell Stem Cell [Internet]. Elsevier BV. 2019 May;24(5):690–705. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.023.

15. Xu H, Zhang H, Zhang J, Huang Q, Shen Z, Wu R. Evaluation of neuron-glia integrity by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy: Implications for psychiatric disorders. Neuroscience & Biobehavioral Reviews [Internet]. Elsevier BV. 2016 Dec;71:563–77. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.027.

16. Бонь ЕИ, Максимович НЕ. Роль эксайтотоксичности в патогенезе повреждений головного мозга при ишемии. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2019;18(1);67-72.

17. Серёгин АА, Смирнова ЛП, Дмитриева ЕМ, и др. Глутамат в сыворотке крови больных расстройствами шизофренического спектра и биполярным аффективным расстройством. Психиатрия. 2020;18(3);22–31. Доступно по: https://doi.org/10.30629/2618-6667-2020-18-3-22-31.

18. Григорьян ГА, Дыгало НН, Гехт АБ и др. Молекулярно-клеточные механизмы депрессии. Роль глюкокортикоидов, цитокинов, нейротрансмиттеров и трофических факторов в генезе депрессивных расстройств. Успехи физиологических наук. 2014;45(2);3–19.

19. Дубинина ЕЕ, Щедрина ЛВ, Мазо ГЭ. Основные биохимические аспекты патогенеза депрессии. Часть 1. Успехи физиологических наук. 2018;49(2);28-49.

20. Мосолов СН, Федорова ЕЮ. Новый взгляд на патогенез депрессии: возможно ли появление быстродействующих антидепрессантов? Современная терапия психических расстройств. 2020;(3):2–10. Доступно по: 10.21265/PSYPH.2020.79.58.001.

21. Duman RS, Li N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences [Internet]. The Royal Society. 2012 Sep 5;367(1601):2475–84. Available at: http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0357.

Daily Med. Label: Spravato – esketamine hydrochloride solution. Available at: https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=d81a6a79-a74a-44b7-822c- 0dfa3036eaed

22. Быков ЮВ. Резистентные к терапии депрессии. Ставрополь. 2009

SUMMARY

MOLECULAR-BIOLOGICAL ASPECTS OF PATHOGENESIS OF DEPRESSIVEDISORDERS

Shic D.D., 2th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The purpose of this article is to summarize the data available in the literature in order to find the most effective targets for the pharmacotherapy of depressive disorders. The paper provides a review, in which analyzed some molecular-biological mechanisms that explain the development and pathogenesis of depression and concluded about their interaction. Also, some modern methods of pharmacotherapy were considered.

Key words: *depression, antidepressants, monoamines, BDNF, glucocorticoids, glutamate.*

REFERENSES

1. World Health Organization. Available at: www.who.int/ru (In Russ)

2. Tabeyeva GR, Veyn AM. Farmakoterapiya depressii. Psikhiatriya i psikhofarmakoterapiya. 2000;(1). (In Russ)

3. MKB 10. Rasstroystva nastroyeniya [affektivnyye rasstroystva] (F30-F39). Available at: https://mkb-10.com/index.php?pid=4193 (In Russ)

4. Lorenzetti V, et al. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: A selective review of recent MRI studies. Journal of Affective Disorders. 2009;117(1-2):1–17. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2008.11.021.

5. Ushakova VM, Morozova AY, Reznik AM, Kostyuk GP, Chekhonin VP. Molekulyarno- biologicheskiye aspekty depressivnykh sostoyaniy: sovremennyy vzglyad na problemu. Molekulyarnaya biologiya [Internet]. The Russian Academy of Sciences; 2020;54(5):725–49. Available at: http://dx.doi.org/10.31857/s0026898420050110. (In Russ)

6. Belova AN, Baldova SN, Khrulev SE. Neyrodegenerativnyye svoystva khronicheskoy boli i depressii. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya. 2013;3. (In Russ)

7. Pozdeyeva EA. Gipoteza affektivnykh rasstroystv, osnovannaya na neyroplastichnosti. Novyy vzglyad na terapiyu depressii. Psikhiatriya i psikhofarmakoterapiya im. P.B. Gannushkina. 2007;(1);49-58. (In Russ)

8. Vyalova NM, Levchuk LA. Rol' BDNF v formirovanii depressivnykh rasstroystv. Fundamental'nyye issledovaniya. 2014;10(4);771-775. (In Russ)

9. Shmigol' MV, Levchuk LA, Lebedeva YEV et al. Issledovaniye polimorfizma gena mozgovogo neyrotroficheskogo faktora u lits s depressivnymi i komorbidnymi serdechno- sosudistymi zabolevaniyami. Fundamental'nyye issledovaniya. 2012;(5);388–392. (In Russ)

10. Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, et al. Serum and plasma BDNF levels in major depression: A replication study and meta-analyses. The World Journal of Biological Psychiatry [Internet]. Informa UK Limited. 2010 Mar 25;11(6):763–73. Available at: http://dx.doi.org/10.3109/15622971003611319.

11. Ivanova SA, Losenkov IS, Levchuk LA et al. Depressivnyye rasstroystva: gipotezy patogeneza i potentsial'nyye biologicheskiye markery. Izd. SO RAN. 2018. (In Russ)

12. Binder EB. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. Psychoneuroendocrinology [Internet]. Elsevier BV. 2009 Dec;34:S186–S195. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.021.

13. Li J, Chen J, Ma N, Yan D, Wang Y, Zhao X, et al. Effects of corticosterone on the expression of mature brain-derived neurotrophic factor (mBDNF) and proBDNF in the hippocampal dentate gyrus. Behavioural Brain Research [Internet]. Elsevier BV. 2019 Jun;365:150–6. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.010.

14. Cope EC, Gould E. Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. Cell Stem Cell [Internet]. Elsevier BV. 2019 May;24(5):690–705. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.023.

15. Xu H, Zhang H, Zhang J, Huang Q, Shen Z, Wu R. Evaluation of neuron-glia integrity by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy: Implications for psychiatric disorders. Neuroscience & Biobehavioral Reviews [Internet]. Elsevier BV. 2016 Dec;71:563–77. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.027.

16. Bon' EI., Maksimovich NE. Rol' eksaytotoksichnosti v patogeneze povrezhdeniy golovnogo mozga pri ishemii. Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii. 2019;18(1);67-72.

17. Serogin AA, Smirnova LP, Dmitriyeva EM et al. Glutamat v syvorotke krovi bol'nykh rasstroystvami shizofrenicheskogo spektra i bipolyarnym affektivnym rasstroystvom. Psikhiatriya. 2020;18(3);22–31. Available at: 10.30629/2618-6667-2020-18-3-22-31. (In Russ)

18. Grigor'yan GA, Dygalo NN, Gekht AB et al. Molekulyarno-kletochnyye mekhanizmy depressii. Rol' glyukokortikoidov, tsitokinov, neyrotransmitterov i troficheskikh faktorov v geneze depressivnykh rasstroystv. Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 2014;45(2);3–19. (In Russ)

19. Dubinina EE, Shchedrina LV, Mazo GE. Osnovnyye biokhimicheskiye aspekty patogeneza depressii. Chast' 1. Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 2018;49(2);28-49. (In Russ)

20. Mosolov SN, Fedorova EU. Novyy vzglyad na patogenez depressii: vozmozhno li poyavleniye bystrodeystvuyushchikh antidepressantov? Sovremennaya terapiya psikhicheskikh rasstroystv. 2020;(3);2–10. Available at: 10.21265/PSYPH.2020.79.58.001. (In Russ)

21. Duman RS, Li N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences [Internet]. The Royal Society. 2012 Sep 5;367(1601):2475–84. Available at: http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0357.

22. Daily Med. Label: Spravato – esketamine hydrochloride solution. Available at: https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=d81a6a79-a74a-44b7-822c- 0dfa3036eaed

23. Bykov YV. Rezistentnyye k terapii depressii. Stavropol'. 2009. (In Russ)

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОИСКА И СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТА, ОБЛАДАЮЩЕГО ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ТРАВЫ АСТРАГАЛА ЛИСЬЕГО

Шур Ю.В., ассистент
Руководитель: **Самотруева М.А.**, докт. мед. наук, проф.
ФГБОУ ВО «Астраханский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России,
414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, Российская Федерация
E-mail: flora-888@mail.ru

Экспериментальное исследование посвящено изучению иммунотропного эффекта водно-этанольного извлечения из травы Астрагала лисьего (*Astragalus vulpinus Willd.*) в различных концентрациях в условиях липополисахаридного-иммунного воздействия (ЛПС-индуцированного иммунного воздействия) и выполнено на белых мышах линии Balb/c.

Иммунный статус лабораторных животных анализировали применяя стандартные иммунофармакологические методы: оценка органометрических показателей иммунокомпетентных органов (тимус, селезенка), реакция гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ), реакция прямой гемагглютинации (РПГА).

В ходе исследования установлено, что средство на основе травы Астрагала лисьего способно проявлять иммунотропные свойства различной направленности в зависимости от применяемой концентрации в условиях ЛПС-индуцированного иммунного воздействия.

Ключевые слова: *липополисахарид, Астрагал лисий, иммунотропная активность, тимус, селезенка, РГЗТ, РПГА.*

В последние годы, несмотря на явные успехи в создании синтетических лекарственных средств, всё больше возрастает популярность фитотерапии. Фитопрепараты являются эффективными средствами терапевтического воздействия на живой организм. В связи с этим, фитотерапия нашла своё использование в области профилактики различных болезней, как способ реабилитации населения в условиях увеличения воздействия разнообразных патогенных факторов окружающей среды, в качестве средства, повышающего адаптационные возможности здорового организма [1].

На современном фармацевтическом рынке из фитосредств значительную долю составляют импортные препараты из *Echinacea*, а также *Rhodiola rosea*, *Eleutherococcus senticosus* и некоторых других растений отечественного и зарубежного производства [2]. Такие данные актуализируют исследования потенциально нового лекарственного растительного сырья

(ЛРС) для разработки отечественных препаратов, в том числе, и обладающих иммуннотропными свойствами различной направленности [2].

Хотелось бы ответить, что на сегодняшний день существует острая необходимость поиск новых средств, проявляющих иммуномодулирующие и иммунокоррегирующие свойства, эффективность которых определяется исходным состоянием иммунной системы. При этом, оценка их эффективности невозможна без её изучения на модели липополисахарид-индуцированной иммунопатологии, сопровождающейся гиперреактивностью иммунной системы [3].

Поэтому поиск и изучение свойств нового сырья растительного происхождения в качестве источников для получения средств, обладающих иммунотропной активностью является, на сегодняшний день, несомненно, актуальным направлением в современной фармакологии и фармацевтики.

В качестве источника биологически активных веществ интерес представляют растения рода Астрагал *(Astragalus)* – крупного рода растений семейства бобовых (*Fabaceae*) [4]. Однако многие представители данного рода, в том числе и произрастающий на территории Астраханской области Астрагал лисий *(Astragalus vulpinus Willd.)* до сих пор остаются мало изученными как в эколого-биологическом, цитогенетическом, ресурсном, так и фармакологическом отношении .

Цель исследования – изучение влияния водно-этанольных извлечений Астрагала лисьего *(Astragalu svulpinus Willd)* на массу и клеточность иммунокомпетентных органов (тимус и селезенка) лабораторных животных (мышей), а также влияние на показатели клеточного и гуморального иммунитета (реакция ГЗТ и РПГА) в условиях индуцированного влияния липополисахаридом (ЛПС) бактериальной природы.

Объекты исследования – белые мыши линии Balb/c 3-х месячного возраста. Для установления иммунотропного влияния в условиях ЛПС-индуцированного иммунного воздействия из сырья Астрагала лисьего были приготовлены водно-этанольные извлечения в низкой и высокой концентрации (1% и 10%). Для эффективного удаления спирта из полученного извлечения использовали ротационный испаритель Hei–VAP Value G3 («Heidolph Instruments», Германия).

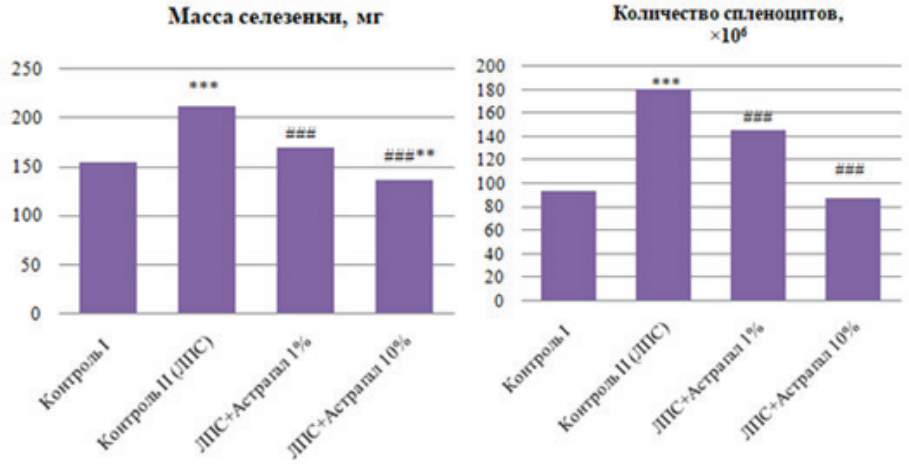
В ходе эксперимента животные были разделены на группы (n=10): первую группу составляли контрольные особи, получавшие воду очищенную в эквивалентном водно-этанольному извлечению Астрагала лисьего объеме; вторую – мыши с моделью экспериментальной патологии и получившие внутрибрюшинной однократно липополисахарид (ЛПС) в дозе 100 мг/кг; третью группу – особи, получавшие водно-этанольное извлечение Астрагала лисьего в концентрации 1% на фоне индуцированной ЛПС-патологии; четвертая группа – лабораторные животные, получавшие водно-этанольное извлечение Астрагала лисьего в концентрации 10% на фоне ЛПС-патологии.

Функциональную активность иммунной системы мышей изучали посредством постановки стандартных иммунологических тестов: анализа индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ), титра антител в реакции прямой гемагглютинации (РПГА). Кроме того, определяли массу селезенки и тимуса, а также количество спленоцитов и тимоцитов [5].

Влияние водно-этанольных извлечений Астрагала лисьего в различных концентрациях на состояние гуморального иммунитета у лабораторных животных оценивали по титру антител после иммунизации эритроцитами барана (ЭБ). Влияние на клеточное звено иммунного ответа оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) согласно стандартной методике [5].

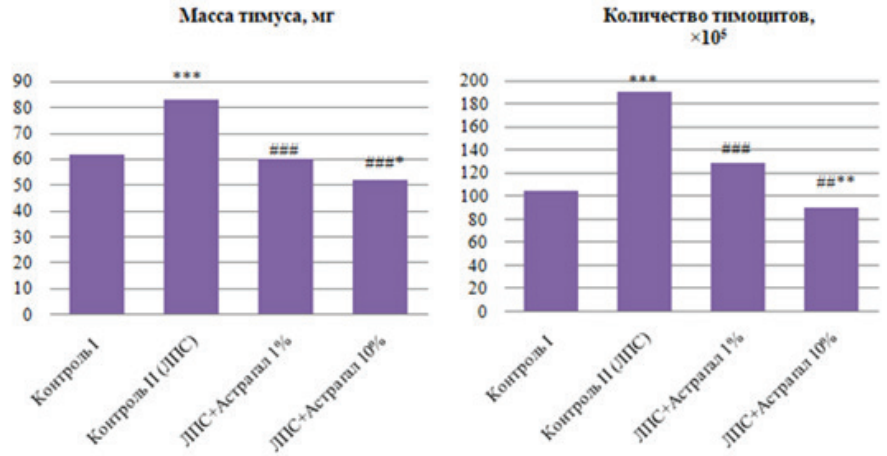
Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакетов программ: Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США), BIOSTAT 2008 Professional 5.1.3.1. При обработке полученных результатов, использовали параметрический метод с определением t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия в группах сравнения оценивали при постоянно выбранном уровне значимости $p \leq 0{,}05$.

Результаты оценки органометрических показателей иммунокомпетентных органов представлены на рисунках 1, 2.



Примечание: * – $p_1<0{,}05$; ** – $p<0{,}01$; *** – $p<0{,}001$ – относительно контроля I (вода очищенная);
– $p_2<0{,}05$; ## – $p<0{,}01$; ### – $p<0{,}001$ – относительно контроля II (ЛПС).

Рисунок 1. Влияние водно-этанольных извлечений из травы Астрагала лисьего на показатели массы и клеточности селезенки при ЛПС-индуцированном иммунном воздействии



Примечание: * – p_1<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 – относительно контроля I (вода очищенная); # – p_2<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001 – относительно контроля II (ЛПС).

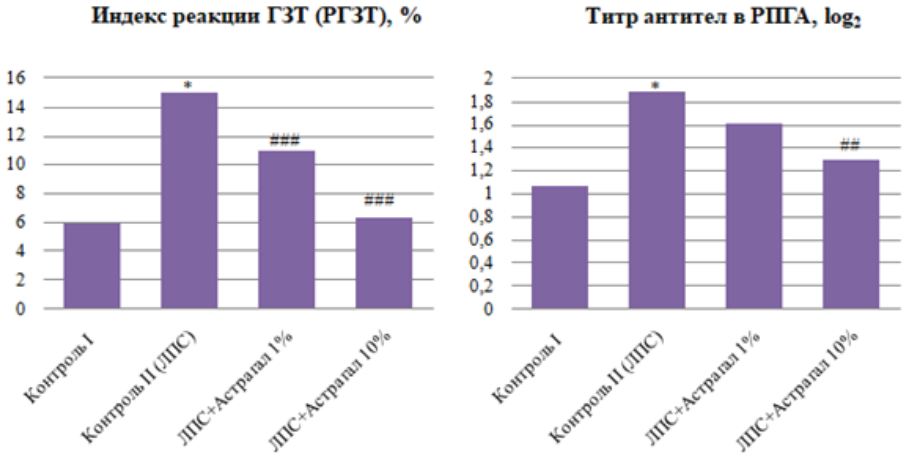
Рисунок 2. Влияние водно-этанольных извлечений из травы Астрагала лисьего на показатели массы и клеточности тимуса при ЛПС-индуцированном иммунном воздействии

При введении мышам ЛПС наблюдалось увеличение массы селезенки более чем на 30% (p_1<0,001) и тимуса практически в 2 раза (p_1<0,001) по сравнению с контрольными особями. При этом количество спленоцитов возросло практически вдвое (p_1<0,001), а тимоцитов увеличилось на 80% (p_1<0,001) (рис. 1, 2).

Применение фитосредства Астрагал в концентрации 1% на фоне действия ЛПС сопровождалось незначительным уменьшением массы селезенки на 19% (p_2<0,001) по сравнению с особями, получавшими ЛПС. Количество клеток в селезенке уменьшилось на 20% (p_2<0,001), по сравнению с контролем II, но оказалось больше значений контроля I. Показатель массы тимуса также подвергся изменению, при применении 1% раствора наблюдалось снижение его значений на 27% по сравнению с группой ЛПС-контроль (p_2<0,001). Что касается тимоцитов, то их количество снизилось практически на 30% по сравнению с уровнем значений контроля II (p_2<0,001), при этом не достигнув показателей контроля I (p_1>0,05) (рис. 1, 2).

Более выраженный эффект в отношении животных, находившихся под воздействием ЛПС оказало 10% водно-этанольное извлечение Астрагала. Так, масса селезенки и тимуса по сравнению с контролем II уменьшилась на 35% (p_2<0,001) и 37% (p_2<0,001) соответственно. Количество спленоцитов и тимоцитов снизилось на 52% (p_2<0,001 и p_2<0,01 соответственно), по сравнению со значениями II-ой контрольной группы. Что касается 10% извлечения то его применение показало выраженный иммунодепрессивный эффект, снизив все анализируемые показатели ниже значений в контрольной группе I. Так, масса селезенки и тимуса снизились на 10% и 15% (p_1<0,01 и p_1<0,05 соответственно), а тимоцитов более, чем на 10% (p_1<0,01).

Введение мышам липополисахарида в дозе 100 мкг/г привело к увеличению индекса реакции ГЗТ в 2,5 раза (p_1 < 0,05) и титра антител в РПГА на 32% (p_1 < 0,01) по сравнению группой контроля (рис. 3). Водно-этанольное извлечение в концентрации 1% вызвало снижение показателя РГЗТ более, чем на 25% (p_2<0,001), а применение 10% извлечения привело к уменьшению интенсивности реакции в 1,5 (p_2<0,001) и 2 (p_2<0,001) раза соответственно по сравнению с уровнем контроля II. При этом уровень индекса РГЗТ в группе животных, получавших 10% извлечение практически достигнул значений контроля I (рис. 3).



Примечание: * – p_1<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 – относительно контроля I (вода очищенная); # – p_2<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001 – относительно контроля II (ЛПС).

Рисунок 3. Влияние водно-этанольных извлечений из травы Астрагала лисьего на индекс реакции ГЗТ и титра антител в РПГА в условиях ЛПС-индуцированного иммунного воздействия

В группе мышей, получавших 1% раствор наблюдалось незначительное снижение титра антител (p_2>0,05) относительно животных с экспериментально моделированной иммунной патологией. Более выраженное влияние на уровень титра антител в РПГА оказало применение 10% раствора. Данный показатель снизился более, чем на 30% (p_2<0,01) по сравнению со значениями в группе контроль II, достигнув при этом уровня титра антител в I контрольной группе (рис. 3).

Таким образом, анализ иммуннотропных свойств водно-этанольного извлечения на основе Астрагала лисьего показал, что обе тестируемые концентрации раствора способны оказывать корригирующее действие на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета в условиях липополисахарид-индуцированного иммунного воздействия.

Установлено, что в условиях ЛПС-патологии наиболее выраженную корригирующую активность в отношении индекса РГЗТ и титра антител в РПГА проявило извлечение из травы Астрагала в концентрации 10%.

Результаты проведенного нами экспериментального исследования показывают, что на фоне моделированного липополисахарид-индуцированного иммунного воздействия водно-этанольное извлечение из травы Астрагала лисьего в зависимости от применяемой концентрации способно оказывать иммуннотропное действие различной направленности.

Так, в концентрации 1% испытуемое средство проявляет себя как иммуннокорректор, значимо восстанавливая массу и клеточность иммунокомпетентных органов (тимус, селезенка). При этом наиболее выраженный иммуннотропный эффект в отношении изучаемых показателей оказало 10% извлечение Астрагала, проявившее иммунодепрессивные свойства, характеризующиеся снижением массы тимуса и селезенки, а также количества иммунокомпетентных клеток в данных органах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самбукова ТВ, Овчинников БВ, Ганапольский ВП, и др. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2017;15(2)56–63.

2. Авдеева ЕВ, Куркин ВА. Иммуномодулирующие фитопрепараты: спрос и предложение. Ремедиум. 2017;3:26–28.

3. Самотруева МА, Магомедов ММ, Хлебцова ЕБ. и др. Влияние производных ГАМК на некоторые показатели перекисного окисления липидов в иммунокомпетентных органах в условиях моделирования иммунопатологии. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2011;74(8):32-36.

4. Сергалиева МУ, Мажитов МВ, Самотруева МА. Растения рода Астрагал: перспективы применения в фармации. Астраханский медицинский журнал. 2015;2:17–31.

5. Миронов АН, Бунатян НД, Васильев АН, Верстакова ОЛ и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств : в 2 ч. М. Ч.1. Гриф и К, 2012.

SUMMARY

PROSPECTS FOR THE SEARCH AND CREATION OF A PREPARATION WITH IMMUNOTROPIC ACTIVITY BASED ON WATER-ETHANOL EXTRACTION FROM THE GRASS OF ASTRAGALUS VULPINUS

Shur J.V., assistant professor
Astrakhan State Medical University;
121, Bakinskaya St, Astrakhan, 414000, Russian Federation

An experimental study is devoted to the study of the immunotropic effect of water-ethanol extraction from the herb *Astragalus vulpinus Willd.* in various concentrations under conditions of lipopolysaccharide-immune exposure (LPS-induced immune exposure) and performed on white Balb/c mice.

The immune status of laboratory animals was analyzed using standard immunopharmacological methods: assessment of organometric parameters of immunocompetent organs (thymus, spleen), delayed hypersensitivity reaction, direct hemagglutination reaction.

In the course of the study, it was found that the agent based on the herb *Astragalus vulpinus* is able to exhibit immunotropic properties of various directions, depending on the concentration used in the conditions of LPS-induced immune exposure.

Key words: *lipopolysaccharide, Astragalus vulpinus, immunotropic activity, thymus, spleen, delayed-type hypersensitivity reaction, direct hemagglutination reaction.*

REFERENCES

1. Sambukova TV, Ovchinnikov BV, Ganapolskii VP. et al. Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. 2017;15(2):56-63. https://doi.org/10.17816/RCF15256-63. (in Russ).

2. Avdeeva EV, Kurkin VA. Immunomoduliruyushchie fitopreparaty: spros i predlozhenie. Remedium. 2017;(3):26-28. (in Russ).

3. Samotrueva MA, Magomedov MM, Khlebtsova EB et al. Influence of gaba derivatives on some indices of lipid peroxidation in immunocompetent organs under experimental immunopathology conditions. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. – 2011;74(8):32-36. https://doi.org/10.30906/0869-2092-2011-74-8-32-36. (in Russ).

4. Sergalieva MU, Mazhitova MV, Samotrueva MA Rastenija roda Astragal: perspektivy primenenija v farmacii. Plants of the genus Astragalus: prospects for application in pharmacy. Astrakhan medical journal 2015;2:17-31. (in Russ).

5. Mironov AN, Bunatyan ND, Vasil'ev AN, Verstakova OL, et al. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' I [The guidelines for preclinical studies of pharmaceuticals. Part I]. Moscow, Grif i K, 2012. (in Russ).

АКТИВАТОРЫ АМФК КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ СТРАТЕГИЯ ПРИ БОРЬБЕ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Львова М.Ю., магистр 2 года обучения, **Черномыз М.С.**, бакалавр 4 курс
Руководитель: **Новикова Д.С.**, к.х.н., с.н.с.
НИЛ «Молекулярная фармакология»
Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
190013, Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 26, Российская Федерация
E-mail: milenalwowa@yandex.ru

Ключевые слова: *АМФК, энергетический баланс, активатор АМФК, сахарный диабет, гипергликемия, 3-бензилиденоксиндол.*

АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФК; англ. AMPK) является ключевым регулятором энергетического баланса как на клеточном, так и на уровне организма в целом. Основной функцией АМФК является поддержание энергетического статуса организма на уровне, соответствующем его потребностям. При многих патологических состояниях происходит угнетение активности АМФК, в результате чего данный фермент не может в полной мере реализовывать свои функции. Это, в конечном итоге, приводит к развитию метаболических нарушений на системном уровне.

Одной из перспективных стратегий в борьбе с метаболическими нарушениями является фармакологическая активация АМФК. К сожалению, в настоящий момент активаторы АМФК отсутствуют на фармацевтическом рынке. Единственным исключением является метформин – препарат первого выбора для лечения сахарного диабета 2-типа (СД2). Действие препарата основано на опосредованном воздействии на АМФК, тогда как для разработки эффективного и безопасного активирующего агента необходимо непосредственное (прямое) действие на мишень.

При разработке активаторов АМФК мы отталкивались от конкретной патологии, сахарного диабета 2-типа (СД2), который характеризуется устойчивой гипергликемией. Гипергликемия является фактором, угнетающим активность АМФК, и степень угнетения напрямую зависит от уровня сахара в крови. На сегодняшний день основная задача исследователей заключается в получении прямых высокоактивных активаторов АМФК, что, с нашей точки зрения, является не совсем корректным в рамках персонализированного подхода. Таким образом, целью нашей работы является создание серии активаторов АМФК, обладающих различной активностью, для предотвращения возникновения метаболических осложнений на фоне на фоне СД2.

В качестве основы для создания серии активаторов был выбран прямой активатор АМФК, соединение C24, которое является одним из наиболее активных активаторов АМФК, разработанных на сегодняшний день. Эксперименты, проведённые *in vitro* и *in vivo,* а также на животных моделях показали, что данное соединение улучшает толерантность к глюкозе и уменьшает резистентность к инсулину. Однако, соединение C24 обладает удовлетворительными фармокинетическими характеристиками, что также послужило поводом для разработки серии соединений с более благоприятным фармокинетическим профилем.

Нами был разработан ряд производных 3-бензилиденоксиндола, обладающих различным активирующим потенциалом по отношению к АМФК, от высокоактивных до низкоактивных соединений. Выделение и очистку продуктов проводили с использованием метода флеш-хроматографии; для подтверждения структуры веществ применяли метод ЯМР; мембранотропность полученных соединений определяли с помощью метода PAMPA.

Для оценки терапевтического потенциала рассматриваемых активаторов были использованы клеточные культуры, культивируемые в среде с повышенным содержанием глюкозы. В норме, среднее значение составляет 4,5 г/л (25мМ). Для моделирования патологического состояния, были использованы следующие значения концентрации глюкозы в среде: 9,0 г/л (50 мМ), 13,5 г/л (75 мМ), 18 г/л (100 мМ). Полученные соединения серии были протестированы на способность восстанавливать активность АМФК в условиях гипергликемии. Проведенные исследования позволили сделать выводы о возможности применения соединений различной активирующей силы для коррекции метаболических нарушений различной тяжести.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-33-70280).

ВЛИЯНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА ZEB1 НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОК К ГЕНОТОКСИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ В ХОДЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА

Нецветай С.Р., студ. 3 курса, **Парфеньев С.Е.**, мл. науч. сотрудник, асп. 4 года обучения
Руководители: **Шувалов О.Ю**., ст. науч. сотрудник, канд. биол. наук,
Барлев Н.А., гл. науч. сотрудник, док. биол. наук, проф.
Институт цитологии РАН, Тихорецкий проспект 4, Санкт-Петербург 194064, Россия
E-mail: sofya.necvetaj@spcpu.ru

Ключевые слова: *доксорубицин, этопозид, доксициклин, эпителиально-мезенхимальный переход, ZEB1, клеточный цикл.*

В основе метастазирования – основной причины смерти при онкологических заболеваниях, лежит эпителиально-мезенхимальный переход. Во время данного процесса происходит потеря межклеточных контактов, клетки приобретают

способность к миграции и инвазии. Одним из ключевых факторов, отвечающих за инициацию эпителиально-мезенхимального перехода, является транскрипционный фактор ZEB1. Как было показано ранее, ZEB1 способен воздействовать на ряд генов-мишеней, отвечающих за регуляцию клеточного цикла и апоптоз.

В данной работе мы изучили влияние ZEB1 на клеточный цикл клеток линии рака молочной железы MCF7 при воздействии применяемыми в медицинской практике генотоксическими препаратами – доксорубицином и этопозидом. Для работы использовали клетки линии MCF7 с индуцибельной экспрессией гена ZEB1, активация которого осуществляется с использованием доксициклина.

Согласно результатам МТТ-теста, при различных концентрациях доксорубицина (0,5-4 мкМ) выживаемость клеток повышалась в 2 раза при активации ZEB1. Одной из причин повышения устойчивости может являться остановка клеточного цикла в G1-фазе. С использованием проточной цитофлюорометрии было показано, что при активации ZEB1 происходило увеличение числа клеток, находящихся в G1-фазе и уменьшение в S- и G2/M- фазах, причем наибольший эффект наблюдался спустя 72 часа после начала активации ZEB1. При воздействии доксорубицина и этопозида в концентрациях 0,5-1 мкМ и 50-100 мкМ, соответственно, наблюдалось увеличение количества клеток в S-фазе по сравнению с контролем, однако при одновременном воздействии какого-либо из изучаемых генотоксических препаратов и активации экспрессии гена ZEB1 происходило значительное сокращение доли S- и G2/M-фаз клеточного цикла.

Из данных наблюдений можно сделать заключение: устойчивость к генотоксическим препаратам, наблюдаемая при активации Zeb1, может возникать за счет того, что клетки перестают делиться, а действие данных препаратов направлено как раз на пролиферирующие клетки. Снижение скорости пролиферации также было нами показано на линии MCF7 при индукции ZEB1.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (проект № 19-45-02011).

ИССЛЕДОВАНИЕ СОХРАНЯЕМОСТИ 2,4,6-ТРИНИТРОФЕНОЛА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПРИ ХРАНЕНИИ В РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМАХ

Погосян Н.Г., аспирант 1 года обучения
Руководитель: **Шорманов В.К.**, д. фарм. н., профессор
Курский государственный медицинский университет, 305041, Россия, г. Курск, ул. К. Маркса 3,
E-mail: nulla1@ya.ru

Ключевые слова: *2,4,6-тринитрофенол; 2-амино-4,6-динитрофенол; сохраняемость в биоматериале.*

2,4,6-тринитрофенол (далее в тексте 2,4,6-ТНФ) представляет собой желтое кристаллическое вещество, обладающее антисептическими свойствами. Ввиду своей высокой токсичности прямого медицинского применения не имеет, однако часто является причиной отравлений при химических производствах, а также лабораторных исследованиях (т.к. является полупродуктом при синтезе красителей и лабораторным реактивом соответственно).

Таким образом, целью настоящего исследования является изучение сроков сохраняемости 2,4,6-ТНФ в гнилостно разлагающемся биологическом материале (трупной печени) для определения периода времени, в течение которого возможно проведение химико-токсикологического анализа.

Исследование проводили согласно методикам, описанным в литературных источниках [1]. Для этого готовили три группы модельных смесей. В отдельные емкости помещали по 5,0 г измельченной (размером около 5 мм) трупной печени, а также по 5,0 мг 2,4,6-ТНФ. Также готовились контрольные модели, не содержавшие определяемого вещества. Приготовленные смеси хранили при трех температурных условиях: 1-3 °С; 8-10 °С и 18-22 °С. Через определенные промежутки времени по одной модельной смеси из каждого температурного режима подвергали химико-токсикологическому анализу.

В рамках этого анализа изолировали 2,4,6-ТНФ из биоматериала двукратным настаиванием с 10 мл ацетона. Очистку извлечений проводили методом тонкослойной хроматографии в камере с подвижной фазой ацетон – хлороформ (7:3). Затем 2,4,6-ТНФ элюировали из связи с сорбентом 5-ю мл диметилформамида. Элюаты подвергались спектрофотометрическому исследованию. Количественное определение проводили методом калибровочного графика при длине волны поглощающего слоя 379 (±2) нм. Измерения проводили на фоне элюатов, полученных в ходе контрольных опытов.

При температуре 18-22 °С уже через 7 суток хранения обнаруживается менее 50 % изначального количества 2,4,6-ТНФ, а при температуре 8-10 °С больше половины введенного вещества обнаруживается в течение 35 суток. Хранение при 1-3 °С позволяет определить примерно на 10 % вещества больше, чем при 8-10 °С начиная с 35 суток.

Также установлено, что при хранении трупной печени, контаминированной 2,4,6-ТНФ образуется его основной метаболит – 2-амино-4,6-динитрофенол. Наибольшая его концентрация наблюдается после трехнедельного хранения при температуре 18-22 °С. При этом новообразовавшееся вещество обнаруживается в течение более длительного времени, чем исходное, что продлевает возможные сроки химико-токсикологического анализа.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГРЕЛИНА, ОПОСРЕДОВАННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С TOLL-ПОДОБНЫМ РЕЦЕПТОРОМ 4

Решетниченко А.А., 3 курс, 3 год обучения, **Назина М.А.**, 3 курс, 3 год обучения,
Балаян И.Т., 4 курс, 4 год обучения, **Карсанова В.Э.**, 4 курс, 4 год обучения, **Ереско С.О.**, аспирант
Руководитель: **Айрапетов М.И.**, к.м.н., доц.
Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2, Российская Федерация
E-mail: alexandra.reshetnichenko@gmail.com

Ключевые слова: *грелин, воспаление, toll-подобный рецептор 4.*

У многих заболеваний из-за высвобождения медиаторов воспаления развиваются осложнения. Есть предположения, что грелин способен вызывать противовоспалительный эффект, однако точный механизм до сих пор не изучен.

Целью исследования было обобщить результаты исследований, направленные на изучение взаимодействия грелина с toll-подобным рецептором 4 (TLR4).

При экспериментальной травме легких на крысах отмечен противовоспалительный эффект грелина – снижение экспрессии TLR4 и NF-kB , интерлейкина (IL)-6, IL-1β, воспалительного белка макрофагов (MIP)-2, уровня фактора некроза опухоли (TNF)-α, общего белка в бронхоальвеолярной лаважной жидкости, миелопероксидазы. При ишемическом/реперфузионном повреждении миокарда (I/R) на кардиомиоцитах крыс авторы статьи выяснили, что грелин снижает экспрессию TLR4, каспазы-1 и криопирина (NLRP3), уровень IL-1β. Вводя грелин против окислительного стресса, индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и воспаления на модели I/R мышей in vivo, выявлена сниженная экспрессия iNOS, HMGB1 (белок с высокой подвижностью 1), TLR4 и NF-κB снижение уровней креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, TNF-α, IL-6, малонового диальдегида, каспазы-3, каспазы-9, уменьшен размер инфаркта миокарда, повышена секреция супероксиддисмутазы, глутатиона и глутатион-пероксидазы, защитное действие пептида осуществляются по пути HMGB1/TLR4/NF-κB. Грелин снижает уровень IL-6 и увеличивает уровень NF-kB (ядерная транслокация не изменяется) в дофаминергических клетках SN4741, происходящих от черной субстанции мыши, с помощью рецептора грелина и фермента грелин-О-ацилтрансферазы. У самцов крыс при сепсисе грелин снижает уровни норэпинефрина и TNF-α. Вводя грелин при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите против NLRP3 и пироптоза на крысах выяснено, что происходит снижение экспрессии TNF-α, IL-6, iNOS, NF-κB. При пародонтите на клетках пародонта людей и крыс in vivo и in vitro грелин снижает экспрессию CCL2 (C-C motif ligand 2), IL-6 и IL-8. На макрофагах периферической крови человека обнаружено, что грелин усиливает вызванное ЛПС производство IL-10, повышает экспрессию фактора транскрипции c-Maf, необходимого для экспрессии гена IL-10 в макрофагах. Грелин подавляет апоптоз PC-12 при диабетической энцефалопатии, снижая воспаление. Регулирование активации сигнального пути TLR4/NF-κB осуществляет ацилированный грелин, также ингибирует высвобождение TNF-α и IL-1β в макрофагах THP-1, стимулирующихся пальмитиновой кислотой.

Таким образом, грелин повышает количество противовоспалительных цитокинов в культурах клеток с различными моделями повреждения. Активация TLR4-сигнализации приводит к повышению провоспалительных цитокинов, грелин понижает экспрессию TLR4, соответственно можно предположить, что грелин изменяет активность TLR4-сигнализации. Для подтверждения этого требуются дополнительные исследования.

РАЗВИТИЕ ABC-ТРАНСПОРТЕР-ОПОСРЕДОВАННОЙ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТАМ РАЗЛИЧНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

Сагайдак А.В., аспирант 2 года обучения
Руководитель: **Григорьева Т.А.**, к.х.н., старший научный сотрудник
Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
НИЛ «Молекулярная фармакология»
190013, Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 26, Российская Федерация
E-mail: vivereA@gmail.com

Ключевые слова: *множественная лекарственная устойчивость, МЛУ, ABC-транспортеры, HCT116, паклитаксел, нутлин-3а, родамин 123, хекст 33342, тариквидар, ортованадат натрия.*

Одной из злободневных проблем в химиотерапии опухолей является снижение чувствительности злокачественных новообразований к широкому ряду противоопухолевых препаратов и, соответственно, развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Одной из причин развития МЛУ является гиперэкспрессия опухолевыми клетками ABC-транспортеров – Pgp, BCRP, MRP1 – активность которых обеспечивает выброс лекарств из клетки. Разработка препаратов, способных предотвратить развитие МЛУ, а также преодолеть ее, является важной задачей современной онкологии.

Целью работы было создание клеточных линий аденокарциномы толстой кишки человека (HCT116), устойчивых к агентам с различным механизмом действия, в качестве инструмента для оценки эффективности противоопухолевых препаратов и изучения вклада ABC-транспортеров в химиорезистентность.

Начальные концентрации паклитаксела (митотический ингибитор растительного происхождения) и нутлина-3а (реактиватор проапоптотического белка p53) составляли 0,01 мкМ и 10 мкМ, соответственно. В результате рутинного культивирования HCT116 дикого типа с постепенным повышением содержания препаратов в питательной среде получены химиорезистентные клеточные линии.

Чувствительность резистентных линий к рассматриваемым препаратам изучали, культивируя клетки в 96-луночном планшете в среде с различными концентрациями препаратов. Лунки последовательно на протяжении 5 суток обрабатывали ядерным красителем хекст 33342 и подсчитывали количество окрашенных клеток с помощью анализатора Operetta CLS™ .

Транспортную активность в клетках оценивали с применением анализаторов CLARIOstar и Operetta CLS™, используя субстраты (родамин 123 и хекст 33342) и ингибиторы (тариквидар и ортованадат натрия) транспортеров различной селективности действия.

Изменение экспрессии генов ABC-транспортеров – *ABCB1* (Pgp), *ABCC1* (MRP1), *ABCG2* (BCRP) – по мере выработки резистентности анализировали при помощи ПЦР с обратной транскрипцией.

Получены клеточные линии HCT116, резистентные к 0,01, 0,03, 0,06, 0,12, 0,24, 0,48 мкМ паклитаксела и 10, 30, 45 мкМ нутлина-3а. Определено, что резистентные клетки HCT116, выведенные в присутствии паклитаксела, также обладают повышенной устойчивостью и к нутлину-3а. При этом клетки HCT116, устойчивые к нутлину-3а, по большей части сохраняют чувствительность к паклитакселу.

ПЦР-анализ выявил повышенную экспрессию белков Pgp и BCRP, но не MRP1, в клетках HCT116, резистентных к 0,06 мкМ паклитаксела. Pgp- и BCRP-опосредованный характер резистентности также подтверждает снижение накопления в клетках селективного субстрата Pgp на 20% (родамин 123) и неселективного субстрата транспортеров – на 30% (хекст 33342).

Полученные клеточные линии предполагается использовать для изучения механизмов развития МЛУ в контексте разработки противоопухолевых препаратов и для идентификации агентов, эффективных против химиорезистентных опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-73-10150).

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ МЕЛАНОМЫ

Цветкова И.И., студ. 3 курса
Руководитель: **Соколова О.В.**, д-р. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
E-mail: ira.tsvet.igor@yandex.ru

Ключевые слова: *злокачественная меланома, рак, эпидемиология.*

В последние годы в нашей стране вспыхнул интерес к эпидемиологии онкологических заболеваний. И это вполне оправдано, так как в ходе многочисленных эпидемиологических исследований, показатели заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований стабильно увеличиваются в XXI веке во всем мире. Целью работы было изучить динамику и структуру заболеваемости меланомой в России и Ярославской области.

Злокачественная меланома – одна из форм рака кожи. Она является одной из наиболее редких заболеваний, но рост заболеваемости наблюдается ежегодно. Среди всех злокачественных опухолей меланома занимает особое место, так, составляя структурно менее 5% всех форм злокачественных заболеваний кожи, меланома является причиной более 80% смертей, приходящихся на группу новообразований кожи.

Наблюдается рост заболеваемости данной патологией во всех возрастных группах как городского, так и сельского населения. За последние 5 лет несколько чаще меланомой кожи болели городские жители – 54-55%, в то время как заболеваемость среди сельских составила 44-45%. В ярославской области за период с 2018 по 2019 гг. прошли лечение 38 пациентов с заболеванием меланома кожи 22 женщины и 16 мужчин, средний возраст составил 62,5 года и 63,7 лет соответственно Меланома кожи чаще встречается у людей старшего возраста, в Ярославской области на долю возрастной группы 60 и более лет приходит 68,4% случаев заболевания.

Положительным моментом следует отметить улучшение качества диагностики меланомы кожи, а именно выявление опухоли на ранних стадиях. Основную массу заболевших представляют пациенты с I и II стадией заболевания – 33 и 45% соответственно. На долю больных с III стадией приходится порядка 12%, 6% составляют больные с IV стадией заболевания. Стадия не установлена у 4% пациентов. Также, выявлен рост числа пролеченных больных, например в Ярославской области прирост составил 53,3%.

Точные причины роста заболеваемости злокачественной меланомой неизвестны, но нельзя не отметить определенную роль генетических факторов и особенностей окружающей среды, УФ-фактор, а также низкая онконастороженность. Важно понимать, что эта тенденция к росту заболеваемости также связана с увеличением численности населения на планете и увеличением продолжительности жизни.

Исследование показало, что структура заболеваемости меланомы кожи на региональном уровне соответствует особенностям эпидемиологии меланомы в России. Половая структура заболевания представлена преобладанием числа па-

циентов женского пола (57,9%). Высокий уровень заболеваемости среди лиц старшего возраста, возрастная группа 60 лет и старше составила 68,4%. Средний возраст без учета половой принадлежности составляет 62,7 года. Выявлен рост числа пролеченных больных (53,3%).

ИЗМЕНЕНИЕ СТАТИЧЕСКОЙ ВЫНОСЛИВОСТИ МЫШЕЙ ПРИ КУРСОВОМ ВВЕДЕНИИ ПРОИЗВОДНЫХ ДИМЕТИЛАМИНОЭТАНОЛА

Чистякова Е.Ю., соискатель
Руководитель: **Оковитый С.В.**, докт. мед. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: elizaveta.chistyakova@pharminnotech.com

Ключевые слова: *ДМАЭ, работоспособность, сила хвата.*

Целью исследования стала оценка влияния курсового введения производных диметиламиноэтанола (ДМАЭ) на статическую выносливость мелких лабораторных животных на фоне тренирующих нагрузок.

Исследование проводили на беспородных мышах-самцах в возрасте 3 месяцев, массой 20-30 г. Животных содержали в соответствии с требованиями Приказа Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Животные рандомизированы на 11 групп (N = 10). На протяжении 1 месяца мышам ежедневно внутрижелудочно вводились растворы различных солей производного ДМАЭ в дозировке 75 мг/кг (ДМАЭ-малат, ДМАЭ-кетоглутарат, ДМАЭ-сукцинат, ДМАЭ-фумарат), отрицательный контроль (физиологический раствор) и препарат сравнения (этилтиобензимидазол в дозировке 25 мг/кг) при разных режимах введения – за 30 минут до или сразу после тренировочного процесса (этилтиобензимидазол вводился сразу после окончания тренировки, как средство восстанавливающего типа). Тренировка животных заключалась в ежедневном принудительном беге на беговой дорожке (тредмил) Treadmill (TSE Systems, Германия) в течение 1 часа при скорости движения ленты 0,2 м/с на протяжении 1 месяца. Угол наклона ленты составлял 15°.

Оценку статической выносливости проводили при помощи прибора для измерения силы хвата Grip Strength Meter (TSE Systems, Германия) до начала исследования (фон), на 2 и 4 неделе тренировок. Математико-статистический анализ результатов осуществляли с использованием пакетов Microsoft Excel 2013 и Statistica 10.0.

Сила хвата при курсовом введении исследуемых веществ перед тренировкой достоверно увеличивалась начиная со второй недели тренировок в группах животных, получавших ДМАЭ-малат (на 16%, p=0,005) и ДМАЭ-кетоглутарат (на 15,8%, p=0,006), однако, к четвертой неделе наилучшие показатели продемонстрировали ДМАЭ-кетоглутарат (на 19,7%, p=0,0001) и ДМАЭ-сукцинат (на 12,2%, p=0,003) по сравнению с контрольной группой и группой этилтиобензимидазола.

При введении исследуемых веществ после тренировочного процесса на 2 неделе введения препаратов ДМАЭ-малат, ДМАЭ-кетоглутарат, ДМАЭ-фумарат и ДМАЭ-сукцинат уровень статической мышечной выносливости был статистически значимо выше, чем в контрольной группе в среднем, соответственно, на 39% (p<0,0001), 36% (p<0,0001), 26% (p<0,0001) и 25% (p<0,0001). Сила хвата при курсовом введении исследуемых веществ после тренировки к 4-ой неделе эксперимента достоверно увеличивалась по сравнению с контролем в группах животных, получавших ДМАЭ-кетоглутарат (на 21%, p<0,0001) и ДМАЭ-малат (на 19%, p<0,0001).

Таким образом, наиболее перспективными для дальнейшего изучения в качестве потенциальных актопротекторов можно назвать малат- и кетоглутарат-содержащие комбинированные производные ДМАЭ.

ПЕРВИЧНАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СИНТЕТИЧЕСКОГО КОНЪЮГАТА НА ОСНОВЕ 2-МЕТОКСИЭСТРАДИОЛА И ХЛОРАМБУЦИЛА

Шибилев В.М., асп. 3 года
Руководители: **Зефиров Н.А.**, канд. хим. наук, ассистент,
Зефирова О.Н., докт. хим. наук, проф., **Каленикова Е.И.**, докт. фарм. наук, проф.
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Факультет фундаментальной медицины
119991, Москва, Ломоносовский просп., д. 27, корп. 1, Российская Федерация
E-mail: shibivad1@gmail.com

Ключевые слова: *Хлорамбуцил, 2-метоксиэстрадиол, опухолевые клетки A549 и MCF-7, эпителиальные клетки молочной железы MCF-10A, фибробласты легких VA13, тубулин, микротрубочки.*

В работе представлена первичная фармакологическая оценка синтетического соединения, представляющего собой сложноэфирный конъюгат тубулин-направленного противоопухолевого агента 2-метоксиэстрадиола (эндогенного метаболита эстрадиола) с двумя молекулами ДНК-алкилирующего препарата хлорамбуцила. Соединение предложено нами в качестве «тройного» совместного пролекарства для блокировки быстрого метаболизма исходного стероида. Проведенные исследования демонстрируют очень низкую цитотоксичность конъюгата по отношению к опухолевым (A549, MCF-7) и условно нормальным клеткам (MCF-7, VA13): EC_{50} ~ 100 мкмоль/л, а также слабое ингибирование клеточного роста (A549: 20%/48 ч), отсутствие стимуляции апоптоза, отсутствие влияния на морфологию клеток карциномы легких A549. Эти данные свидетельствуют о том, что в течение 48 ч полного гидролиза «тройного» пролекарства до исходного стероида не происходит, но возможно протекание гидролиза одной (фенольной) сложноэфирной связи, так как наблюдаемое для конъюгата значение EC_{50} сравнимо с таковым для действия на клетки A549 одной отщепившейся молекулы хлорамбуцила (по результатам контрольного эксперимента). Интересной и неожиданной оказалась обнаруженная нами способность конъюгата увеличивать скорость сборки микротрубочек клеток A549 без изменения их структуры.

В целом, продемонстрированное в работе резкое отличие свойств полученного соединения от таковых для исходных молекул 2-метоксиэстрадиола и хлорамбуцила свидетельствует о достаточной стабильности и низкой токсичности полученного пролекарства *in vitro* и показывает перспективность его дальнейшего тестирования в экспериментах *in vivo*.

Современные вопросы фармацевтической технологии

На сегодняшний день, согласно стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации, фармацевтическая отрасль является одним из драйверов развития современного здравоохранения и экономики. Основной целью развития фармацевтической промышленности РФ на период до 2030 года является обеспечение национальной лекарственной безопасности и лекарственной доступности во всех сегментах, а также обеспечение передового уровня научно-технического развития фармации. Реализацию поставленных задач невозможно представить без учёта технических аспектов.

Современная фармацевтическая технология позволяет разрабатывать и внедрять эффективные и при этом безопасные способы получения лекарственных форм. Однако ключевую роль в этом процессе, конечно, играет наука.

20 апреля 2021 года на базе Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета состоялось секционное заседание «Современные вопросы фармацевтической технологии». В работе конференции традиционно приняли участие студенты, аспиранты, молодые учёные и специалисты, работающие в области фармации. Свои работы представили 11 участников, ранее прошедшие отборочный этап. Тематики докладов касались вопросов применения компьютерного и математического моделирования, совершенствования технологических процессов, разработки лекарственных форм с модифицированным высвобождением, создания радиофармпрепаратов, а так же средств на основе лекарственных растений.

Отрадно заметить, что среди участников были не только учащиеся нашего университета, но и представители ФГБУ «Российского научного центра радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России, Белорусского государственного медицинского университета и ФГБОУ ВО СЗГМУ им. Мечникова.

Так же в заседании приняли участие представители фармацевтических компаний: Сон Андрей Викторович – технолог отдела разработки готовых лекарственных форм ЗАО БИОКАД, Савельева Наталья Анатольевна – заместитель главного технолога ООО НТФФ Полисан, Юлия Демченко – руководитель по валидации Новартис Нева.

В связи с эпидемиологическими ограничениями, работа проходила в дистанционном формате, однако это не помешало нам рассмотреть широкий круг актуальных профессиональных проблем, обменяться накопленным опытом и передовыми практиками. Все доклады представляли собой оригинальные исследования, обладающие практической значимостью.

Жюри было не просто выбрать победителей. Однако в ходе голосования преподавателей СПХФУ, партнеров и спонсоров конференции места определи следующим образом:

1 место – Коцур Юлия Михайловна, – аспирант 3 года обучения ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, тема доклада: «Разработка состава системы доставки 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата» натрия с пролонгированным высвобождением.

2 место – Банайтис Роман Павлович, студент 4 курса ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, тема доклада: «Фильтрование в режиме переменного перепада давления».

3 место – Антуганов Дмитрий Олегович, мол. ученый ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России, тема доклада: «Протонные ионные жидкости на основе гидроксиалкиламмониевых солей – перспективные буферные агенты для получения 68 ga-меченных радиофармпрепаратов».

Нам хочется выразить самые искренние слова благодарности участникам конференции за плодотворную работу и интересные доклады, научным руководителям и наставникам за высокий уровень подготовки студентов и аспирантов, партнёрам и спонсорам конференции за сотрудничество и поддержку молодых учёных! Спасибо организаторам за этот праздник фармацевтической науки! До новых встреч!

Модератор секции
Елена Владимировна Флисюк
проректор по научной работе, заведующий кафедрой технологии лекарственных форм,
д. фарм. н., профессор ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Современные вопросы фармацевтической технологии

20 апреля 2021 10:00

Трансляция заседания тематической секции доступна по ссылке и QR-коду

https://spcpu.ru/himfarm_life/events/2489/

Научный редактор секции

Загорулько Елена Юрьевна, научный сотрудник департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, старший преподаватель кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. фармацевт. наук

Кафедра промышленной технологии лекарственных препаратов

Каухова Ирина Евгеньевна, заведующий кафедрой промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, д-р. фармацевт. наук, профессор

Кафедра технологии лекарственных форм

Флисюк Елена Владимировна, заведующий кафедрой технологии лекарственных форм ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, д-р. фармацевт. наук, профессор

Кафедра процессов и аппаратов химической технологии

Сорокин Владислав Валерьевич, заведующий кафедрой процессов и аппаратов химической технологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. фармацевт. наук, доцент

Кафедра физической и коллоидной химии

Беляев Алексей Петрович, заведующий кафедрой физической и коллоидной химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, д-р. тех. наук, профессор

Программа конференции доступна по ссылке и QR-коду

http://www.ypharm.spcpu.ru

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРОЕНИЯ АППАРАТА НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА ПЕРЕМЕШИВАНИЯ В ПАКЕТЕ ПРОГРАММ ANSYS

Абакумова Т.К., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Сорокин В.В.**, канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: tatyana.abakumova@spcpu.ru

Проведено моделирование процессов перемешивания в пакете программ ANSYS в аппаратах различной конфигурации и дана оценка влияния конструкции аппарата, мешалки и ее расположения на характеристики процесса перемешивания.

Ключевые слова: *перемешивание, ANSYS, контурные графики, графики линий пути.*

В настоящее время для моделирования различных процессов широко используются различные программы. С их помощью можно определить оптимальные условия проведения процесса в более короткие сроки и с меньшими финансовыми затратами. ANSYS – это программный пакет конечно-элементного анализа, решающий задачи в различных областях инженерной деятельности, включая связанные многодисциплинарные задачи.

Целью работы явилось моделирование процессов перемешивания в аппаратах различной конфигурации и анализ влияния строения аппарата на характеристики процесса перемешивания.

Процесс перемешивания широко применяют в фармацевтической, пищевой и химической промышленности для интенсификации тепловых и массообменных процессов при изготовлении растворов, суспензий и эмульсий.

Способы перемешивания определяются агрегатным состоянием перемешиваемых материалов и целью перемешивания. Ключевыми показателями, которые характеризуют процесс перемешивания, являются: интенсивность, эффективность перемешивания, а также расход энергии на реализацию процесса.

Объектом исследования явились модели ёмкостных аппаратов с различными перемешивающими устройствами – лопастной и турбинными мешалками и различным расположением валов мешалки – с центральным и смещенным от центра, а также с различным расстоянием мешалки от дна аппарата. В процессе исследования использовались абстрактно-логический методы, метод сравнений, прогнозирования и моделирования.

В качестве объекта исследования был взят модельный лабораторный емкостной аппарат с лопастной и турбинной мешалками, схема которого представлена на рисунке 1. Размеры аппарата, общие для всех случаев: T=80мм, Z=150мм, Z_2=150мм. При этом для всех случаев с лопастной мешалкой: w=16мм, D=45мм; для всех случаев с турбинной мешалкой w=19мм, D=34мм.

Смещение вала мешалки от центра аппарата производилось на 12 мм.

Для случаев с центральным расположением вала мешалки: C=42мм.

Для случая с увеличенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата: C=72мм.

Для случая с уменьшенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата: C=27мм.

Объем заполнения аппарата жидкостью равен 0,000754 м^3. Скорость вращения мешалки равна 200 об/с.

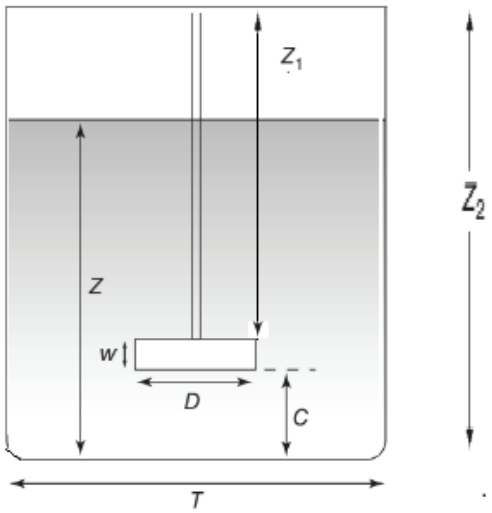


Рисунок 1. Схема размеров модельного аппарата с мешалкой

В ходе работы были получены данные (рис. 1, рис. 2) по распределению скоростей жидкости в различных точках аппарата, которые позволили оценить влияние конфигурации аппаратов (вида используемого перемешивающего устрой-

ства и его расположения относительно корпуса аппарата) на характеристики процессов перемешивания. Полученные данные можно использовать для прогнозирования процессов в конкретном аппарате и подбора наиболее выгодного строения аппарата для проведения в нем процесса перемешивания с определенными характеристиками.

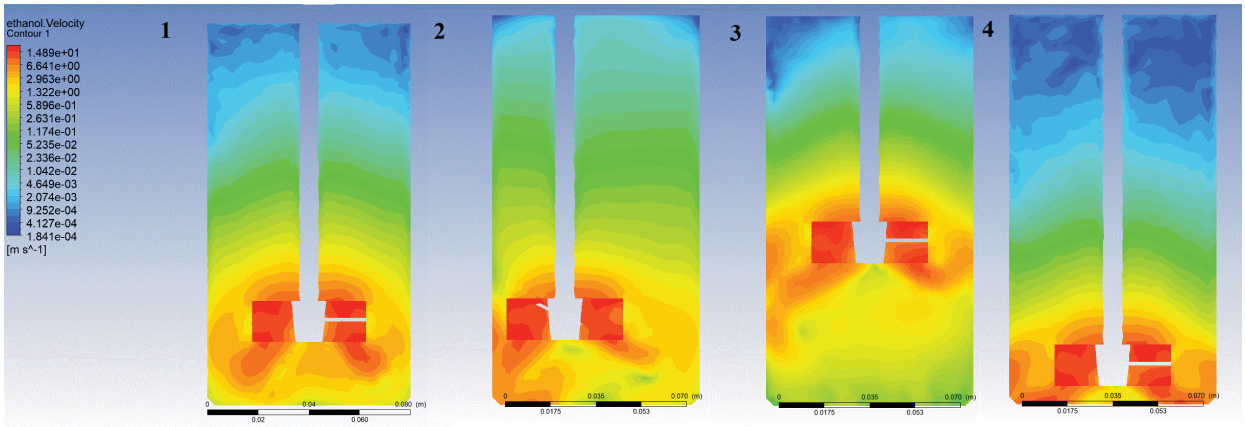


Рисунок 2. Распределение скоростей в аппарате с центральным расположением вала пропеллерной мешалки (1), со сдвинутым от центра расположением вала мешалки (2), с увеличенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата (3), с уменьшенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата (4), выраженные в форме контурных графиков

В первом случае, моделирование производили для аппарата с пропеллерной мешалкой.

Исходя из данных рисунков 2, 3 в случае центрального расположения вала перемешиваемая жидкость распределяется по объёму аппарата более равномерно, движение наблюдается, как в центре – в области непосредственного соседства с пропеллерной мешалкой, так и у стенок. Из данных по распределению потоков, представленных на рисунке 3 видно, что характер движения тангенциальный.

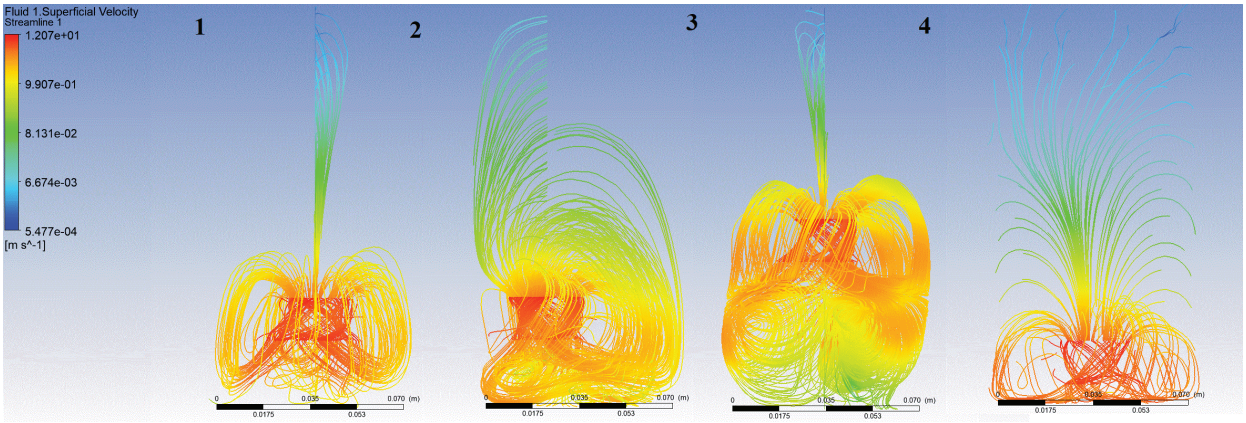


Рисунок 3. Распределение скоростей в аппарате с центральным расположением вала пропеллерной мешалки (1), со сдвинутым от центра расположением вала мешалки (2), с увеличенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата (3), с уменьшенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата (4), выраженные в форме векторов скоростей

В случае сдвинутого от центра расположения вала, жидкость распределяется менее равномерно, основное движение происходит в области, непосредственно граничащей с мешалкой.

Однако, при таком расположении вала мешалки происходит образование более стабильного и мощного циркуляционного потока, который поднимается до зеркала жидкости, что позволяет перемешивать жидкость по всему объему аппарата.

При использовании пропеллерной мешалки в случае (3) наблюдается снижение скорости движения жидкости в нижней части аппарата, что является ожидаемым. Однако, даже при таком расположении мешалки, верхние слои жидкости в аппарате не перемешиваются, в отличие от способа 2.

Расположение мешалки, способ 4, наименее эффективное из всех – перемешивания наблюдается только в нижней части аппарата.

Таким образом, в случае сдвинутого от центра расположения вала и в случае изменения расстояния мешалки от дна аппарата перемешивание будет происходить более неравномерно, чем в первом случае, однако направление движения потоков во втором случае позволяет организовать процесс перемешивания по всему объему аппарата.

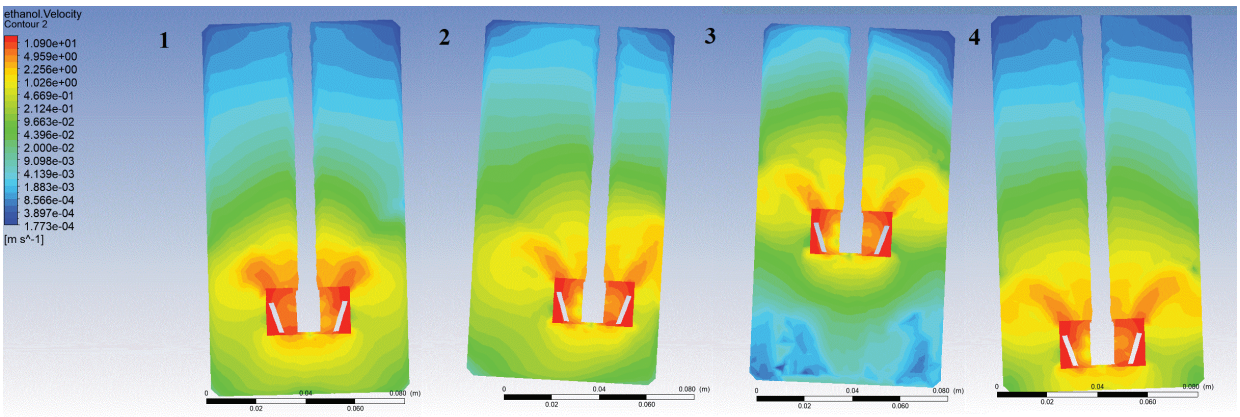


Рисунок 4. Распределение скоростей в аппарате с центральным расположением вала турбинной мешалки (1), со сдвинутым от центра расположением вала мешалки (2), с увеличенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата (3), с уменьшенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата (4), выраженные в форме контурных графиков

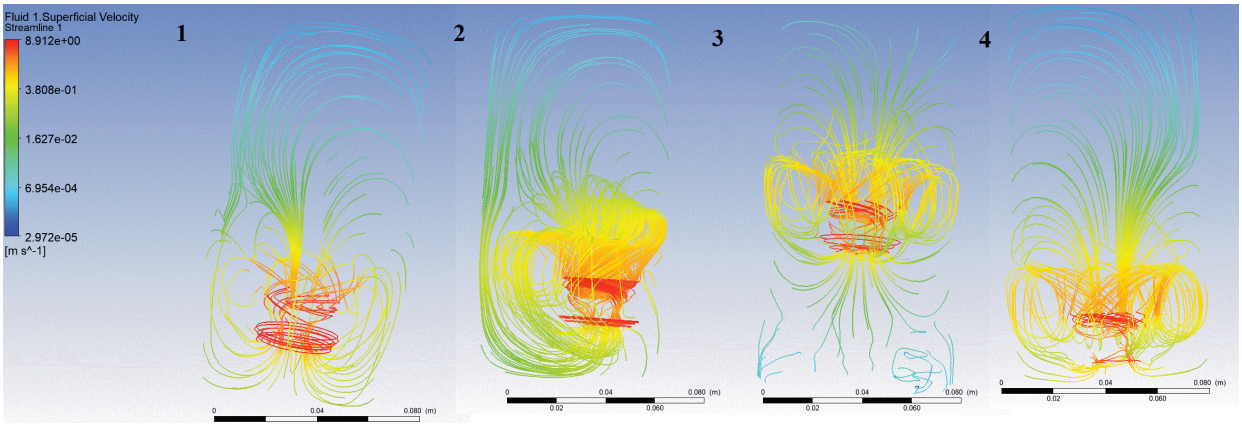


Рисунок 5. Распределение скоростей в аппарате с центральным расположением вала турбинной мешалки (1), со сдвинутым от центра расположением вала мешалки (2), с увеличенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата (3), с уменьшенным от первоначального расстоянием мешалки от дна аппарата (4), выраженные в форме векторов скоростей

Для турбинной мешалки исходя из рисунков 4, 5 в случае центрального расположения вала перемешиваемая жидкость распределяется по объёму аппарата более равномерно, наиболее интенсивное движение наблюдается в непосредственной близости от мешалки. Из рисунка видно, что характер движения радиальный.

В случае сдвинутого от центра расположения вала жидкость распределяется менее равномерно, основное движение происходит в области, непосредственно граничащей с мешалкой, однако, движение жидкости более интенсивное в верхней части аппарата, хотя при этом наличия застойных зон в верхней части аппарата не удается избежать.

В случае (3) наблюдается отсутствие перемешивания в нижней части аппарата, в случае (4) наблюдается большая скорость перемешивания в непосредственной близости от мешалки, чем в первом случае.

Таким образом, в случае сдвинутого от центра расположения вала и, в случае изменения расстояния мешалки от дна аппарата перемешивание будет происходить более неравномерно, чем в первом случае, однако, смещение мешалки от центра позволяет избежать образования застойных зон в верхней части аппарата, что может быть полезным при приготовлении растворов и суспензий в фармацевтической технологии.

Проведено моделирование процессов перемешивания в аппаратах различной конфигурации и выполнен анализ влияния строения мешалки и её расположения на характеристики процесса перемешивания.

При смещении вала мешалки от центра и в случае изменения расстояния мешалки от дна аппарата наблюдаются уменьшение равномерности перемешивания в случае мешалок с тангенциальным и радиальным характером перемешивания. В обоих случаях для более равномерного перемешивания жидкости предпочтительнее использовать аппарат с центральным расположением вала, однако смещение вала мешалки относительно центра аппарата для интенсификации процесса в верхних слоях аппарата может стать альтернативой установке внутренних устройств в аппарате.

ЛИТЕРАТУРА

1. Francis X, Kessler S. Scale-up of mixing processes: a primer. Chemical engineering in the pharmaceutical industry. R&D to manufacturing. 2018;12:241-259. DOI: 10.1002/9781119600800.

2. Avinash R, Vivek V. Stirred vessels: computational modeling of multiphase flows and mixing. Chemical engineering in the pharmaceutical industry. R&D to manufacturing. 2018;13:260-317. DOI: 10.1002/9781119600800.

SUMMARY

STUDYING THE INFLUENCE OF THE STRUCTURE OF THE APPARATUS ON THE CHARACTERISTICS OF THE MIXING PROCESS IN THE ANSYS PROGRAM PACKAGE

Abakumova T.K., 2th year postgraduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The mixing processes in apparatuses of various configurations were modeled and the influence of the apparatus structure on the characteristics of the mixing process in the ANSYS software package was analyzed.

Key words: *mixing, ANSYS, contour plots, path lines.*

Currently, various programs are widely used to model various processes. With their help, it is possible to determine the most favorable conditions for carrying out the process in a shorter time and with lower financial costs. ANSYS is a finite element analysis software package that solves problems in various fields of engineering, including related multidisciplinary tasks. Using ANSYS, mixing processes in apparatuses of various structures were simulated.

REFERENCES

1. Francis X, Kessler S. Scale-up of mixing processes: a primer. Chemical engineering in the pharmaceutical industry. R&D to manufacturing. 2018;12:241-259. DOI: 10.1002/9781119600800.
2. Avinash R, Vivek V. Stirred vessels: computational modeling of multiphase flows and mixing. Chemical engineering in the pharmaceutical industry. R&D to manufacturing. 2018;13:260-317. DOI: 10.1002/9781119600800.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОГО ЭКСТРАКТА НА ОСНОВЕ ЧЕРНИКИ, ИМБИРЯ И ЖЕНЬШЕНЯ

Александрова Д.А., магистрант 1 года обучения
Руководитель: **Легостева А.Б.**, канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: aleksandrova.darya@pharminnotech.com

Определены технологические свойства побегов черники обыкновенной, корневищ имбиря аптечного и листьев женьшеня настоящего. Исследована кинетика экстракции корневищ имбиря аптечного и совместной экстракции побегов черники обыкновенной и листьев женьшеня настоящего для получения экстракта противодиабетического действия. Выбраны продолжительности двух ступеней этих экстракций.

Ключевые слова: *кинетика экстракции, корневища имбиря аптечного, листья женьшеня настоящего, побеги черники обыкновенной, технологические свойства, ультразвуковая экстракция.*

По данным Международной федерации диабета (International Diabetes Federation) в мире насчитывается порядка 463 миллионов человек в возрасте от 20 до 79 лет с диагностированным сахарным диабетом. К 2030 году ожидается увеличение этого числа до 578 миллионов [1]. Соответственно, 10,3% человечества будет страдать этим тяжелым заболеванием уже в ближайшее время, поэтому научные изыскания в области создания новых противодиабетических препаратов весьма актуальны и важны. Вместе с тем, поскольку диабет – это хроническое заболевание, приводящее к развитию целого ряда патологий, то на первый план выступают галеновые фитохимические препараты, с помощью которых возможно лечение не только основного заболевания, но и сопутствующих.

Побеги черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.) обладают гипогликемическим действием. В состав данного сырья входят флавоноиды, дубильные вещества, фенилпропаноиды и простые вещества. Побеги черники обыкновенной также входят в состав противодиабетического сбора «Арфазетин». [2]

Корневища имбиря аптечного (*Amomum zingiber* L.) обладают гипогликемическим действием, как для здоровых людей, так и для пациентов с сахарным диабетом, способствуют ускорению обмена веществ. В корневищах имбиря аптечного содержится значительное количество эфирного масла (1-3 %), основную часть которого составляют сесквитерпены, терпены, терпеновые спирт и альдегиды и сесквитерпеноиды. В состав корневищ имбиря аптечного также входят флавоноиды и многочисленные кетоны, основными из которых являются цингерол, 6-шогаол, 6-гингерол и другие [3].

Листья женьшеня настоящего (*Panax ginseng* C.A.Mey.) способны снижать уровень сахара в крови, а также они могут использоваться в лечении ожирения, что иногда сопровождает протекание сахарного диабета. Основными веществами, которые обеспечивают терапевтический эффект женьшеня настоящего, являются панаксозиды Re, Rg1, Rg2, Rd, Rc, Rb2 и Rb1. Их содержание в листьях растения, выше, чем в его плодах и корнях [4].

Целью исследования является разработка технологии противодиабетического экстракта на основе побегов черники, корневищ имбиря и листьев женьшеня. В задачи данного этапа научных экспериментов входит определение технологических свойств растительного материала и изучение кинетики экстракции из него биологически активных веществ.

Объектами исследования стали побеги черники обыкновенной, корневища имбиря аптечного и листья женьшеня настоящего.

Определены основные технологические свойства для каждого вида сырья для разработки технологии экстракта, такие как фракционный состав, коэффициенты водо- и спиртопоглощения, насыпная масса и сыпучесть.

В качестве метода экстрагирования выбрана ультразвуковая экстракция. Использование ультразвука позволяет интенсифицировать процесс экстракции, не требует больших материальных затрат и сложного аппаратурного оформления [5].

Экстрагирование корневищ имбиря аптечного проводили 70 % этиловым спиртом в 2 этапа. Соотношение сырье:экстрагент на первой ступени 1:7, на второй – 1:5.

Побеги черники обыкновенной и листьев женьшеня настоящего экстрагировали совместно, при этом на 9 частей побегов черники приходилась 1 часть листьев женьшеня настоящего. Совместное экстрагирование обусловлено тем, что предварительные исследования кинетики экстракции побегов черники обыкновенной и листьев женьшеня настоящего показали, что равновесие у обоев видов сырья наступает практически одновременно. В качестве экстрагента выступал 50 % этиловый спирт. Соотношение сырье:экстрагент на первой ступени 1:7, на второй – 1:5.

Результат исследования фракционного состава представлен в таблице 1. Фракционный состав сырья разнороден.

Таблица 1 – Фракционный состав побеги черники обыкновенной, корневищ имбиря аптечного и листьев женьшеня настоящего

Размер частиц сырья	Побеги черники обыкновенной, %	Корневища имбиря аптечного, %	Листья женьшеня настоящего, %
Больше 2 мм	33,73	0	22,34
От 1,0 до 2,0 мм	36,33	36,43	18,44
От 0,5 до 1,0 мм	26,19	46,99	43,23
От 0,25 до 0,5 мм	2,02	15,29	12,53
Меньше 0,25 мм	1,73	1,29	3,46

Ряд остальных технологических свойств сырья представлен в таблице 2. Значения коэффициентов водо- и спиртопоглощения получились достаточно высокими, что было учтено в дальнейшем при выборе соотношения сырье:экстрагент. Значения насыпной массы позволяют отнести данные виды сырья к легким материалам. Корневища имбиря аптечного, побеги черники обыкновенной и листья женьшеня настоящего обладают низкой сыпучестью, и для них следует использовать вспомогательные ворошители для загрузочных бункеров в заводских условиях.

Таблица 2 – Технологические свойства побегов черники обыкновенной, корневищ имбиря аптечного и листьев женьшеня

Технологическое свойство	Побеги черники обыкновенной	Корневища имбиря аптечного	Листья женьшеня настоящего
Коэффициент водопоглощения	3,43	3,33	3,31
Коэффициент поглощения 50 % этанолом	3,49	-	3,33
Коэффициент поглощения 70% этанолом	-	2,32	-
Насыпная масса, г/см^3	0,13	0,61	0,28
Сыпучесть, г/с	0,21	1,91	0,15

Кинетика экстракции корневищ имбиря аптечного представлена на рисунке 1. В соответствии с представленными на рисунке данными для ультразвуковой экстракции корневищ имбиря аптечного выбрана длительность 1 ступени, равная 7 минутам, длительность 2 ступени – 5 минутам.

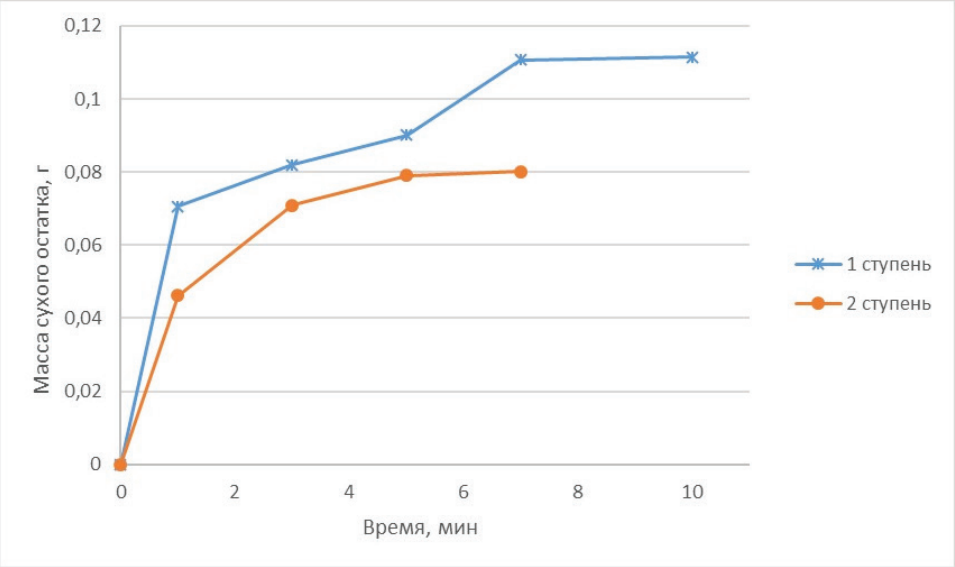


Рисунок 1. Кинетика экстракции корня имбиря

Кинетика экстракции побегов черники обыкновенной и листьев женьшеня настоящего представлена на рисунке 2. В соответствии с представленными на рисунке данными для совместной ультразвуковой экстракции побегов черники обыкновенной и листьев женьшеня настоящего выбрана длительность 1 ступени, равная 5 минутам, длительность 2 ступени – 4 минутам.

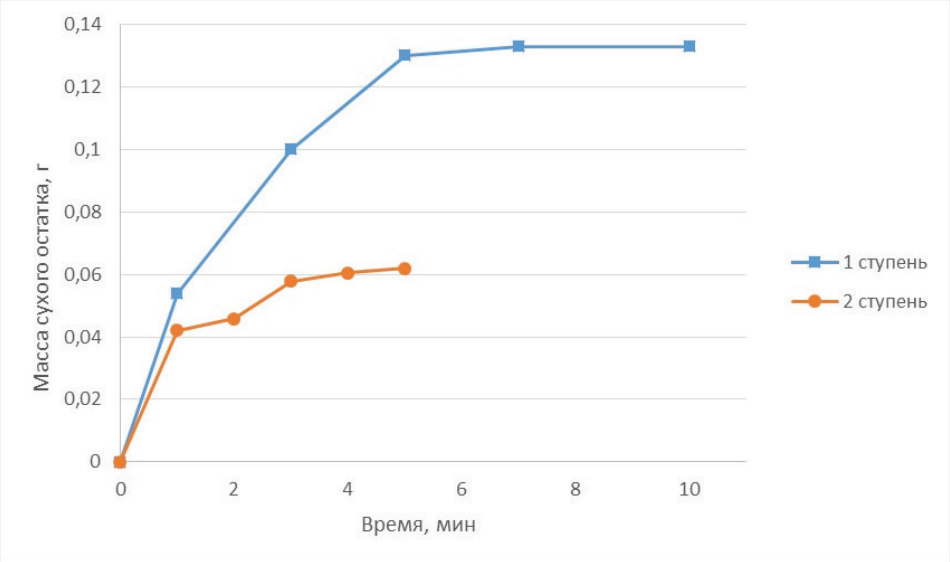


Рисунок 2. Кинетика экстракции побегов черники и листьев женьшеня

В ходе выполнения исследования определены технологические свойства и исследована кинетика экстракции побегов черники обыкновенной, корневищ имбиря аптечного и листьев женьшеня настоящего для получения экстракта противодиабетического действия. Выбрано время экстрагирования на каждой ступени. Полученные результаты будут учтены в дальнейшем при разработке густого экстракта на основе данного растительного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. IDF DIABETES ATLAS Ninth edition 2019. Available at: https://diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf [Accessed 22 February, 2021]

2. Рязанова ТК, Куркин ВА Новые подходы к комплексному использованию плодов и побегов черники обыкновенной. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012;5(3):754–757.

3. Ермакова ВА, Самылина ИА, Ковалева ТЮ, Бобкова НВ. Корневища имбиря лекарственного: научное обоснование применения в современной медицине и подходы к стандартизации сырья. Традиционная медицина. 2016;1(44):19–32.

4. Jing-tian Xie, Chong-zhi Wang, An-bao Wang, Jian Wu, Daniel Basila, Chun-su Yuan. Antihyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stem of Panax ginseng. Acta Pharmacologica Sinica. 2005;26(9):1104–1110.

5. Еремеева НБ, Макарова НВ. Использование ультразвукового излучения для экстракции антиоксидантов из ягод. Пищевая промышленность. 2016;5:63–65.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF ANTIDIABETIC EXTRACT TECHNOLOGY WITH BILBERRY, GINGER AND GINSENG

Aleksandrova D.A., 1st year masters student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The technological properties of bilberry shoots, ginger root and ginseng leaves were determined. The kinetics of ginger root extraction and joint extraction of bilberry shoots and ginseng leaves to obtain antidiabetic extract were studied. The durations of the two stages of these extractions were selected.

Key words: *extraction kinetics, ginger root, ginseng leaves, bilberry shoots, technological properties, ultrasonic extraction.*

REFERENCES

1. IDF DIABETES ATLAS Ninth edition 2019. Avaliable at: https://diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf [Accessed 22 February, 2021]
2. Ryazanova TK, Kurkin VA. New approaches to complex use of fruits and shoots of bilberry ordinary. Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. 2012;5(3):75–757. (in Russ)
3. Ermakova VA, Samylina IA, Kovaleva TJ, Bobkova NV. The rhizomes of common ginger: the scientific rationale for the use in modern medicine and approaches to the standardization of crude herbal drugs. Traditional medicine. 2016;1(44):19–32. (in Russ)
4. Jing-tian Xie, Chong-zhi Wang, An-bao Wang, Jian Wu, Daniel Basila, Chun-su Yuan. Antihyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stem of Panax ginseng. Acta Pharmacologica Sinica. 2005;26(9):1104–1110.
5. Eremeeva NB, Makarova NV. The use of ultrasonic radiation for the extraction of antioxidants from berries. Food industry. 2016;5:63–65.

РАЗРАБОТКА ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» ДЛЯ ВАГИНАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ

Андреева П.И., магистрант 2 курса
Руководитель: **Смехова И.Е.,** проф. каф., докт. фарм. наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.14, Российская Федерация
E-mail: polina.andreeva@pharminnotech.com

В данной статье отражены результаты разработки теста «Растворение», проводимого при фармацевтической разработке вагинальных суппозиториев. В ходе данного исследования были определены условия проведения теста «Растворение», а также рассмотрена его применимость для оценки качества разрабатываемой лекарственной формы.

Ключевые слова: *тест растворение, суппозитории вагинальные, спектрофотометрия, хлоргексидина биглюконат, лопастная мешалка, воспроизведённый лекарственный препарат.*

Фармацевтическая разработка – это начальный этап в производстве любого лекарственного препарата. При проведении фармацевтической разработки воспроизведенного (дженерикового) лекарственного препарата особое внимание необходимо уделить установлению его биоэквивалентности оригинальному препарату.

Цель данной работы – разработка теста «Растворение» для вагинальных суппозиториев на гидрофильной основе.

Тест «Растворение» необходим в т.ч. и для подтверждения того, что разработанный препарат эквивалентен оригинальному. Для определения количества вещества, переходящего в среду растворения из препарата, используются различные аналитические методики, особое внимание уделяется физико-химическим методам анализа, методом выбора из которых является УФ-спектрофотометрия.

Объектами исследования служили вагинальные суппозитории на гидрофильной основе трёх вариантов составов (табл. 1), а также оригинальный препарат – суппозитории «Депантол» производства АО «Нижфарм», Россия.

Таблица 1 – Варианты составов исследуемых суппозиториев

№ состава	Содержание компонентов, в граммах			
	Декспантенол	Хлоргексидина биглюконат	Макрогол 1500	Макрогол 400
№1	0,100	0,016	2,434	0,050
№2	0,100	0,016	2,285	0,199
№3	0,100	0,016	2,360	0,124
Депантол	0,100	0,016	2,285-2,434	0,050-0,199

Суппозитории изготавливали методом выливания по следующей технологии: на водяной бане расплавляли смесь макрогола 400 и макрогола 1500 при температуре не более 70°С, для удаления воздуха выдерживали 30 мин при температуре 45°С. Декспантенол и хлоргексидина биглюконат вводили в расплавленную основу, непрерывно помешивая стеклянной палочкой. Приготовленную суппозиторную массу разливали в ячейки ленты. Суппозиторную ленту помещали в холодильник с температурой 3-5°С на 7-10 мин, после чего извлекали суппозитории.

Тест растворения суппозиториев выполняли на приборе типа лопастная мешалка марки RC-6 китайской фирмы Tianjin Guoming Medicinal Equipment Co.ltd. Выбор данного типа прибора обосновывался возможностью его применения для суппозиториев на гидрофильной основе [1, 2].

В соответствии с ОФС «Суппозитории», для суппозиториев на гидрофильной основе проводят испытание в соответствии с ОФС «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм». Данная ОФС регламентирует параметры испытания: стандартная скорость вращения для прибора типа лопастная мешалка должна составлять 50 об/мин, объём среды растворения должен быть от 500 мл до 900 мл. Объём среды растворения (750 мл) был выбран исходя из того, что в данном количестве среды действующее вещество определяется наиболее точно. Для построения профилей растворения и сравнения высвобождения субстанции из различных составов суппозиториев, во время испытания отбирали пробы. При выборе точек времени для отбора проб ориентировались на рекомендации для твердых дозированных лекарственных форм: 15 мин, 30 мин и 45 мин, дополнительно были выбраны точки 5 мин – для контроля начала высвобождения, последняя – 60 мин для контроля завершения процесса растворения.

Таким образом, использовали следующие условия проведения испытания растворения:

- среда растворения: фосфатный буферный раствор с pH 4,5;
- температура растворения: (37 ± 0,5) °С;
- время растворения: 60 мин;
- скорость вращения лопастной мешалки: 50 об/мин;
- объём среды растворения: 750 мл;
- объём отбираемых проб: 5 мл;
- точки отбора проб: 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 60 мин.

Количество высвободившегося хлоргексидина биглюконата определяли методом УФ-спектрофотометрии на приборе СФ-2000 (Россия) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см.

Для приготовления рабочего стандартного образца (РСО) хлоргексидина биглюконата 0,085 мг хлоргексидина биглюконата растворяли в 750 мл фосфатного буферного раствора с pH 4,5.

Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 4,5 проводили в соответствии с ОФС.1.3.0003.15 Буферные растворы: 6,80 г калия дигидрофосфата растворяли в 1000,0 мл воды очищенной [3].

Тест растворения осуществлялся с использованием прибора типа «Лопастная мешалка». Перед началом эксперимента в каждый из 6 стаканов аппарата помещали определенный объём среды растворения. Выбор буферного раствора с pH 4,5 в качестве среды растворения был обусловлен значением pH среды в месте предполагаемого введения суппозитория. После этого доводили температуру среды растворения до 37 ± 0,5 °С. Затем помещали по одному суппозиторию в каждый стакан аппарата и запускали мешалку.

Пробы объемом 5 мл отбирали из каждого стакана для растворения в пяти временных точках: через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин и 60 мин после начала эксперимента. Объем восполняли соответствующим объемом растворителя. Пробы отфильтровывали через фильтровальную бумагу, раствор помещали в кварцевую кювету и снимали УФ-спектр в диапазоне от 200 нм до 400 нм. Количество высвободившегося хлоргексидина биглюконата определяли в максимуме поглощения при 253 нм [4]. В качестве раствора сравнения использовали фосфатный буферный раствор с pH 4,5.

Исследуемые суппозитории полностью растворились через 30 мин. На рисунке 1 представлены этапы растворения суппозиториев.

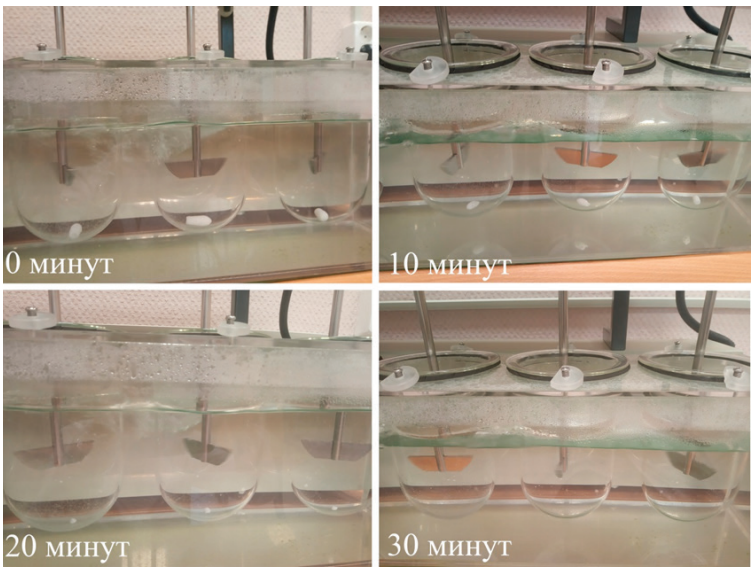


Рисунок 1. Этапы растворения суппозиториев

Результаты определения количества хлоргексидина биглюконата, перешедшего в среду растворения ко времени представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Количество хлоргексидина биглюконата (%), высвободившегося в раствор из суппозиториев различных составов

№ состава	Количество высвободившегося вещества, % к мин				
	5	15	30	45	60
№1	35,8±1,6	65,6±4,3	85,1±4,6	93,8±4,1	94,5±4,2
№2	37,1±1,9	72,0±3,3	93,1±2,8	96,6±2,4	102,8±5,0
№3	36,2±2,5	68,7±5,7	88,0±1,3	91,1±5,7	95,6±7,1
Депантол	37,6±6,3	65,0±3,8	83,9±6,7	94,6±4,7	99,4±6,7

На рисунке 2 представлены профили высвобождения хлоргексидина биглюконата из суппозиториев различных составов.

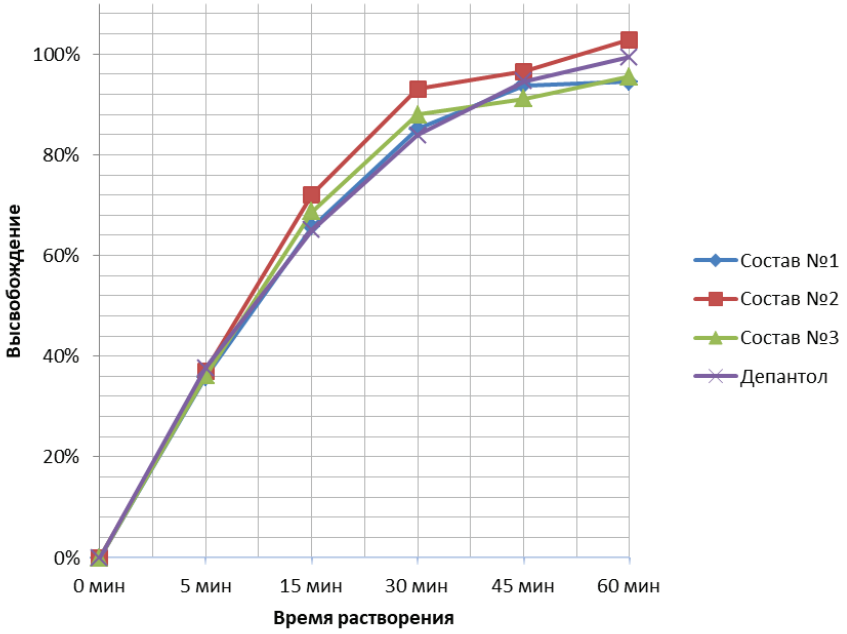


Рисунок 2. Профили высвобождения хлоргексидина биглюконата из вагинальных суппозиториев различных составов

Как следует из полученных данных, все составы суппозиториев прошли испытание «Растворение» и соответствуют требованиям ОФС «Растворение для твёрдых лекарственных форм» [5], так как за 45 мин в среду растворения высвободилось более 75% действующего вещества.

Для оценки биоэквивалентности разработанных суппозиториев оригинальному препарату были рассчитаны коэффициенты подобия (табл. 3) по следующей формуле:

$$f2 = 50 * \log\left[100 * \sqrt{\frac{1}{1 + \frac{1}{n} * \sum_{t=1}^{n}(R_i - T_i)^2}}\right],$$

где *f*2 – это коэффициент подобия, *n* – число временных точек отбора проб, R_i и T_i – процент растворившегося вещества из препарата сравнения и испытуемого препарата, соответственно, в каждый момент времени *i* [6].

Таблица 3 – Значения коэффициентов подобия профилей растворения исследуемых суппозиториев (препарат сравнения – суппозитории Депантол)

№ состава	№1	№2	№3
Коэффициент подобия	79	63	72

Так как для всех вариантов составов коэффициент подобия находится в границах от 50 до 100, их можно считать эквивалентными оригинальному препарату.

Разработана методика проведения теста «Растворение» для вагинальных суппозиториев, позволяющая получить достоверные данные об их эквивалентности оригинальному препарату по данному показателю. Определены следующие условия проведения теста «Растворение»:

- среда растворения: фосфатный буферный раствор с pH 4,5;
- температура растворения: (37 ± 0,5) °C;
- время растворения: 60 мин;
- скорость вращения лопастной мешалки: 50 об/мин;
- объём среды растворения: 750 мл;
- объём отбираемых проб: 5 мл;
- точки отбора проб: 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 60 мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Салова ВГ, Одинцова ЕБ, Козлова ЖМ. Сравнение методов определения высвобождения итраконазола из вагинальных суппозиториев. Медико-фармацевтический журнал «Пульс». 2020;22(6):79-83. DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-6-79-83

2. Brown C, Friedel H, Barker A, Buhse L, Keitel S, et al. FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. AAPS PharmSciTech. 2011;12(2):782-794. DOI: 10.1208/s12249-011-9634-x

3. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы». Доступно по: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/489/index.html

4. Адаменко ГВ. Валидация методики количественного определения хлоргексидина биглюконата в антисептическом лекарственном средстве. Вестник ВГМУ, 2019;18(1):72-77. DOI: 10.22263/2312-4156.2019.1.72

5. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм». Доступно по: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/349/index.html

6. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 N 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: http://docs.cntd.ru/document/456026107

SUMMARY

DEVELOPMENT OF THE DISSOLUTION TEST OF VAGINAL SUPPOSITORIES

Andreeva P.I., 2nd year master
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

This article describes the results of dissolution test development that was carried out in the process of pharmaceutical development of vaginal suppositories. In the course of this study, conditions for the dissolution test were determined, as well as its applicability in quality control of the drug under development.

Key words: *dissolution test, vaginal suppositories, spectrophotometry, chlorhexidine bigluconate, paddle mixer, generic drug.*

REFERENCES

1. Salova VG, Odincova EB, Kozlova ZHM. Cravnenie metodov opredeleniya vysvobozhdeniya itrakonazola iz vaginal'nyh suppozitoriev. Mediko-farmacevticheskij zhurnal «Pul's». 2020;22(6):79-83. DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-6-79-83 (in Russ)

2. Brown C, Friedel H, Barker A, Buhse L, Keitel S, et al. FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. AAPS PharmSciTech. 2011;12(2):782-794. DOI: 10.1208/s12249-011-9634-x

3. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd. Tom 1. OFS.1.3.0003.15 «Bufernye rastvory» Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/489/index.html (in Russ)

4. Adamenko GV. Validaciya metodiki kolichestvennogo opredeleniya hlorgeksidina biglyukonata v antisepticheskom lekarstvennom sredstve. Vestnik VGMU. 2019;18(1):72-77. DOI: 10.22263/2312-4156.2019.1.72 (in Russ)

5. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd. Tom 2. OFS.1.4.2.0014.15 «Rastvorenie dlya tvyordyh dozirovannyh lekarstvennyh form». Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/349/index.html (in Russ)

6. Reshenie Soveta Evrazijskoj ekonomicheskoj komissii ot 03.11.2016 N 85 «Ob utverzhdenii Pravil provedeniya issledovanij bioekvivalentnosti lekarstvennyh preparatov v ramkah Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza». Available at: http://docs.cntd.ru/document/456026107 (in Russ)

РАЗРАБОТКА ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ С ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ И ОБЕЗБОЛИВАЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ

Андрюшков П.А., студ. 4 курса
Руководитель: **Басевич А.В.**, к. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.14, Российская Федерация
E-mail: andryushkov.pavel@pharminnotech.com

Настоящее исследование посвящено созданию и изучению трансдермальной терапевтической системы (ТТС) с противовоспалительным и обезболивающим действием. В данной статье рассмотрен современный ассортимент ТТС в России, предложена технология получения ТТС, представлены первичные результаты модельных экспериментов разработки прототипов матричных трансдермальных пластырей с ибупрофеном.

Ключевые слова: *трансдермальный пластырь, трансдермальная терапевтическая система, ибупрофен, поливинилпирролидон, нестероидные противовоспалительные препараты, разработка, остеоартроз.*

За последнее десятилетие наблюдается тенденция увеличения роста численности заболеваемости населения Российской Федерации болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани. Согласно официальным данным Федеральной службы государственной статистики с 2010 по 2018 год число зарегистрированных заболеваний у пациентов выросло на 1305,4 тыс. человек и составило 19611,6 тыс. человек [1].

Первоначальным этапом лечения болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани является применение симптоматических средств быстрого действия, например, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). НПВП применяют для устранения боли и воспаления при ревматоидном артрите и других заболеваниях суставов, остеоартрите, заболеваниях внесуставных и мягких тканей, болях в нижней части спины, болевом синдроме слабой и средней тяжести после травм.

Данные лекарственные препараты существуют в различных лекарственных формах, однако, НПВП в виде трансдермальных пластырей имеют ряд преимуществ:

- Действующее вещество попадает в системны кровоток без нарушения кожного покрова;
- Сокращение кратности приема лекарственного препарата за счет длительности доставки действующих веществ;
- Обеспечение длительной и постоянной концентрации препарата в крови;
- Легкая регулировка дозировки за счет изменения площади пластыря;
- Возможность применения в бессознательном состоянии;
- Снижение терапевтической дозы благодаря отсутствию влияния желудочно-кишечного тракта;
- Быстрое действие по сравнению с пероральными препаратами;
- Возможность незамедлительного прекращения приема;
- Снижение побочных эффектов, направленных на желудочно-кишечный тракт;
- Удобство приема;
- Количество вспомогательных веществ значительно меньше по сравнению с мягкими лекарственными формами

Несмотря на это, ТТС имеют свои недостатки:

- Возможность появления аллергических реакций у людей с чувствительной кожей;
- Скорость действия ниже, чем у инъекционных форм;
- Ограниченный выбор действующих веществ, обусловленный особенностями проникновения через кожу.

Список ТТС, зарегистрированных в госреестре России представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Зарегистрированные в госреестре России ТТС

№ п/п	Торговое наименование	Международное непатентованное наименование	Фармакологическое действие	Страна держателя или владельца регистрационного удостоверения лекарственного препарата
1	Ньопро®	Ротиготин	противопаркинсоническое, дофаминомиметическое	Ирландия
2	Вольтарен®	Диклофенак	противовоспалительное местное, анальгезирующее местное	Россия
3	Никоретте	Никотин	н-холиномиметическое, снижающее никотиновую зависимость	Россия
4	Евра®	Норэлгестромин + Этинилэстрадиол	контрацептивное	Россия
5	Фентанил	Фентанил	седативное, обезболивающее	Россия
6	Экселон®	Ривастигмин	антихолинэстеразное	Швейцария
7	Фендивия	Фентанил	седативное, обезболивающее	Дания
8	Никотинелл®	Никотин	н-холиномиметическое, снижающее никотиновую зависимость	Россия
9	Никвитин®	Никотин	н-холиномиметическое, снижающее никотиновую зависимость	Болгария

В соответствии представленными в таблице 1 данными необходимо отметить, что в России зарегистрировано 7 трансдермальных терапевтических систем, а с противовоспалительным и обезболивающим эффектов всего лишь 1 (на основе диклофенака).

Таким образом, показано, что разработка нового препарата в виде трансдермального пластыря с обезболивающем и противовоспалительным действием является востребованной и актуальной.

Исходя из потребности в разработке ТТС с НПВП, вытекает цель работы – разработка нового оригинального лекарственного препарата с обезболивающем и противовоспалительным действием с трандсермальным путем доставки действующего вещества.

Для выполнения цели были решены следующие задачи:

• изучение ассортимента и выбор конкретных действующих и вспомогательных веществ;

• разработка технологии получения матричных трансдермальных пластырей;

• разработка системы оценивания полученных моделей;

• выбор наиболее удачных образцов и внесение корректив для дальнейшего получения состава с наилучшими свойствами.

Материалом для исследования служила фармацевтическая субстанция (ФС) ибупрофена и вспомогательные вещества различной направленности действия:

1. Структурообразователи: поливинилпирролидон (ПВП) (Коллидон BASF-90), гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ)

2. Пластификаторы: пропиленгликоль (ПГ)

3. Усилители пенетрации: диметилсульфоксид (ДМСО), аэросил

4. Растворители: спирт этиловый 96%, спирт этиловый 80%, спирт изопропиловый.

Для получения модельных образцов ТТС необходимое количество растворителя отмеряли в стеклянный стакан на 100 мл, добавляли пластификаторы, усилители пенетрации, и ибупрофен, стакан закрепляли на лабораторной мешалке с листовыми лопастями с перфорацией. Включали мешалку до полного растворения веществ. Частота вращения лопастей 20:30 об/мин. В последнюю очередь, в стакан с выключенной мешалкой вносили небольшими порциями полимеры и проводили гомогенизацию в течении 2-4 часов. При необходимости добавлялось дополнительное количество растворителя. В случае использования ГПМЦ, полимер сначала интенсивно диспергировали с частотой вращения мешалки 50-80 об/мин в течение 30 минут, после чего стакан накрывался герметично пленкой и оставлялся при комнатной температуре на 24 ч для набухания ГПМЦ, после чего проводилась гомогенизация раствора по вышеописанной методике. Гомогенизированные растворы подвергались вакуумированию при давлении 0.2 атм и далее отправлялись обратно на перемешивание. Цикл повторяется до устранения пузырьков воздуха в растворе. Растворы без пузырьков воздуха выливались на чашки Петри, в которые предварительно клали лист силиконизированной бумаги, соответствующий форме чаши. Полученная пластырная масса сушилась в сушильном шкафу при температуре 30°С в течение 24 ч. Силиконизированная бумага не являлась основной подложной ТТС, а служила способом снятия сухой матричной пленки для дальнейшего изучения.

Матричные основы оценивали органолептическим способом.

На первом этапе разработки состава и технологии ТТС получено 12 различных моделей с ибупрофеном. Подробный состав матриц представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Составы исследуемых матриц трансдермального пластыря

Компонент, %		Состав, №											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФС	Ибупрофен	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Структуро-образователи	ПВП	10	10	10	10	20	—	4	8	—	4	8	16
	ГПЦ	—	—	—	—	—	20	16	12	—	—	—	—
	ГПМЦ	—	—	—	—	—	—	—	—	20	16	12	4
Пластификаторы	Пропилен-гликоль	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Усилители пенетрации	ДМСО	—	—	—	12	—	—	—	—	—	—	—	—
	Аэросил	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Растворители	Спирт этиловый 96%	До 100	До 100	—	До 100	До 100	До 100	До 100	До 100	—	—	—	—
	Спирт этиловый 80%	—	—	—	—	—	—	—	—	До 100	До 100	До 100	До 100
	Спирт изопропиловый	—	—	До 100	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Для сравнения полученных моделей разработана система оценивания их органолептических свойств по следующим характеристикам: внешний вид, однородность, отсутствие микротрещин и разрывов, прозрачность, отсутствие пузырьков, пластичность, наличие адгезивных свойств. Результаты оценки модельных образцов трансдермального пластыря с ибупрофеном представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты исследования органолептических свойств модельных образцов.

№ состава	Пластырная масса	Матрица трансдермального пластыря
1	Однородная, низковязкая, прозрачная, без пузырьков	Однородная, прозрачная, отсутствуют микротрещины и разрывы, отсутствуют пузырьки, пластичная, выраженные адгезивные свойства
2	Однородная, низковязкая, мутная, без пузырьков	Видны включения аэросила, мутная, отсутствуют микротрещины и разрывы, отсутствуют пузырьки, пластичная, умеренно выраженные адгезивные свойства
3	Однородная, низковязкая, прозрачная, без пузырьков	Однородная, прозрачная, отсутствуют микротрещины и разрывы, отсутствуют пузырьки, пластичная, выраженные адгезивные свойства
4	Однородная, низковязкая, прозрачная, без пузырьков	Однородная, прозрачная, отсутствуют микротрещины и разрывы, отсутствуют пузырьки, пластичная, выраженные адгезивные свойства
5	Однородная, вязкая, прозрачная, без пузырьков	Однородная, прозрачная, отсутствуют микротрещины и разрывы, отсутствуют пузырьки, пластичная, сильно выраженные адгезивные свойства
6	Однородная, вязкая, прозрачная, без пузырьков	Однородная, прозрачная, отсутствуют микротрещины и разрывы, присутствуют пузырьки, высокая пластичность, слабо выраженные адгезивные свойства
7	Однородная, вязкая, мутная, без пузырьков	Однородная, мутная, отсутствуют микротрещины и разрывы, присутствуют пузырьки, высокая пластичность, умеренно выраженные адгезивные свойства
8	Однородная, вязкая, мутная, без пузырьков	Однородная, мутная, отсутствуют микротрещины и разрывы, присутствуют небольшое количество пузырьков, высокая пластичность, умеренно выраженные адгезивные свойства
9	Однородная, сильновязкая, мутная, без пузырьков	Неоднородная, прозрачная, присутствуют микротрещины и разрывы, присутствуют пузырьки, деформация краев с загибанием пленки, низкая пластичность, адгезивные свойства отсутствуют
10	Однородная, сильновязкая, мутная, без пузырьков	Однородная, прозрачная, присутствуют микротрещины и разрывы, отсутствуют пузырьки, деформация краев с загибанием пленки, низкая пластичность, слабо выраженные адгезивные свойства
11	Однородная, сильновязкая, мутная, без пузырьков	Неоднородная, поверхность усыпана крупными буграми, прозрачная, присутствуют микротрещины и разрывы, присутствуют пузырьки, деформация краев пленки, пластичная, умеренно выраженные адгезивные свойства
12	Однородная, вязкая, мутная, без пузырьков	Неоднородная, поверхность усыпана мелкими буграми, прозрачная, отсутсвуют микротрещины и разрывы, отсутствуют пузырьки, отсутствует деформация краев пленки, пластичная, выраженные адгезивные свойства

В результате приготовления образцов трансдермальных матричных пластырей было установлено, что наибольшими адгезионными свойствами (по тактильным ощущениям) обладают составы №1, №3, №4, №5, №12. В данных составах основным структурообразователем является ПВП, содержание которого превышает 10% от пластырной массы, что говорит о преимуществе перед ГПМЦ и ГПЦ. Состав №12 имеет высокую липкость, но при этом является неоднородным после высушивания. Предположительно такой результат связан с неблагоприятными условиям сушки, либо высоким содержанием спирта, так как ГМПЦ не растворимо в органических растворителях.

Наряду с этим стоить отметить, что изопропиловый спирт не влияет на адгезивные свойства и может заменять этиловый спирт 96%. Добавление ДМСО в количестве 12% также не повлияло на липкость трансдермального пластыря. Использование пропиленгликоля в количестве 10% позволило получить пластичные образцы, кроме составов с содержанием ГМПЦ выше 10%. Наибольшей пластичностью обладают модели с ГПЦ, но при содержании данного полимера в количестве выше 10% значительно снижаются адгезионные свойства.

Таким образом, составы №1, №3, №4, №5, №12 выбраны для дальнейшего исследования их физико-химических и фармакологических свойств. Полученные результаты исследования лягут в основу дальнейшей разработки наилучшего состава и усовершенствования технологии получения трансдермального пластыря с ФС ибупрофен.

Обоснована актуальность ТТС с противовоспалительным и обезболивающим действием. Сделан выбор вспомогательных веществ. Впервые разработана технология получения матричных трансдермальных пластырей с ибупрофеном в Российской Федерации. Разработана система оценивания органолептическим методом полученных моделей трансдермальных пластырей. Отобраны удачные составы (№1, №3, №4, №5, №12) с целью дальнейшего изучения их свойств, а также получены данные, которые позволят получить на последующем этапе исследования состав с наилучшими свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Здравоохранение в России 2019 Статистический сборник. Доступно по: https://rosstat.gov.ru/folder/210/document/13218 [Дата обращения – 07.02.2021]

2. Государственный реестр лекарственных средств РФ. Доступно по: http://grls.rosminzdrav.ru [Дата обращения – 07.02.2021]

3. Регистр лекарственных средств. России Доступно по: https://www.rlsnet.ru [Дата обращения – 10.02.2021]

4. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.1.0016.15 «Трансдермальные пластыри». Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A TRANSDERMAL THERAPEUTIC SYSTEM WITH ANTI-INFLAMMATORY AND ANALYSIS ACTION

Andryushkov P.A., 4rd year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The present study is devoted to the creation and study of a transdermal therapeutic system (TTS) with anti-inflammatory and analgesic effects. This article discusses the modern assortment of TTS in Russia, proposes a technology for obtaining TTS, presents the results of model experiments on the development of prototypes of matrix transdermal patches with ibuprofen.

Key words: *transdermal patch, transdermal therapeutic system, ibuprofen, polyvinylpyrrolidone, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, development, osteoarthritis.*

REFERENCES

1. Zdravoohranenie v Rossii 2019 Statisticheskij sbornik. Available at: https://rosstat.gov.ru/folder/210/document/13218 [Accessed 7 Fb, 2021]

2. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv RF. Available at: http://grls.rosminzdrav.ru [Accessed 7 Fb, 2021]

3. Registr lekarstvennyh sredstv Rossii. Available at: https://www.rlsnet.ru [Accessed 7 Fb, 2021]

4. Gosudarstvennaja farmakopeja RF XIV izd. Tom 2. OFS.1.4.1.0016.15 «Transdermal'nye plastyri». Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

ПРОТОННЫЕ ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАЛКИЛАММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БУФЕРНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ^{68}GA-МЕЧЕННЫХ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

Антуганов Д.О.[1], мол. ученый, **Надпорожский М.А.**[1], мол. ученый
Руководитель: **Кондратенко Ю.А.**[2], к.х.н., старший научный сотрудник
[1]ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ,
197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70
[2] Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН,
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 2, Российская Федерация
E-mail: dmantuganov@gmail.com

Впервые показано, что гидроксиалкиламмониевые соли биологически активных карбоновых кислот являются перспективными буферными агентами для получения комплексов изотопа галлий-68 с высокой радиохимической конверсией. Проведен скрининг более 70 соединений, включая соли трис(2-гидроксиэтил)аммония, трис(гидроксиметил)метил аммония, *N*-фенил-

бис(2-гидроксиэтил)аммония и трис(2-гидроксипропил)аммония. Гидроксиалкиламмониевые буферы [TEA]Benz, [TEA]Crez и [TPA]ClCrez оказались наиболее эффективными в реакциях ^{68}Ga-радиомечения в низкотемпературных условиях. Их эффективность значительно превосходит эффективность коммерчески доступного и широко используемого буфера HEPES. Возможность внедрения данной технологии в клиническое производство ^{68}Ga-радиофармпрепаратов в данный момент изучается.

Ключевые слова: *ПЭТ, ядерная медицина, радиофармпрепараты, изотоп галлия-68, буферные агенты, гидроксиалкиламмониевые соли, протонные ионные жидкости.*

Получение радиофармацевтических препаратов (РФП) на основе изотопа галлий-68 в настоящее время является одним из драйверов развития позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). ПЭТ относится к высокотехнологичному методу ядерной медицины, который позволяет отслеживать с помощью ПЭТ-сканера распределение в организме биологически активных соединений, меченных позитрон-излучающим радиоизотопом, входящим в состав радиофармацевтического препарата (РФП), который введен в организм перед исследованием. Высокая востребованность РФП на основе изотопа ^{68}Ga в ПЭТ связана с доступными, простыми и относительно недорогими способами получения радионуклида ^{68}Ga, возможностями для его прямого введения в структуры разнообразных молекул, достаточному для диагностических целей периоду полураспада ^{68}Ga (≈ 68 мин) и др. Одним из основных применений, меченных ^{68}Ga пептидов, является диагностика рака предстательной железы с помощью ПЭТ-визуализации простат-специфического мембранного антигена (PSMA) и нейроэндокринных опухолей (НЭО), новообразований, характеризующихся сверхэкспрессией соматостатиновых рецепторов (SSTR) [1,2]. Изотоп ^{68}Ga может быть легко получен из коммерчески доступных генераторов ^{68}Ge/^{68}Ga или путем облучения мишени из обогащенного ^{68}Zn на медицинских циклотронах средней энергии. Одним из преимуществ катиона [^{68}Ga]Ga^{3+} является его способность образовывать комплексы с пептидами и другими биомолекулами, содержащими *N*- или *O*-донорные атомы.

Для создания оптимальных условий введения изотопа в структуру пептидов необходимо подобрать буферный раствор, который бы обеспечивал протекание реакции с высокими выходами. Продукты фармакопейного качества должны быть получены с радиохимической чистотой (РХЧ) не менее 91% и при содержании примесей в виде «коллоидного» ^{68}Ga не более 3% и [^{68}Ga]Ga^{3+} менее 2%.

В настоящий момент наиболее широкое применение нашло соединение импортного производства 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновая кислота или HEPES. Преимущество данного буфера широко описано во многих исследованиях, но при этом данное вещество является токсичным. Например, Европейская фармакопея определяет 200 мкг буфера как предельно допустимую суточную норму HEPES в растворах для парентерального введения. В связи с этим актуальным является разработка новых соединений на основе малотоксичных гидроксиалкиламинов и биологически активных карбоновых кислот – гидроксиалкиламмониевых солей. Гидроксиалкиламмониевые соли на основе трис(2-гидроксиэтил)амина (TEA) широко известны как протатраны и характеризуются уникальным (трициклическим, атрановым) строением катиона. Их широкие исследования начались еще в 70-х годах прошлого столетия под руководством академика М.Г. Воронкова и привели к открытию их специфической биологической активности. В частности, трис(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 2-метилфеноксиуксусной кислоты оказалась малотоксичным соединением с выраженным иммуномодулирующим и адаптогенным действием [3]. Трекрезан зарегистрирован в Федеральном реестре лекарственных препаратов и разрешен для применения на территории РФ.

Цель настоящей работы заключается в разработке новых более усовершенствованных подходов и методов радиомечения биомолекул изотопом галлий-68, которые позволили бы получать радиофармацевтические препараты с высокой конверсией (> 95 %) без образования побочных продуктов ($^{68}GaCl_3$, сорбции ионов $^{68}Ga^{3+}$ и др.).

Целевые гидроксиалкиламмониевые соли – трис(2-гидроксиэтил)аммония (TEA), трис(гидроксиметил)метил аммония (TRIS), *N*-фенил-бис(2-гидроксиэтил)аммония (PDA) и трис(2-гидроксипропил)аммония (TPA) для изучения их буферной активности были получены по известной методике [4] взаимодействием соответствующего гидроксиалкиламина с карбоновой кислотой в спиртовой среде и выделены в виде порошков или вязких маслянистых жидкостей после упаривания растворителя при пониженном давлении. Их состав и строение были подтверждены данными ИК, ЯМР спектроскопии и элементного анализа.

Остальные химические реактивы были получены из коммерческих источников (Honeywell-Fluka, Macrocyclics, Chematech, Merck, Фарм-Синтез.LAB, Agilent) и использованы без предварительной очистки. ^{68}Ga ($T_{1/2}$ = 68 мин) был получен из генератора ^{68}Ge/^{68}Ga (ЗАО «Циклотрон», Россия) и очищен методом фракционирования элюата.

Получение меченных галлием пептидов и бифункциональных хелатирующих агентов (БХА): 10 мкг предшественника (пептид/БХА) растворяли в 100 мкл 1 М водного раствора гидроксиалкиаммониевого буфера и 150 мкл органического растворителя (этанол/ацетон). К полученной смеси добавляли аликвоту 500 мкл [^{68}Ga]$GaCl_3$. Реакцию проводили при 37 °C, 10-20 мин (с ацетоном) при перемешивании 1000 RPM или при 95-100 °C, 10 мин без перемешивания. Радиохимическую конверсию (РХК) определяли методом радио-ТСХ на пластинах iTLC-SG (Элюент: 1M NH_4Ac/MeOH = 1:1; R_f's: ^{68}Ga в коллоидной форме – 0.0, ион [^{68}Ga] Ga^{3+} – 0.0 and продукт – 0.6-0.9). Все эксперименты повторяли как минимум 3 раза.

На первом этапе работы в качестве модельной молекулы с хелатирующей группой был выбран пептид PSMA-11. Эффективность TEA и TRIS солей в качестве буферов в реакциях радиомечения была продемонстрирована при использовании разных методов очистки изотопа ^{68}Ga с генератора: фракционирование (отбор фракций, содержащих максимальное количество активности), катионообменное (с использованием растворов NaCl, ацетона или этанола) и анионообменное концентрирование. Опытным путем на примере буфера TEA бензоата (TEA[Benz]) было установлено,

что оптимальной концентрацией является 1 моль/л (1 М), которая была использована в синтезах РФП [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 (табл. 1). При использовании фракционирования в качестве метода очистки элюата с генератора и 1 М водного раствора бензоата ТЕА (pH = 6.1) в качестве буфера удалось получить РФП [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 с высокой РХК (99.0±0.8 %). При использовании очистки элюата с помощью NaCl для пептида PSMA-11 РХК для комплекса [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 составила 93.5±0.7 %. Использование метода очистки элюата на основе ацетона и этанола для синтеза [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 приводит к РХК – 93.9±2.9 % и 99.9±0.1 %, соответственно. При очистке изотопа ^{68}Ga на слабых анионообменных сорбентах (WAX) с использованием буфера бензоата ТЕА РХК достигает 98.6±0.6 %. Кроме ТЕА бензоата высокая РХК для комплекса [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 была достигнута при использовании трекрезана в качестве буфера. В случае солей двухосновных кислот РХК были значительно меньше 90 % и при использовании ТЕА и TRIS солей щавелевой и малоновой кислот оказались практически равными нулю. В данном случае низкую РХК можно объяснить высокой тенденцией изотопа 68-галлия к образованию комплексов с анионами этих кислот.

Таблица 1 – Зависимость РХК образования комплекса [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 от концентрации буфера (PSMA-11 – 5 мкг; 100 °C, 10 мин)

№	Буфер*	C, M	$^{68}Ga^{3+}$	^{68}Gaкол., %	^{68}Ga-PSMA, %
1	TEABenz	1	0.5±0.4	0.5±0.4	99.0±0.8
2	TEABenz	0.5	60.4±7.7	15.0±11.2	24.6±6.8
3	TEABenz	0.25	97.7		2.3
4	TEABenz	0.1	99.6		0.4
5	TEACin	1	0.5±0.4	0.5±0.4	99.0±0.8
6	TEACin	0.5	60.4±7.7	15.0±11.2	24.6±6.8
7	TEASal	1	0.5±0.4	0.5±0.4	99.0±0.8
8	TEASal	0.5	60.4±7.7	15.0±11.2	24.6±6.8

*Benz – бензоат; Cin – циннамат; Sal – салицилат

На втором этапе работы эффективность гидроксиалкиламмониевых буферов была продемонстрирована в условиях как высокотемпературного, так низкотемпературного радиомечения на примере DOTA-модифицированных хелаторов и пептидов. В качестве гидроксиалкиламмониевых катионов были выбраны ТЕА, TRIS и PDA. На основе предыдущих результатов с PSMA-11 в качестве анионов были выбраны: бензоат (Benz), циннамат (Cin), салицилат (Sal), ацетилсалицилат (AcSal), 2-метилфеноксиацетат (Crez), 4-хлор-2-метилфеноксиацетат (ClCrez), сукцинат (Suc) и гидросукцинат (HSuc). Как ожидалось, образование комплекса ^{68}Ga-DOTA-Bn-*p*-SCN с высокими РХК (>88%) было достигнуто при использовании следующих алканоламмониевых буферов: [TEA]Benz, [TRIS]Benz и [PDA]Benz. В случае солей коричной и салициловой кислоты значения РХК варьировались от низких ([TEA]Sal, [TRIS]Sal) до средних ([TEA]Cin, [PDA]Sal) и в некоторых случаях составили почти 90% ([TRIS]Sal) (табл. 2). РХК, близкая к 100 %, наблюдалась в буферах Crez и ClCrez. К сожалению, для сукцинатных буферов высокие значения РХК были получены только для [PDA]HSuc и [TEA] Suc; в остальных случаях выходы были почти нулевыми.

Таблица 2 – ^{68}Ga-радиомечение p-SCN-Bn-DOTA в алканоламмониевых буферах (10 мкг p-SCN-Bn-DOTA, 100 мкл 1 М водного раствора буфера, 150 мкл EtOH, 500 мкл [^{68}Ga]$GaCl_3$ в 0.1 М HCl с генератора, 95°C, 10 мин)

РХК, %			
Анион (X-)	Катион		
	TEA	TRIS	PDA
Benz	97.5±0.7	88.9±3.1	96.4±0.7
Cin	74.9±12.1	89.6±4.2	–
Sal	34.6±0.4	23.6±3.3	73.3±1.1
AcSal	95.7±0.6	88.2±3.4	88.9±3.1
Crez	98.7±0.1	98.2±0.2	95.0±1.3
ClCrez	97.6±0.1	91.2±4.0	98.2±0.5
HSuc	0	11.8±1.0	89.3±6.9
Suc	0	14.0±4.1	94.2±0.1

Для оценки эффективности разработанного подхода было проведено радиомечение изотопом галлия-68 клинически одобренных пептидов DOTA-NOC и DOTA-TATE в среде наиболее оптимальных алканоламмониевых буферов: [TEA]Benz, [PDA]Benz, [TEA]AcSal, [TEA]Crez, [TRIS]Crez, [PDA]Crez, [TEA]ClCrez, [PDA]ClCrez и [PDA]Suc (табл. 3). Во всех случаях радиохимическая конверсия оказалась выше 90 % за исключением радиомечения пептида DOTA-TATE в буферах [TEA]AcSal и [PDA]ClCrez, где РХК была ниже 50%.

Таблица 3 – ^{68}Ga-радиомечение пептидов DOTA-TATE и DOTA-NOC в буферах [TEA]Benz, [PDA]Benz, [TEA]AcSal, [TEA]Crez, [TRIS]Crez, [PDA]Crez, [TEA]ClCrez, [PDA]ClCrez и [PDA]Suc (10 мкг DOTA-NOC или DOTA-TATE, 100 мкл 1 М водного раствора буфера, 150 мкл EtOH, 500 мкл [^{68}Ga]GaCl$_3$ в 0.1 М HCl с генератора, 95 °C, 10 мин)

РХК, %		
Буфер	**DOTA-TATE**	**DOTA-NOC**
[TEA]Benz	96.8±0.5	96.5±2.1
[PDA]Benz	97.2±0.1	96.1±0.1
[TEA]AcSal	43.7±5.5	89.7±0.7
[TEA]Crez	98.7±0.4	95.2±1.3
[TRIS]Crez	98.7±0.7	96.0±0.4
[PDA]Crez	95.7±0.8	95.7±2.8
[TEA]ClCrez	49.7±4.8	94.2±0.4
[PDA]ClCrez	91.2±1.2	89.1±0.2
[PDA]Suc	93.7±1.0	90.1±1.9

Далее мы проверили возможность образования комплексов ^{68}Ga с DOTA-модифицированными хелаторами в условиях низкотемпературного радиомечения (37 °C) в среде алканоламмониевых буферов. Удивительно, комплекс ^{68}Ga-DOTA-Bn-pSCN был получен с 80% выходом в среде буфера [TEA]Benz в условиях низкотемпературного радиомечения. Мы предположили, что трис(2-гидроксиэтил)аммоний бензоат действует в сочетании с EtOH, который, как известно из литературных данных, ускоряет образование DOTA-комплекса [5]. Чтобы убедиться в этом, мы впервые исследовали влияние добавок различных органических растворителей на образование комплексов [^{68}Ga]Ga-DOTA-Bn-pSCN и [^{68}Ga]Ga-DOTA-NOC в среде буфера [TEA]Benz. В качестве органических растворителей были выбраны спирты (MeOH, EtOH, PrOH, *u*-PrOH, *n*-BuOH, *m*-BuOH), диметилсульфоксид (ДМСО), *N,N*-диметилацетамид (ДМАА), *N*-метил-2-пирролидон (НМП), ацетон и ацетонитрил.

Как результат, не только EtOH, но и MeOH, PrOH, *u*-PrOH, ДМСО, ацетон и ацетонитрил в качестве сорастворителей могут ускорить образование комплекса ^{68}Ga-DOTA. По нашим данным, предпочтительно добавление 150 мкл органического растворителя. РХК были ниже в реакциях с добавлением 10% или 30% органического сорастворителя. Однако в реакции ^{68}Ga-радиомечения пептида DOTA-NOC, наиболее перспективными сорастворителями оказались только ацетон и ацетонитрил. Основываясь на этих данных, мы протестировали буферы [TEA]Benz, [PDA]Benz, [TEA] AcSal, [TEA]Crez, [TRIS]Crez, [PDA]Crez, [TEA]ClCrez, [PDA]ClCrez и [PDA]Suc, для нахождения наиболее оптимальных условий для достижения высоких значений РХК. В результате наиболее эффективными оказались буферы [TEA]Benz и [TEA]Crez (Трекрезан) с добавлением ацетона или ацетонитрила в качестве сорастворителей в условиях низкотемпературного радиомечения. Для других алканоламмониевых солей выходы были значительно ниже (< 55%). В связи с этим мы решили использовать ацетон в качестве сорастворителя (из-за его низкой токсичности по сравнению с ацетонитрилом), а также [TEA]Benz и [TEA]Crez в качестве буферов для низкотемпературного ^{68}Ga-радиомечения.

Наш новый разработанный метод низкотемпературного радиомечения был опробован для следующих пептидов: DOTA-NOC, DOTA-TATE, PSMA-617, а также PSMA-11 (пептид с ациклическим хелатором HBED). Мы изучили зависимость РХК образования ^{68}Ga-комплексов от природы буфера ([TEA]Benz, [TEA]Crez или HEPES), времени реакции (10, 15 или 20 мин) и массы предшественника (10, 20 или 30 мкг). По нашим данным (табл. 4), для DOTA-NOC, DOTA-TATE и PSMA-617 РХК более 85% были достигнуты через 15 мин при использовании только 30 мкг пептида в среде буфера [TEA]Benz или [TEA]Crez. В этом случае РХК в буфере [TEA]Benz несколько выше, чем в буфере [TEA]Crez. В случае широко используемого буфера HEPES РХК образования ^{68}Ga-DOTA-NOC был значительно ниже (53,3 ± 2,5%) при аналогичных условиях реакции. Для радиомечения PSMA-11 после 15-минутной инкубации с 20 мкг прекурсора в среде [TEA]Benz и [TEA]Crez буфера мы достигли самых высоких РХК (> 97%).

Таблица 4 – Низкотемпературное ^{68}Ga-радиомечение DOTA-NOC, DOTA-TATE, PSMA-617 и PSMA-11 в буферах [TEA]Benz и [TEA]Crez с добавлением ацетона в качестве сорастворителя (10–30 мкг пептида, 100 мкл 1 М водного раствора буфера [TEA]Benz или [TEA]Crez, 150 мкл ацетона, 500 мкл [^{68}Ga]GaCl$_3$ в 0.1 М HCl с генератора, 37 °C, 10–20 мин)

Пептид	Буфер	t, мин	Масса, мкг	РХК, % (n=3)
DOTA-NOC	[TEA]Benz	10	10	47.0±0.8
DOTA-NOC	[TEA]Benz	10	20	52.2±3.7
DOTA-NOC	[TEA]Benz	10	30	76.3±2.1
DOTA-NOC	[TEA]Benz	15	30	84.1±0.7
DOTA-NOC	[TEA]Benz	20	30	86.5±1.6
DOTA-NOC	[TEA]Crez	20	30	82.2±1.0
DOTA-NOC	HEPES	15	30	53.3±2.5

Пептид	Буфер	t, мин	Масса, мкг	РХК, % (n=3)
DOTA-TATE	[TEA]Benz	15	30	93.5±0.8
DOTA-TATE	[TEA]Crez	15	30	80.5±3.7
PSMA-617	[TEA]Benz	15	30	91.0±0.4
PSMA-617	[TEA]Crez	15	30	84.0±1.9
PSMA-11	[TEA]Benz	15	20	97.8±0.3
PSMA-11	[TEA]Crez	15	20	98.2±0.9

Скрининг ТРА солей в реакциях ^{68}Ga-радиомечения на примере хелатора *p*-SCN-Bn-DOTA показал, что наиболее оптимальными буферами являются [TPA]Benz, [TPA]Sal и [TPA]ClCrez, которые в дальнейшем и были выбраны для проведения реакций с циклическими и ациклическими БХА. Реакции ^{68}Ga-радиомечения в ТРА буферах проводили при температурах 37-95 °C. Результаты ^{68}Ga-радиомечения приведены в таблице 5. Как и в случае с *p*-SCN-Bn-DOTA, высокие РХК в буферах [TPA]Benz, [TPA]Sal и [TPA]ClCrez были получены для циклических хелаторов *p*-NCS-Bz-DOTA-GA, *p*-SCN-Bn-NOTA, *p*-NCS-бензил-NODA-GA и NCS-MP-NODA.

Для ациклических хелаторов были получены неоднозначные результаты. Так, для *p*-SCN-Bn-DTPA РХК не превышала 27 % во всех случаях. Для *p*-SCN-Bn-DFO мы получили низкие выходы в среде буфера [TPA]Sal, в то время как в [TPA]Benz и [TPA]ClCrez РХК составляли более 85%. Удивительно, но для хелатора HBED наблюдался противоположный эффект, но РХК были почти количественными в буферах [TPA]Benz и [TPA]ClCrez при нагревании 70 °C (табл. 5).

После этого была проведена серия экспериментов с некоторыми клинически значимыми пептидами: PSMA-11, PSMA-617, DOTA-NOC, DOTA-TATE. В результате трис(2-гидроксипропил)аммония 2-метил-4-хлорфеноксиацетат оказался наиболее оптимальным буфером для реакций ^{68}Ga-радиомечения пептидов. В среде данного буфера комплексы ^{68}Ga–пептид были получены с РХК более 90% во всех случаях (табл. 5). Интересно, что в среде буфера [TPA]Benz реакции с пептидом PSMA-617 не наблюдалось, но с другими DOTA-конъюгированными пептидами выходы были почти количественными. Высокие выходы комплекса [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 были получены в буфере [TPA]Sal, но для DOTA-конъюгированных пептидов они не превышали 70%.

Таблица 5 – ^{68}Ga-радиомечение хелаторов и пептидов в буферах [TPA]Benz, [TPA]Sal и [TPA]ClCrez (10 мкг *p*-SCN-Bn-DOTA, 100 мкл 1М водного раствора буфера, 150 мкл EtOH, 500 мкл [^{68}Ga]$GaCl_3$ в 0.1М HCl с генератора, T °C, 10 мин)

№	Прекурсор	T °C	РХК, % в буферах [TPA]Benz, [TPA]Sal и [TPA]ClCrez		
			[TPA]Benz	[TPA]Sal	[TPA]ClCrez
1	*p*-SCN-Bn-DOTA	95	97.6±0.9	79.1±7.6	93.8±0.9
2	*p*-NCS-Bz-DOTA-GA	95	97.6±0.7	91.7±4.7	95.5±2.5
3	*p*-SCN-Bn-NOTA	70	99.8±0.4	98.6±0.6	94.1±3.1
4	*p*-NCS-benzyl-NODA-GA	70	99.1±0.8	97.4±0.8	91.0±2.4
5	NCS-MP-NODA	70	91.8±0.8	92.8±1.7	97.6±1.2
6	*p*-SCN-Bn-DTPA	37	***14.2±3.6***	***26.5±3.8***	***18.9±4.9***
7	*p*-SCN-Bn-DFO	37	90.6±8.1	30.3±4.3	85.9±2.0
8	HBED	37	***0***	92.9±6.2	***0***
9	HBED	70	96.8±0.3	-	90.7±7.6
10	PSMA-11	37	89.0±2.3	96.1±2.7	***10.7±5.1***
11	PSMA-11	70	-	-	93.8±4.3
12	PSMA-617	95	***0***	***66.5±15.5***	96.9±0.9
13	DOTA-NOC	95	96.5±0.7	***43.6±2.6***	94.9±1.1
14	DOTA-TATE	95	97.3±1.2	***62.3±4.1***	96.2±0.3

Таким образом, разработан новый усовершенствованный подход ^{68}Ga-радиомечения, который заключается в использовании в качестве буферов гидроксиалкиламмониевых солей карбоновых кислот. Проведен скрининг гидроксиалкиламмониевых солей (более 70 соединений) в реакциях ^{68}Ga-радиомечения бифункциональных хнлаторов и клинически значимых пептидов. Разработанный в данной работе подход позволил в короткие сроки получить ^{68}Ga-DOTA-модифицированные хелаторы и пептиды в среде гидроксиалкиламмониевых буферах без необходимости нагрева реакционных сред до высоких температур (t= 37 °C). Исследование влияния органических сорастворителей на низкотемпературное радиомечение показало, что наиболее перспективным сорастворителем для этих целей является ацетон. Гидроксиалкиламмониевые буферы [TEA]Benz, [TEA]Crez и [TPA]ClCrez оказались наиболее эффективными в реакциях ^{68}Ga-радиомечения в низкотемпературных условиях. Их эффективность значительно превосходит эффективность коммерчески доступного и широко используемого буфера HEPES. Возможность внедрения данной технологии в клиническое производство ^{68}Ga-радиофармпрепаратов в данный момент изучается.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-73-00033).

ЛИТЕРАТУРА

1. Eder M, Neels O, Müller M, et. al. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer, Pharmaceuticals. 2014;7(7):779-796. DOI: 10.3390/ph7070779.

2. Werner RA, Weich A, Kircher M, et. al. The theranostic promise for Neuroendocrine Tumors in the late 2010s – Where do we stand, where do we go? Theranostics. 2018;8(22):6088-6100. DOI: 10.7150/thno.30357.

3. Воронков МГ, Расулов ММ. Трекрезан – родоначальник нового класса адаптогенов и иммуномодуляторов. ХФЖ. 2007;41(1):3-7. DOI: 10.1007/s11094-007-0001-x.

4. Кондратенко ЮА, Кочина ТА, Фундаменский ВС и др. Триэтаноламмониевые соли биологически активных карбоновых кислот. ЖОХ. 2015;85(12):1978-1983. DOI: 10.1134/S1070363215120075.

5. Meisenheimer M, Kürpig S, Essler M, et. al. Ethanol effects on 68Ga-radiolabelling efficacy and radiolysis in automated synthesis utilizing NaCl post-processing. EJNMMI Radiopharm. Chem. 2019;4:26. DOI: 10.1186/s41181-019-0076-1

SUMMARY

PROTIC IONIC LIQUIDS BASED ON HYDROXYALKYLAMMONIUM SALTS – PROMISING BUFFERING AGENTS FOR THE PRODUCTION OF ^{68}GA-LABELED RADIOPHARMACEUTICALS

Antuganov D.O.[1], young sci., Nadporojskii M.A.[1], young sci., Kondratenko Yu.A.[2]
[1] Granov Russian Research Center of Radiology & Surgical Technologies,
Leningradskaya Street 70 Pesochny, St. Petersburg 197758, Russian Federation
[2] Grebenshchikov Institute of Silicate Chemistry RAS,
nab. Makarova, 2, St. Petersburg 199034, Russia

It was shown for the first time that hydroxyalkylammonium salts of biologically active carboxylic acids are promising buffering agents for the preparation of gallium-68 labeled complexes with the high radiochemical conversion. More than 70 compounds were screened, including tris(2-hydroxyethyl)ammonium salts, tris(hydroxymethyl)methyl ammonium, *N*-phenyl-bis(2-hydroxyethyl) ammonium, and tris(2-hydroxypropyl)ammonium. Hydroxyalkylammonium buffers [TEA] Benz, [TEA] Crez, and [TPA] ClCrez were found to be most effective in ^{68}Ga-radiolabeling reactions under low-temperature conditions. Their effectiveness is far superior to that of the commercially available and widely used HEPES buffer. The possibility of introducing this technology into the clinical production of ^{68}Ga-radiopharmaceuticals is currently being studied.

Key words: *PET, nuclear medicine, radiopharmaceuticals, gallium-68, buffering agents, hydroxyalkylammonium salts, protic ionic liquids.*

REFERENCES

1. Eder M, Neels O, Müller M, et. al. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer, Pharmaceuticals. 2014;7(7):779-796. DOI: 10.3390/ph7070779.

2. Werner RA, Weich A, Kircher M, et. al. The theranostic promise for Neuroendocrine Tumors in the late 2010s – Where do we stand, where do we go? Theranostics. 2018;8(22):6088-6100. DOI: 10.7150/thno.30357.

3. Voronkov MG, Rasulov MM, Trecrezan: Progenitor of a new class of adaptogens and immunomodulators. Pharm. Chem. J. 2007;41:1–6. DOI: 10.1007/s11094-007-0001-x. (In Russ)

4. Kondratenko YuA, Kochina TA, Fundamensky VS, et. al. Triethanolammonium Salts of Biologically Active Carboxylic Acids. Russ. J. Gen. Chem. 2015;85(12):2710-2714. DOI: 10.1134/S1070363215120075. (In Russ)

5. Meisenheimer M, Kürpig S, Essler M, et. al. Ethanol effects on 68Ga-radiolabelling efficacy and radiolysis in automated synthesis utilizing NaCl post-processing. EJNMMI Radiopharm. Chem. 2019;4:26. DOI: 10.1186/s41181-019-0076-1.

ФИЛЬТРОВАНИЕ В РЕЖИМЕ ПЕРЕМЕННОГО ПЕРЕПАДА ДАВЛЕНИЯ

Банайтис Р.П., студ. 4-го курса
Руководитель: **Александрова Л.Ю.**, преподаватель
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: banajtis.roman@pharminnotech.com

В ходе данной работе получена аналитическая зависимость в безразмерных параметрах для процесса фильтрования в режиме изменяющегося перепада давления, отражающая влияние расхода суспензии, подаваемой центробежным насосом, на перепад давления в системе.

Ключевые слова: *фильтр, насос, расход, давление, кривые фильтрования, теория размерности.*

На практике процесс фильтрования производится под давлением, которое сообщает насос, из этого следует, что перепад давления зависит от расхода суспензии и может изменяться во времени. Проанализировав литературные источники в области фильтрования, не было выявлено аналитической зависимости, описывающей процесс в режиме перепада давления. Исходя из этого, нахождение уравнения, отражающего проведение процесса в данных условиях, и упрощение его решения, за счет введения безразмерных параметров, является целью данной работы.

При анализе фильтрования в литературе традиционно выделяют два режима: фильтрование при постоянном перепаде давления и фильтрование при постоянной скорости процесса [1, 2]. Однако при фильтровании под давлением, которое обеспечивает насос, перепад давления оказывается зависящим от расхода фильтрата [1, 3].

В данном сообщении используем аппроксимацию зависимости перепада давления при фильтровании Δp (Па) (движущей сила процесса) от объемного расхода Q фильтрата через фильтр, ($м^3/с$), достаточно точно обеспечивающую типичную характеристику центробежного насоса [4].

Основное уравнение фильтрации возьмем в традиционной форме

$$Q = \frac{dV}{dt} = \frac{A\Delta p}{\mu R}, \tag{1}$$

где V – объем пропущенного через фильтр фильтрата, (м3); t – время, (с); A – площадь поверхности фильтрования, ($м^2$); μ – коэффициент динамической вязкости, (Па ·с); R – сопротивление фильтрованию ($м^{-1}$), которое является суммой сопротивления фильтрующей перегородки R_f и осадка R_c: $R = R_f + R_c$.

В работе [3], когда перепад давления при фильтровании меняется во времени в процессе фильтрования, предлагается использовать зависимость $\Delta p = f(t)$ для расчета процесса фильтрования по уравнению (1). Подобный подход требует дополнительной экспериментальной работы.

Величина Δp существенно зависит от организации процесса фильтрования. Здесь мы используем соотношение

$$\Delta p = a + bQ - mQ^2 \tag{2}$$

где a, b, c – постоянные. Соотношение предложено в работе [4]. Данная зависимость представляет собой аппроксимацию типичных характеристик центробежного насоса [3] на достаточно большом интервале $Q \in [0, Q_{max}]$. Отметим, что расход фильтрата однозначно связан с расходом суспензии, подаваемой насосом. Для параметра R_c возьмем обычную зависимость: $R_c = \alpha CV/A$, где α – удельное сопротивление осадка (м/кг); C – постоянная, связанная с концентрацией твердой фазы в суспензии ($кг/м^3$).

Удобно выразить объем фильтрата V через переменные Q и Δp:

$$V = \frac{A}{\alpha\mu C}\left(\frac{A\Delta p}{Q} - \mu R_f\right). \tag{3}$$

Все описанные физические величины считаются неотрицательными. Упрощение записи предложенных зависимостей целесообразно, для наглядности, провести в два этапа. На первом этапе введем следующие параметры:

$$\beta = \frac{bA^2}{\alpha\mu C}, \quad \gamma = \frac{aA^2}{\alpha\mu C}, \quad \kappa = \frac{mA^2}{\alpha\mu C}, \quad r = \frac{AR_f}{\alpha C}. \tag{4}$$

В таком случае функцию (3) при помощи зависимостей (2) и (4) можно записать так

$$V(Q) = \frac{\gamma + \beta Q - \kappa Q^2}{Q} - r. \tag{5}$$

Для дальнейшего целесообразно из уравнения (5) выразить Q через V, что несложно сделать, поскольку (5) – квадратное уравнение относительно Q. В результате, выбирая имеющий физический смысл положительный корень уравнения (5), получим

$$Q(V) = \frac{2\gamma}{\sqrt{(V + r - \beta)^2 + 4\gamma\kappa} + V + r - \beta}. \tag{6}$$

Подобная (нетрадиционная) запись решения квадратного уравнения предпочтительна для вычислительных целей, когда переменная V достаточно велика (в определенном смысле).

Уравнение (1) дополним естественным начальным условием

$$V(0) = 0 \tag{7}$$

В силу однозначности связи функций Q и V (5), (6), это условие определяет также начальное условие для функции Q: $Q(0)$.

Уравнение (1) при учете соотношения (6) представляет собой уравнение с разделяющимися переменными. Однако проще найти квадратуру в терминах переменных t и Q. Имеем

$$\begin{aligned} t &= \int_0^V \frac{dV}{Q} = \int_{Q(0)}^{Q(V)} \frac{1}{Q}\left(-\frac{\gamma}{Q^2} - \kappa\right) dQ = \frac{\gamma}{2Q(V)^2}\Bigg|_{V=0}^{V=V} - \kappa \ln\left[Q(V)\right]\Bigg|_{V=0}^{V=V} = \\ &= \frac{\gamma}{2}\left[\frac{1}{Q(V)^2} - \frac{1}{Q(0)^2}\right] + \kappa \ln\left[\frac{Q(0)}{Q(V)}\right]. \end{aligned} \tag{8}$$

Из соотношения (8) следует, что $dt/dQ < 0$, т.е. Q – монотонно убывающая функция времени. При этом $Q \to 0$ при $t \to \infty$. Это, и условие $Q \in [0, Q_{max}]$, приводит к тому, что для применимости данной модели должно выполняться неравенство

$$Q(0) = \frac{2\gamma}{\sqrt{(r-\beta)^2 + 4\gamma\kappa} + r - \beta} \le Q_{max}.$$

Теперь, на втором этапе, опираясь на полученное решение (8), запишем его в безразмерных переменных:

$$\tau = \frac{t}{\kappa}, \quad u = \frac{V}{\sqrt{\kappa\gamma}}, \quad q = Q\sqrt{\frac{\kappa}{\gamma}}, \quad s = \frac{r-\beta}{\sqrt{\kappa\gamma}}. \tag{9}$$

Имеем

$$\tau = \frac{1}{2}\left[\frac{1}{q^2(u+s)} - \frac{1}{q^2(s)}\right] + \ln\left[\frac{q(s)}{q(u+s)}\right], \tag{10}$$

где, как это вытекает из зависимости (6):

$$q(z) = \frac{2}{z + \sqrt{4+z^2}}. \tag{11}$$

На рисунке 1 представлены отдельные кривые зависимости $u(\tau)$ при нескольких фиксированных значениях параметра s, построенных на основе выражений (10), (11). Данные кривые описывают начальную стадию процесса фильтрования.

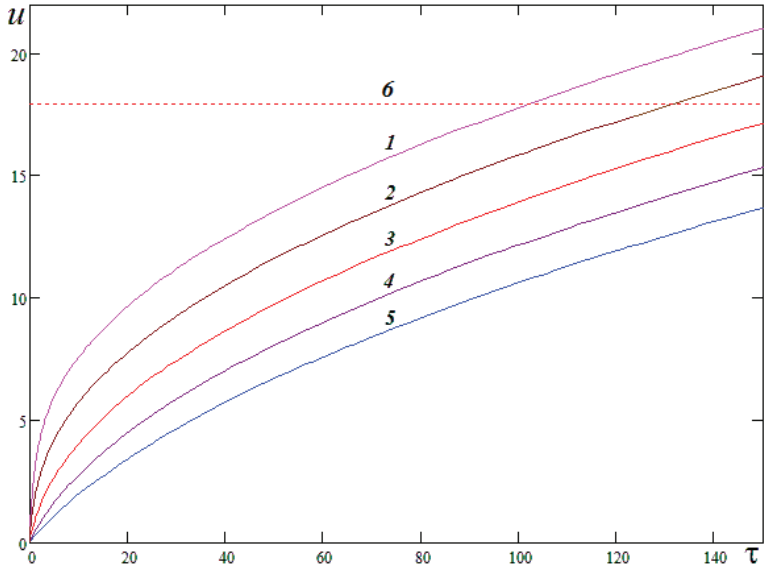


Рисунок 1. Кинетические кривые процесса фильтрования
1 **–** ***s*** **= –4;** ***2*** **–** ***s*** **= –2;** ***3*** **–** ***s*** **= 0;** ***4*** **–** ***s*** **= 2;** ***5*** **–** ***s*** **= 4,** ***6*** **— линия, определяющая** u_{max}

Не следует забывать, что в реальном фильтре значение $u(V)$ ограничено $u \in [0, u_{max}]$, что на рис. 1 выражает линия *6*. Значение u_{max} определяется геометрическими размерами фильтра (максимально возможной толщиной слоя осадка h_{max}), массовой долей твердой фазы в суспензии и порозностью ε образующегося осадка:

$$h_{oc} = \frac{CV}{A(1-\varepsilon)\rho_{тв}},$$

где $\rho_{тв}$ – плотность твердой фазы. Положив в приведенной формуле $h_{oc} = h_{max}$ находим V_{max}, а значит и u_{max}.

Традиционный вариант фильтрования, когда Δp = const, т. е. в зависимости (2) $b = 0$ и $m = 0$ получается из рассмотренного предельными переходами $\beta, \varkappa \to 0$, что приводит к формуле

$$2\gamma t = V^2 + 2rV \tag{12}$$

сводящейся к обычно используемой, в теории и практике процесса фильтрования (см. [1-3]). В безразмерных координатах $v = V/r$, $\vartheta = 2\gamma t/r^2$ получается универсальная функция [5]:

$$v = \sqrt{1+\vartheta} - 1.$$

Рассматриваемый пример интересен в плане применения роли теории размерностей при предварительном анализе задачи. Это проще рассмотреть, когда получено решение задачи.

Обратимся к анализу проблемы при помощи анализа размерностей. Из постановки задачи (1)– (7) видно, что в ней присутствует десять независимых параметров и переменных: V, t, A, μ, R_f, a, b, m, α, C. Они выражаются через три основ-

ные единицы измерения: кг, м, с. Таким образом, согласно П-теореме [1– 3, 5], решение задачи может быть представлено при помощи функциональной связи 10 – 3 = 7 безразмерных комплекса. Полученное выше решение (10), использующее при своем построении структуру основных уравнений процесса, связывает только три безразмерные величины: u, τ и s. Впечатляющий выигрыш в простоте! По сравнению с классическим вариантом (12), который сводится к простой зависимости между двумя безразмерными комплексами [5], добавился только один критерий подобия: s. Однако, следует заметить, что при формулировке классического уравнения фильтрования [1, 2, 6] также, как и здесь использовались формулы типа $R_c = \alpha CV/A$. В рассматриваемом случае, по существу, добавились две размерные постоянные: b и m, по сравнению с традиционным вариантом Δp = const, и можно было бы ожидать увеличение числа критериев подобия на две единицы. Однако в данной задаче наряду с мультипликативными связями параметров, «сработала» и аддитивная связь: $r - \beta\,(Ab - \mu R_p)$, которая и привела к добавлению только одного критерия подобия. Аналогичный эффект при описании движения жидкости в пористой среде, моделируемой системой капилляров, отмечен в работе [5 стр. 63]. В обоих случаях были известны уравнения процесса. Таким образом, наличие уравнения процесса позволяет более точно использовать соображения теории размерностей [выбирать размерные (конкретизированные) параметры, определяющие явление].

Получена аналитическая зависимость в безразмерных параметрах для процесса фильтрования в режиме изменяющегося перепада давления, отражающая влияние расхода суспензии на перепад давления.

Полученное уравнение включает в себя три безразмерных комплекса, однако, в случае прямого решениях данной проблемы с помощью теории размерности потребуется 7 безразмерных комплекса, что говорит о существенном упрощении решения по сравнению с «классическим» подходом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Касаткин АГ. Основные процессы и аппараты химической технологии. Москва: Химия, 1971.
2. Романков ПГ, Курочкина МИ. Гидромеханические процессы химической технологии. Ленинград: Химия, 1982.
3. Гельперин НИ. Основные процессы и аппараты химической технологии. Москва: Химия, 1981: 386.
4. James R, Roy P, James R, Stanley M. Chemical Process Equipment. Selection and Design. Oxford. 2010.
5. Мошинский АИ. Теория размерности в проблемах химической технологии. Lambert Academic Publishing RU, 2017.

SUMMARY

FILTRATION IN THE VARIABLE DIFFERENTIAL PRESSURE MODE

Banaytis R. P., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Based on the filtration model with the dependence of the pressure drop on the filtrate flow rate, an analytical solution to the problem is obtained. The parameters of the optimal filter operation are specified. In this case, we consider the case when the maximum performance of the filter is achieved with the maximum possible thickness of the sediment layer in the filter. The role of dimension theory in the considered problem is discussed.

Key words: *filter, pump, flow rate, pressure, filtration curves, dimension theory.*

REFERENCES

1. Kasatkin AG. Osnovnyye protsessy i apparaty khimicheskoy tekhnologii. Moscow: Khimiya, 1971. (in Russ).
2. Romankov PG, Kurochkina MI. Gidromekhanicheskiye protsessy khimicheskoy tekhnologii. Leningrad: Khimiya, 1982. (in Russ).
3. Gel'perin NI. Osnovnyye protsessy i apparaty khimicheskoy tekhnologii. Moscow: Khimiya, 1981. (in Russ).
4. James R, Roy P, James R, Stanley M. Chemical Process Equipment. Selection and Design. Oxford, 2010.
5. Moshinskiy AI. Teoriya razmernosti v problemakh khimicheskoy tekhnologii. Lambert Academic Publishing RU, 2017. (in Russ).

ГРАНУЛЫ: ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ И ИССЛЕДОВАНИЮ ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ В РАЗНЫХ ФАРМАКОПЕЯХ

Баширова Р.Р., студ. 4 курса
Руководитель: **Загорулько Е.Ю.,** канд. фарм. наук, ст. преп.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: bashirova.rinata@pharminnotech.com

Исследованы основные сходства и различия в определении лекарственной формы и фармацевтико-технологических свойствах гранул в Государственной фармакопее XIV издания, проекте фармакопейной статьи для Фармакопеи Евразийского Экономического Союза, Европейской и Британской фармакопеях, Международной фармакопее, Фармакопее

США и Японской фармакопее. Показаны подходы к классификации гранул в разных фармакопеях, дополнительно рассмотрены гранулы кишечнорастворимые.

Ключевые слова: *гранулы, фармацевтико-технологические свойства, фармакопейная статья, вспомогательные вещества, истираемость, тест «Растворение».*

Процесс грануляции является важной стадией производства твердых пероральных лекарственных форм. Гранулы могут представлять собой как самостоятельную лекарственную форму (ЛФ), так и являться полупродуктом в технологии таблеток, твердых желатиновых капсул и других ЛФ. Исследование фармацевтико-технологических свойств гранул может проводиться как в рамках контроля качества лекарственного препарата (ЛП), так и на этапе технологического контроля полупродукта. Именно поэтому знание подходов к точному определению ЛФ и технологических свойств гранул в разной нормативной документации (НД) представляет собой актуальную задачу и является целью данной работы.

Определение лекарственной формы и основные виды гранул

Вначале представляет интерес рассмотреть сходства и различия подходов к определению гранул как лекарственной формы. В соответствии с Государственной Фармакопеей Российской Федерации XIV издания (ГФ XIV), гранулы представляют собой твердую дозированную лекарственную форму, содержащую одно или несколько действующих веществ с добавлением вспомогательных веществ, в виде агрегатов порошка любой формы [1]. При этом, особенностью Фармакопеи Европейского экономического союза (Ф ЕАЭС) заключается в том, что определение лекарственной формы отличается уточнением возможности изготовления гранул без добавления вспомогательных веществ [2]. В свою очередь, фармакопейные статьи Международной (МФ), Британской (BP 09) и Европейской (EP 8.0) фармакопей гласят, что гранулы – это препараты, состоящие из твердых, сухих агрегатов частиц порошка, достаточно стойких, чтобы выдерживать обработку, содержащие одно или несколько активных веществ с наполнителями или без них, а также, при необходимости, разрешенные к применению красящие вещества и ароматизаторы [3, 4].

Современная номенклатура гранул включает в себя гранулы без оболочки (гранулы) и гранулы, покрытые оболочкой. По характеру высвобождения действующего вещества различают гранулы с обычным высвобождением и гранулы с модифицированным высвобождением. Также следует отметить кишечнорастворимые гранулы (гранулы, устойчивые к действию желудочного сока и высвобождающие действующее вещество под действием кишечного сока) [1, 2, 4, 5]. По способу применения различают гранулы для приема внутрь и гранулы для приготовления жидких лекарственных форм (путем их растворения или диспергирования в соответствующем растворителе) [1, 2, 4]. Необходимо подчеркнуть, что ГФ XIV, Ф ЕАЭС, EP 8.0, BP 09 и Японская фармакопея (JP XVII) отдельно выделяют также гранулы шипучие [1, 2, 4–6]. Разновидности гранул в разных фармакопеях представлены на рисунке 1.

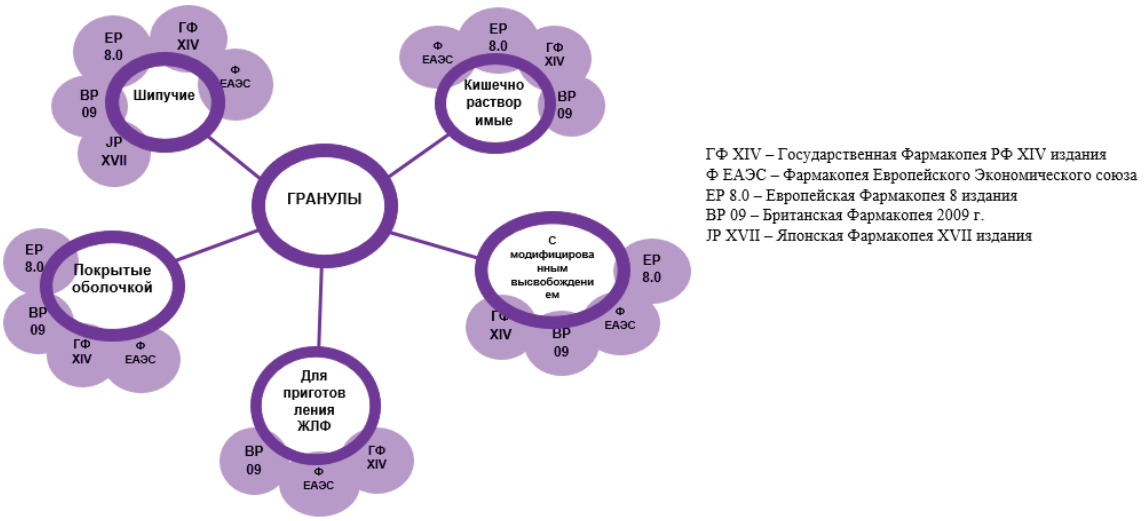


Рисунок 1. Отдельные виды гранул в разных фармакопеях

Придание гранулам требуемых свойств достигается введением вспомогательных веществ. При выборе вспомогательных веществ необходимо учитывать свойства активной фармацевтической субстанции; предполагаемый способ высвобождения активной фармацевтической субстанции (АФС) (немедленный или модифицированный), особенности технологического процесса [7]. В состав гранул могут входить следующие группы вспомогательных веществ: наполнители (разбавители), связующие вещества, разрыхлители (дезинтегранты), антифрикционные вещества, корригенты вкуса и запаха, а также красители [8].

Одним из видов гранул, имеющих наиболее сложный состав, являются гранулы кишечнорастворимые. Они покрыты одним или несколькими слоями оболочки, препятствующей их растворению в кислой среде желудка. В качестве примера можно рассмотреть гранулы Буденофалька (МНН – Будесонид, Д-р Фальк Фарма ГмбХ, Германия). Ядра гранул Будесонида в качестве вспомогательных веществ содержат сахарную крупку, лактозу моногидрат и повидон К25 [9]. Оболочка гранул имеет сложный состав и содержит смесь сополимеров метакриловой кислоты и метилметакрилата в разных

соотношениях, а также их четвертичных аммониевых производных [9]. Такая сложная комбинация веществ позволяет выполнить «желудочнорезистентную» функцию (термин «gastro-resistant" используется в EP 8.0) [5].

Для создания кишечнорастворимой оболочки в гранулах Креона Микро (МНН – Панкреатин, Эбботт Лэбораториз ГмбХ, Германия) используют раствор гипромеллозы фталата в диметиконе. Фталаты производных целлюлозы в составе оболочки используются и для гранул кишечнорастворимых ПАС Натрия (МНН – Аминосалициловая кислота, Скан Биотек Ламитед, Индия) [9].

Таким образом, применение вспомогательных веществ в значительной степени способно влиять на фармакологическую активность лекарственных препаратов путем воздействия на растворимость в различных физиологических жидкостях организма [10].

Фармацевтико-технологические свойства гранул

Сравнительный анализ требований к гранулам исследуемых фармакопей представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика гранул в разных фармакопеях

Показатель	ГФ XIV	Ф ЕАЭС	EP 8.0	USP 35	JP XVII	BP 09	МФ
Наличие ОФС «Гранулы»	+	+ *	+	–	+	+	–
Определение	+	+	+	+	+	+	+
Описание	+	+	+	+	+	+	+
Размер гранул	+	+	–	–	+	–	–
Потеря в массе при высушивании или Вода	+	+	–	–	+	–	–
Растворение	+	+	+	+	+	+	+
Распадаемость	+	+	+	+	+	+	+
Однородность дозирования	+	+	+	+	+	+	–
Однородность массы	+	+	+	+	+	+	–
Масса содержимого упаковки	+	+	+	+	+	+	–
Однородность массы доз, отмеренных из многодозовой упаковки	–	+	+	+	+	+	–
Сыпучесть	–	–	+	–	–	–	–
Истираемость	–	–	+**	–	–	–	–
Насыпной объем	–	–	–	+	+	–	–

**проект фармакопейной статьи для второй части первого тома*
***испытание предлагается проводить на этапе фармацевтической разработки гранул*

Таким образом, общими испытаниями для гранул во всех исследуемых фармакопеях явились показатели «Определение», «Описание», «Растворение» и «Распадаемость». Кроме того, дополнительно исследуют показатель «Стерильность» для гранул, к которым предъявляется требование стерильности [1–6,11,12].

Тесты «Растворение» и «Распадаемость» являются ключевыми для моделирования *in vitro* условий приёма пероральной лекарственной формы. Именно поэтому они присутствуют во всех рассмотренных фармакопеях. Однако условия проведения этих испытаний и применяемое оборудование различаются. Например, в ГФ XIV испытание на растворение гранул проводится согласно методике ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» [13] в аппаратах: вращающаяся корзинка, лопастная мешалка и проточная ячейка и в других аппаратах, описанных в зарубежных фармакопеях [1]. Выбор оборудования и среды растворения зависит от физико-химических свойств ЛФ, при этом аппараты должны отвечать требованиям инертности и соответствовать геометрическим и техническим параметрам ОФС [13]. Таким образом, растворимость лекарственной формы может быть испытана с использованием основных аппаратов и их модификаций:

1. Аппарат I «Вращающаяся корзинка»
2. Аппарат II «Лопастная мешалка»
3. Аппарат III «Проточная ячейка»

Испытание распадаемости гранул, согласно ОФС, при проведении испытания на растворение, допустимо не проводить [1]. Следует отметить, что для шипучих гранул регламентировано время распадаемости не более 5 минут при помещении гранул в 200 мл воды температурой от 15 до 25 °С [1, 2].

Сравнительный тест кинетики растворения в Фармакопее США (USP 35) проводится в аппаратах вращающаяся корзинка, лопастная мешалка, качающийся цилиндр, проточная ячейка, лопасть над диском и качающийся держатель [11]. JP XVII рекомендует для ЛФ «Гранулы» испытание «Тест-растворение», производимое в аппаратах вращающаяся корзинка и лопастная мешалка [6].

Упоминания о допустимом размере гранул находятся только в ГФ XIV, Ф ЕАЭС и JP XVII. Согласно ГФ XIV и Ф ЕАЭС размер гранул должен находиться в диапазоне 0,2–3 мм [1, 2]. JP XVII, в свою очередь, не предполагает строгих требований для всех гранул, однако выделяет два дополнительных вида гранул в зависимости от размера [6]. Так, «мелкие гранулы» (*fine granules*) – это гранулы, 90% которых проходит сквозь сито диаметром 0,5 мм, а остальные 10% находятся в

диапазоне 0,85-0,5 мм [6]. Если же через сито с диаметром отверстий 0,5 мм проходит 95% гранул, а остальные 5% находятся в диапазоне 0,85-0,5 мм, такие гранулы относят к порошкам и исследуют как эту ЛФ [6].

Следует отметить оригинальный подход EP 8.0 к исследованию истираемости (*friability*) гранул, который не является обязательным требованием, однако рекомендован на этапе их фармацевтической разработки. Испытание истираемости проводится в приборе, который снабжен цилиндром с решетчатой крышкой, U-образной стеклянной трубкой, Т-образным элементом и манометром [14]. Процесс истирания происходит благодаря поступлению в цилиндр с гранулами потока сжатого воздуха. Также испытание возможно провести в приборе, совершающим горизонтальные вибрации стеклянного сосуда, в который помещены гранулы [14]. Одной из модификаций данного прибора является тестер Friabimat SA-400 (Copley Scientific, Великобритания). Образец гранул помещают во флакон с навинчивающейся крышкой, который крепится пружинным зажимом к держателю, горизонтально расположенному на конце колеблющегося рычага. В результате «встряхивающих» движений рычага образцы гранул сталкиваются и трутся друг о друга и о внутреннюю поверхность флакона, тем самым истираясь [15]. Схема и образец тестера Friabimat SA-400, выпускаемого производителем технического оборудования Copley Scientific, представлены на рисунке 1. Тестер состоит из прозрачной акриловой крышки с магнитной блокировкой для безопасной работы, корпуса из нержавеющей стали и непосредственно устройства, осуществляющего истирание гранул.

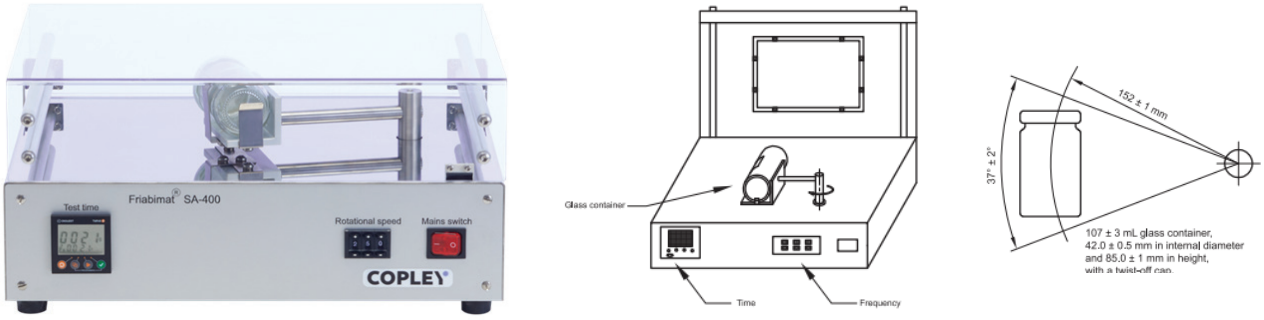


Рисунок 2. Внешний вид и схема аппарата для исследования истираемости гранул The Friabimat SA-400 (Copley Scientific) [2, 15]

Истираемость оценивают по доле мелкодисперсной фракции, образующейся при интенсивном самоистирании 10,0 гранул в аппарате. После 4 (при наибольшей частоте) или 2 минут (при наименьшей частоте), гранулы снова взвешивают, проводя при этом не менее 3 определений. Образец сушат в сушильном шкафу при температуре 105 ºС и истираемость вычисляют в процентах. Гранулы считаются прошедшими испытание, если их истираемость составляет не более 3 % [14].

В результате исследования различных фармакопей были выделены основные требования к ЛФ «Гранулы». Следует отметить, что в ГФ РФ XIV полноту требований к лекарственной форме подчеркивает то, что в общей фармакопейной статье «Гранулы» регламентированы такие показатели как «Описание», «Размер гранул», «Потеря в массе при высушивании», «Распадаемость» и «Растворение». Необходимо подчеркнуть, что в фармакопейных статьях EP 8.0, USA 35, JP XVII, МФ и BP 09 гранулы предлагается анализировать по показателям «Насыпной объем»; в USP 35 – «Истираемость», что с точки зрения технологического процесса изготовления гранул является важным фактором для оптимизации производства и фасовки ЛФ. Стоит отметить наличие в мировых фармакопеях большего числа применяемого для оценки качества гранул оборудования, что является значимым фактором в условиях современного фармацевтического рынка. Таким образом, приведенные требования к гранулам в совокупности могут давать полную характеристику готовой ЛФ и использоваться при разработке состава, технологии и контроля качества гранулированных лекарственных форм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.1.0004.18 «Гранулы». Доступно по: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/41/index.html

2. Фармакопея Евразийского экономического союза. 2 часть 1 Тома. 0499. Гранулы. Доступно по: http://www.eurasiancommission.org/ru/act/texnreg/deptexreg/LS1/Pages/pharmacopoeia.aspx

3. International Pharmacopoeia. 4th edition. Monograph on liquid preparations for oral use. World Health Organization, Geneva, 2007:916 – 926.

4. British Pharmacopoeia, 2009. Vol. III. Granules. Health & Medicine, 2009:6504 – 6507.

5. European Pharmacopoeia 8.0. Vol. I. Granules. Granulata, 2013:785–786.

6. Japanese Pharmacopoeia 17th Edition, 2016. Granules. P.29 – 30.

7. Colorcon | World Leader in Pharmaceutical Product Development. Доступно по: https://www.colorcon.com/

8. Меньшутина НВ, Козлов АИ, Ершова ЕА, Касимова АО. Вспомогательные вещества для производства твердых лекарственных форм. Программные продукты и системы. 2008;3:72-74.

9. База данных ГРЛС. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx

10. The Lubrizol Corporation: Specialty Chemicals. Доступно по: https://www.lubrizol.com/

11. The United States Pharmacopeia USP 35/NF 30. Vol. I. Powders and Granules, United Book Press, 2011:1119–1136.

12. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». Доступно по: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php

13. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Доступно по: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php

14. European Pharmacopoeia 8.0. Vol. I. 2.9.41. Friability of granules and spheroids, 2013. P. 359–361.

15. Copley Scientific. Оптимальные решения для тестирования лекарственных препаратов. Доступно по: http://galachem.ru/upload/pdf/COPLEY_DS.pdf

SUMMARY

GRANULES: APPROACHES TO DETERMINATION OF THE DOSAGE FORM AND TEST RESEARCH IN DIFFERENT PHARMACOPEIAS

Bashirova R.R., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The main similarities and differences in determining the dosage form and pharmaceutical technological properties of granules in the State Pharmacopoeia of XIV editions, the draft monograph for the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union, the European and British Pharmacopoeias, the International Pharmacopoeia, the US Pharmacopoeia and the Japanese Pharmacopoeia have been researched. Possible approaches to the classification of granules in different pharmacopoeias, enteric granules are considered.

Key words: *granules, tests, monograph, excipients, friability, Dissolution test.*

REFERENCES

1. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd. Tom 2. OFS.1.4.1.0004.18 «Granuly» Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/41/index.html (in Russ).

2. Farmakopeya Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza. 2 chast' 1 Toma. 0499. Granuly. Available at: http://www.eurasiancommission.org/ru/act/texnreg/deptexreg/LS1/Pages/pharmacopoeia.aspx (in Russ).

3. International Pharmacopoeia. 4th edition. Monograph on liquid preparations for oral use. World Health Organization, Geneva, 2007: 916 – 926.

4. British Pharmacopoeia, 2009. Vol. III. Granules. Health & Medicine, 2009: 6504 – 6507.

5. European Pharmacopoeia 8.0. Vol. I. Granules. Granulata, 2013:785–786.

6. Japanese Pharmacopoeia 17th Edition, 2016. Granules.: 29 – 30.

7. Colorcon | World Leader in Pharmaceutical Product Development. Available at: https://www.colorcon.com/

8. Men'shutina NV, Kozlov AI, Ershova EA, Kasimova AO. Vspomogatel'nye veshchestva dlya proizvodstva tverdyh lekarstvennyh form. Programmnye produkty i sistemy; 2008; 3: 72-74. (in Russ).

9. Baza dannyh GRLS Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx (in Russ).

10. The Lubrizol Corporation: Specialty Chemicals. Available at: https://www.lubrizol.com/

11. The United States Pharmacopeia USP 35/NF 30. Vol. I. Powders and Granules, United Book Press, 2011: 1119–1136.

12. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd. Tom 2. OFS.1.4.1.0001.15 «Lekarstvennye formy». Available at: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ).

13. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd. Tom 2. OFS.1.4.2.0014.15 «Rastvorenie dlya tverdyh dozirovannyh lekarstvennyh form». Available at: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ).

14. European Pharmacopoeia 8.0. Vol. I. 2.9.41. Friability of granules and spheroids, 2013: 359–361.

15. Copley Scientific. Optimal'nye resheniya dlya testirovaniya lekarstvennyh preparatov. Available at: http://galachem.ru/upload/pdf/COPLEY_DS.pdf (in Russ).

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕСОРБЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР

Биткина Т.А., асп. 3 года обучения
Руководитель: **Басевич А.В.**, к. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: tatiana.bitkina@pharminnotech.com

Разработана методика десорбции лекарственного вещества из полимерных микросфер, предназначенных для использования в области химиоэмболизации, *in vitro* на примере цитостатического препарата – доксорубицина. Установлены условия для высвобождения доксорубицина микросферами.

Ключевые слова: *полимерные микросферы, сорбция, десорбция, химиоэмболизация, химиотерапия.*

Химиоэмболизация микросферами – современный метод химиотерапии злокачественных новообразований, который заключается в закупоривании артерий, питающих опухоль, микросферами, предварительно насыщенными лекарственным препаратом. Данная комбинация позволяет перекрыть кровоток, питающий опухоль и поддерживать в ее тканях терапевтические концентрации лекарственного препарата в течении длительного времени [1].

Одной из задач при разработке микросфер, предназначенных для химиоэмболизации, является доказательство высвобождения микросферами лекарственных средств.

Наиболее показательными системами для выполнения данной задачи являются методики с использованием установок, моделирующих артериальный кровоток. Установки, которые позволили бы имитировать процесс локальной эмболизации артерий, имеют высокую стоимость и сложное техническое исполнение.

Таким образом, целью исследования стала разработка и апробация методики десорбции доксорубицина из полимерных микросфер.

Объектами исследования служили микросферы, представляющие собой сополимер винилового спирта и акрилата натрия размерного диапазона 35-40 мкм [2].

Водородный показатель растворов определяли при помощи pH-метра Sartorius PB-11.

Количественное содержание доксорубицина в растворе определяли методом спектрофотометрии при длине волны 481 нм при помощи спектрофотометра СФ-2000.

Перемешивание растворов осуществляли при помощи орбитального шейкера BioSan OS-20.

Контроль внешнего вида микросфер осуществляли методом микроскопии при помощи микроскопа Levenhuk D320L.

Сорбцию микросферами доксорубицина проводили путем насыщения сухих микросфер раствором доксорубицина.

Насыщенные доксорубицином микросферы помещали в плоскодонную колбу и заливали 500 мл раствора. Колбу термостатировали при температуре 37±1°С. Ежедневно проводили количественное определение доксорубицина в надосадочной жидкости для контроля высвобождения лекарственного средства из микросфер. Исследование проводили при разных параметрах (таблица 1).

Таблица 1 – Параметры десорбции

	Вариант 1	**Вариант 2**	**Вариант 3**	**Вариант 4**
Среда для десорбции	0,9% раствор хлорида натрия, приготовленный на буферном растворе на основе натрия дигидрофосфата (pH 6,0) [3]	0,9% раствор хлорида натрия	0,9% раствор хлорида натрия	0,9% раствор хлорида натрия
Скорость перемешивания, об/мин	120	120	без перемешивания	50

Вариант 1. Спустя неделю было обнаружено выпадение хлопьевидного осадка, который в дальнейшем окрашивался в красный цвет доксорубицином. Опыт был прекращен досрочно. Установили, что на выпадение осадка повлиял буферный раствор на основе натрия дигидрофосфата.

Вариант 2. Спустя 20 дней после начала опыта наблюдалось помутнение надосадочной жидкости и присутствие взвеси частиц. Был проведен анализ внешнего вида микросфер, который показал, что целостность микросфер нарушена и в надосадочной жидкости присутствуют их обломки (рисунок 1). Предположили, что на механическую прочность микросфер оказала влияние скорость перемешивания среды.

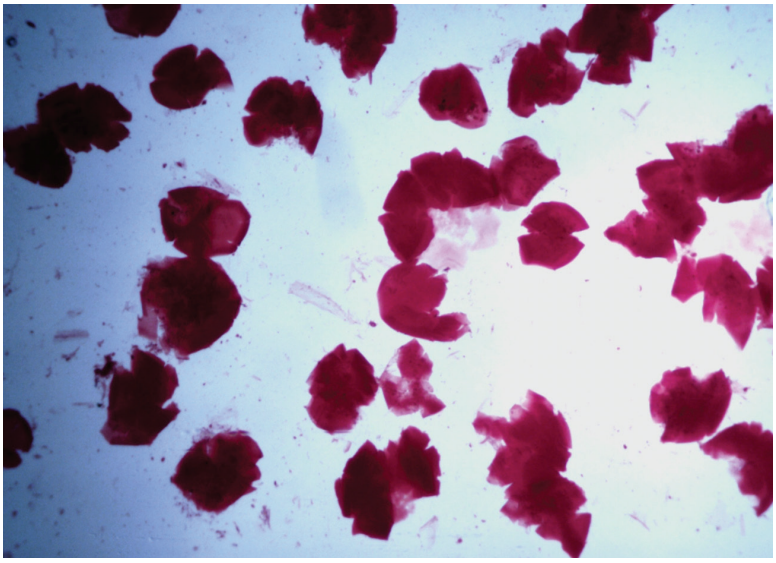


Рисунок 1. Обломки микросфер при десорбции (вариант 2)

Вариант 3. В течение первой недели из микросфер высвободилось 15±5% доксорубицина, после чего скорость десорбции значительно снизилась и на протяжении трех недель колебалась в диапазоне 20±5% (рисунок 2).

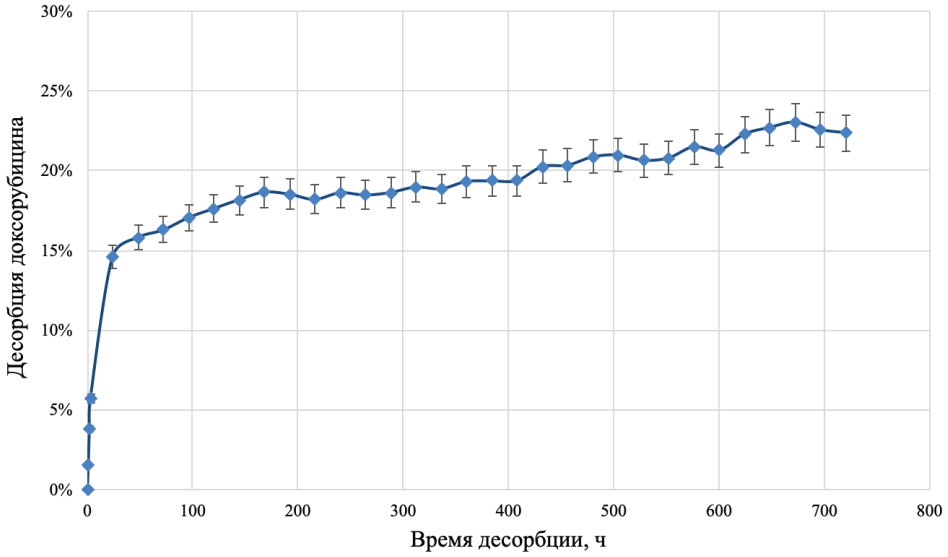


Рисунок 2. График высвобождения доксорубицина при десорбции (вариант 3)

Спустя 30 дней был проведен анализ внешнего вида микросфер, который показал, что целостность микросфер нарушена. Таким образом, установлено, что на целостность микросфер не влияет скорость перемешивания.

Вариант 4. Анализируя вышеизложенные результаты, были предложены параметры, максимально приближенные к условиям высвобождения доксорубицина из полимерных микросфер при закупоривании артерии.

Поскольку при закупоривании микросферами артерии местное кровоснабжение нарушается, опытным путем была установлена скорость перемешивания, при которой сферы находятся в состоянии покоя и лишь слегка омываются надосадочной жидкостью (50 об/мин). Ежедневно часть надосадочной жидкости заменяли для предотвращения достижения равновесной концентрации доксорубицина.

Спустя 30 дней микросферами было высвобождено 48±5% доксорубицина. Анализ внешнего вида микросфер показал, что целостность микросфер не нарушена.

Разработана методика десорбции лекарственного вещества из полимерных микросфер на примере доксорубицина. Установлены условия для высвобождения доксорубицина микросферами: использование в качестве среды 0,9% раствора натрия хлорида, термостатирование при 37±1°С, перемешивание на орбитальном шейкере со скоростью 50 об/мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гительзон ДГ, Рогов ДА, Васильев АЭ, и др. Основы химиоэмболизации (обзор литературы). Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2017;21(2):194–204. DOI: 10.22363/2313-0245-2017-21-2-194-204.

2. Биткина ТА, Басевич АВ, Родин ВМ. Критические точки производства полимерных микросфер, используемых в рентгенхирургии. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;9(3):28–35. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35.

3. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы». Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DESORPTION OF A DRUG FROM POLYMERIC MICROSPHERES

Bitkina T.A., 3nd year postgrad
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A method has been developed for the desorption of a drug substance from polymer microspheres intended for use in the field of chemoembolization in vitro using the example of a cytostatic drug – doxorubicin. The optimal conditions for the release of doxorubicin by microspheres have been established.

Key words: *polymer microspheres, sorption, desorption, chemoembolization, chemotherapy.*

REFERENCES

1. Gitel'zon DG, Rogov DA, Vasil'yev AE, et al. Osnovy khimioembolizatsii (obzor literatury). Vestnik RUDN. Seriya: Meditsina. 2017;21(2):194–204. DOI: 10.22363/2313-0245-2017-21-2-194-204. (in Russ)

2. Bitkina TA, Basevich AV, Rodin VM. Kriticheskiye tochki proizvodstva polimernykh mikrosfer, ispol'zuyemykh v rentgen-khirurgii. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2020;9(3):28–35. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35. (in Russ)

3. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd. Tom 1. OFS.1.3.0003.15 «Bufernyye rastvory». Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ МЕТАБОЛИЗМА И НАКОПЛЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО *SCUTELLARIA BAICALENSIS GEORGI*

Бронских Е.Д., студ. 2 курса

Руководители: **Орехова И.А.,** канд. биол. наук, доц.. **Шебитченко Т.С.**, ст. преп.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация

E-mail: ekaterina.bronskih@spcpu.ru

В ходе работы были получены данные, характеризующие динамику накопления биомассы культуры ткани шлемника байкальского, оценена общая белоксинтезирующая способность в процессе роста культивируемых клеток *S. Baicalensis*, проведен качественный анализ на наличие флавоноидов в биомассе *S. Baicalensis*.

Ключевые слова: *Шлемник байкальский Scutellaria baicalensis Georgi, метаболизм, белок, вторичные метаболиты, флавоноиды.*

Шлемник байкальский – многолетнее травянистое растение рода *Scutellaria* семейства *Lamiaceae*, которое обладает широчайшим спектром как летучих, так и нелетучих биологически активных веществ (БАВ). Метаболомный анализ *S. baicalensis* показал, что растение в целом содержит более 2000 химических соединений, среди них 781 предположительно имеет лекарственные свойства [4, 6].

S. baicalensis входит в группу растений-иммуномодуляторов, каковыми являются жень-шень, аралия, элеутерококк. Шлемник байкальский содержит ряд биологически активных веществ ценных для человека – это флавоноиды (байкалин, байкалеин, вогонин, скутеллярин), кумарины, большое количество пирокатехинов, крахмал, дубильные вещества, липиды, фотосинтетические пигменты, дитерпены, микро- и макроэлементы (кальций, железо, калий, медь, цинк, кобальт, йод, селен и др.) [1].

В настоящее времени из *S. baicalensis* выделено 125 соединений фенольной природы с разнообразной структурой. Среди фенольных соединений особый интерес представляют флавоноиды. Из *S. baicalensis* выделено 81 производное флавона: 55 агликонов и 26 гликозидов, среди которых четыре С-гликозида. Доминирующими соединениями являются байкалин (до 90 % от общего содержания флавоноидов), вогонин и вогонозид, реже встречаются популяции с преобладанием байкалеина [4, 5].

Основные флавоны шлемника: байкалеин, вогонин и их глюкурониды — байкалин и вогонозид, — являются физиологически активными компонентами, которые обладают антимикробным, гипотензивным и седативным действием [1].

К настоящему времени экспериментально доказано, что флавоны шлемника обладают также гемостатическим, анксиолитическим, церебропротекторным и цитотоксическим действием. Начиная с 2007 г. особенный интерес фармакологов привлекает флавон вогонин, который, по данным японских исследователей, избирательно вызывает апоптоз только онкогенных клеток, не затрагивая при этом обычные клетки [3].

С 80-х гг. XX в. проводятся исследования культуры ткани корня *S. baicalensis* и изучается ее химический состав. В результате обнаружено присутствие 22 соединений, среди которых 17 флавонов и 5 фенилпропаноидов; наличие флаванонов до сих пор не выявлено [5].

Распространение *S. baicalensis* в России ограничено. Шлемник байкальский встречается в Восточном Забайкалье, среднем Приамурье и юго-западном Приморье. Протяженность ареала произрастания с запада на восток превышает 1500 км, с севера на юг – 1000 км [6].

Учитывая, что ареал обитания *S. baicalensis* ограничен, его заготовка как ценного лекарственного растения может привести к истощению природных популяций, поэтому большую роль приобретает изучение альтернативных возможностей получения ценных БАВ шлемника байкальского. В связи с этим, широко разрабатывается получение продуктов метаболизма *S. baicalensis* из клеточных культур растений. Поэтому оценка биологической активности метаболитов данной клеточной культуры может являться ключевым показателем перспективности проводимых исследований.

Целью работы является определение общей белоксинтезирующей способности, а также анализ содержания флавоноидов в культивируемых клетках *Scutellaria baicalensis Georgi.*

В соответствии с целью были поставлены задачи:

1. Изучить динамику роста каллусной культуры *S. Baicalensis*.
2. Определить содержание белка в различные фазы роста каллусной культуры *S. Baicalensis*.
3. Провести качественный анализ на флавоноиды каллусной культуры *S. Baicalensis.*

Исследования проводились на кафедре биохимии совместно с лабораторией культуры ткани Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета.

В качестве объекта исследования служила культура ткани шлемника байкальского *S. baicalensis*.

Для приготовления гомогената культуру ткани растирали в охлажденной ступке с 0,1М калий-фосфатным буфером с pH=7,4. в соотношении 1:1. Оставляли на 30 минут в холодном месте (t~ 5ºС). Далее гомогенат центрифугировали в центрифуге Eppendorf 5430R 40 минут на 17 500 оборотов/мин при температуре 4ºС.

Количественное содержание белка в культуре ткани определяли по методу Лоури, так как он является наиболее чувствительным при количественном определении белка. Метод основан на измерении интенсивности окраски, которую дает раствор белка в цветных реакциях: биуретовой и реакции Фолина на ароматические аминокислоты. При взаимодействии белка со щелочным раствором медного купороса образуются комплексные соединения (биуретовая реакция), которые своими тирозиновыми и цистеиновыми радикалами восстанавливают смесь фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета (реакция Фолина). Интенсивность окраски комплекса, которая зависит от количества белка в исследуемой пробе, измерялась на фотоэлектроколориметре с красным фильтром при длине волны 750 нм.

Качественный анализ на флавоноиды проводили с помощью тонкослойной хроматографии в тонком слое сорбента. Для этого готовили извлечение: 2,0 г измельчённого сухого сырья помещали в фарфоровый стакан и заливали 15 мл горячей воды. Экстрагировали методом мацерации на водяной бане в течении 30 минут. Затем вытяжку фильтровали через 2 слоя марли в горячем виде, после чего добавляли 10 мл 96 % этилового спирта, и так же в горячем виде фильтровали через бумажный фильтр. Полученное извлечение охлаждали и наносили на пластинку «Сорбфил ПТСХ-АТ-А-УФ». Система растворителей бутанол:ледяная уксусная кислота:вода (4:1:5), детекция в УФ-свете.

Каллусная культура шлемника байкальского была предоставлена лабораторией культуры ткани Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета. В качестве эксплантов были использованы черенки стерильных растений, полученных из семян шлемника байкальского (материал предоставлен сотрудниками Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева). На среде по прописи MS осуществлено 7 пассажей. Культивирование осуществлялось в темноте, температура 27-28ºС, влажность 60 – 70%. Наблюдалось изменение цвета от светло-коричневого до светло-жёлтого. Внешний вид пассажей представлен на рисунке 1.

третий пассаж **шестой пассаж** **шестнадцатый пассаж**

Рисунок 1. Внешний вид штамма шлемника байкальского на разных пассажах

На протяжении десяти пассажей наблюдалась гипергидрация клеток, которая практически исчезла к шестнадцатому пассажу.

На двенадцатом пассаже построили кривую роста по накоплению сырой биомассы и приросту биомассы, которая представлена на рисунке 2.

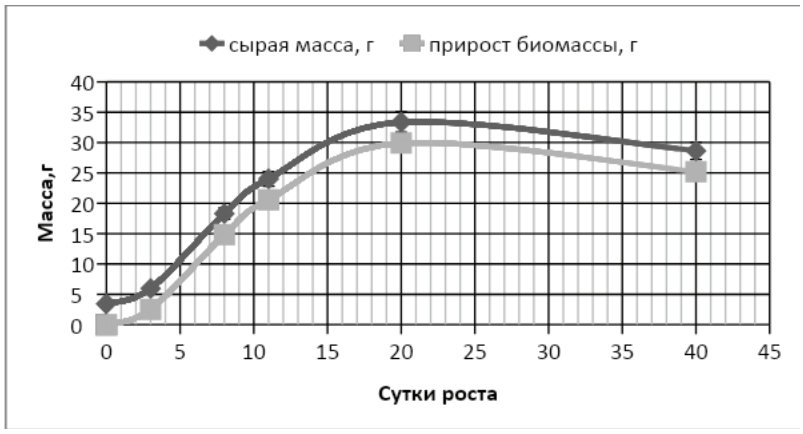


Рисунок 2. Кривая роста двенадцатого пассажа штамма шлемника байкальского

Кривая роста имеет характерную S-образную форму. Выделяются фазы роста: лаг-фаза – 1-2 сутки, экспоненциального роста – 3 сутки, линейного роста – 4-14 сутки, фаза замедленного роста – 15-17 сутки, стационарная фаза – 18-32 сутки, деградации – 33-40 сутки.

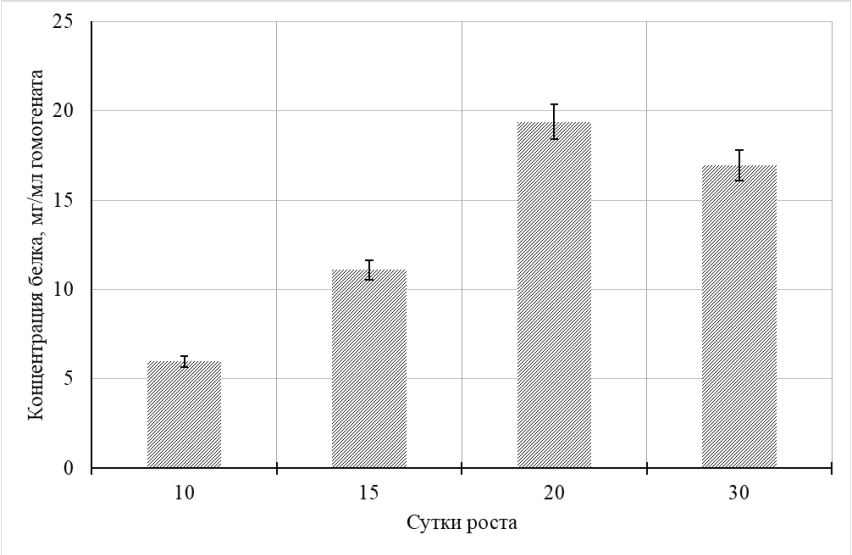


Рисунок 3. Содержание белка (в мг) на 1 мл супернатанта

Для количественного определения содержания белка были выбраны 10, 15, 20 и 30 сутки от момента пересадки культуры ткани *S. Baicalensis*.

Анализ данных, представленных на рисунке 3, показал, что с 10 по 20 сутки происходит увеличение концентрации белка. Это связано с интенсивными процессами роста культуры ткани *S. Baicalensis*. Данный период характеризуется увеличением биомассы каллусной ткани и накоплением максимального количества вторичных метаболитов. На 20 сутки от момента пересадки регистрируется максимальное содержание белка. Далее, с 20 по 30 сутки, наблюдается уменьшение концентрации белка в культуре ткани *S. Baicalensis*, что связано с переходом культуры ткани в фазу деградации, характеризующуюся уменьшением числа органелл, скорость нарастания клеточной массы становится равной нулю, происходит снижение активности синтеза вторичных метаболитов и наблюдается процесс «старения белков».

После двенадцатого пассажа проведен качественный анализ на флавоноиды с помощью тонкослойной хроматографии в тонком слое сорбента. Результаты представлены на рисунке 4.

№	образец	Свидетели		
	Шлемник	Рутин	Лютеолин	Лютеолин-7-о-гликозид
1	0,95			0,99
2	0,87			
3	0,80			
4	0,74		0,75	
5	0,70			
6	0,58	0,60		
7	0,52			
8	0,42			
	Значения R_f			

Рисунок 4. Схема хроматограммы вытяжки из сухой биомассы шлемника байкальского

На хроматограмме испытуемого образца обнаружены 8 пятен желтого и желто-коричневого цвета с определенными значениями Rf, в том числе желтое пятно с соответствующим Rf на уровне пятна раствора РСО лютеолина, пятно с соответствующим Rf на уровне пятна РСО рутина и пятно с соответствующим Rf на уровне пятна РСО лютеолина – 7 – о – гликозида.

Нами были получены данные, характеризующие динамику роста каллусной культуры шлемника байкальского. Кривая роста соответствует основным фазам роста клеточных культур. При изучении общей белоксинтезирующей способ-

ности в процессе роста культивируемых клеток *S. Baicalensis* было получено, что с 10 по 20 сутки роста культуры ткани наблюдается период интенсивного накопления белка, на 20 сутки регистрируется максимальное содержание белка, с 20 по 30 сутки происходит снижение концентрации белка. Качественный анализ показал наличие флавоноидов в биомассе (рутина, лютеолина, лютеолина – 7 – о – гликозида).

В ходе дальнейшей работы планируется исследование содержания фенольных соединений, содержащихся в культуре ткани *S. Baicalensis,* так как их биологическая активность представляет интерес для фармакологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг ЕД, Дыгай АМ, Литвиненко ВИ, Попова ТП, Суслов НИ. Шлемник байкальский. Фитохимия и фармакологические свойства. Томск, 1994.

2. Кузовкина ИН, Гусева АВ. Культивирование in vitro генетически трансформитрованных корней шлемника байкальского как биотехнологический способ получения флавона с селективной цитотоксической активностью. Биотехнология и общество в XXI веке. Сборник статей Международной научно-практической конференции. 2015:45-53.

3. Кузовкова АА, Фоменко ТИ, Копач ОВ, Чижик ОВ, и др. Культура «бородатых корней» шлемника байкальского – эффективная альтернативная система для получения ценных флавоноидов. Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов. 2015:407-411.

4. Оленников ДН, Чирикова НК, Танхаева ЛМ. Фенольные соединения шлемника байкальского (Scutellaria baicalensis georgi). Химия растительного сырья. 2009;4:89–98.

5. Тихонов ВН, Калинкина ГИ, Сальникова ЕН. Лекарственные растения, сырьё и фитопрепараты. Часть 2. 2004.

SUMMARY

STUDY OF THE PROCESSES OF METABOLISM AND ACCUMULATION OF SECONDARY METABOLITES IN THE *SCUTELLARIA BAICALENSIS GEORGI* TISSUE CULTURE

Bronskikh E.D., 2th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

In the course of the work, data were obtained that characterize the growth of the Baikal skullcap strain, the total protein-synthesizing ability during the growth of cultured *S. Baicalensis* cells was determined, and a qualitative analysis was performed for the presence of flavonoids in the *S. Baicalensis* biomass.

Key words: *Scutellaria baicalensis Georgi, metabolism, protein, secondary metabolites, flavonoids.*

REFERENCES

1. Goldberg ED, Dygay AM, Litvinenko VI, Popova TP, Suslov NI. Skullcap Baikal. Phytochemistry and pharmacological properties. Tomsk, 1994. (in Russ)

2. Kuzovkina IN, Guseva AV. In vitro cultivation of genetically transformed roots of the Baikal skullcap as a biotechnological method for obtaining flavone with selective cytotoxic activity. Biotechnology and society in the XXI century. Collection of articles of the International Scientific and Practical Conference. 2015:45-53. (in Russ)

3. Kuzovkova AA, Fomenko TI, Kopach OV, Chizhik OV, et al. The culture of the "bearded roots" of the Baikal skullcap is an effective alternative system for obtaining valuable flavonoids. Problems of conservation of biological diversity and use of biological resources. 2015:407-411. (in Russ)

4. Olennikov DN, Chirikova NK, Tankhaeva LM. Phenolic compounds of the Baikal skullcap (Scutellaria baicalensis georgi). Chemistry of plant raw materials. 2009;4:89-98. (in Russ)

5. Tikhonov VN, Kalinkina GI, Salnikova EN. Medicinal plants, raw materials and phytopreparations. Part 2. 2004. (in Russ)

ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОЦЕСС ЭКСТРАКЦИИ ФЛАВОНОИДОВ

Васильева П.А., асп. 1 года обучения
Руководитель: **Дмитриева И.Б.**, д.х.н, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: polina.vasileva@spcpu.ru

Рассмотрены факторы, влияющие на процесс экстракции флавоноидов, методы экстракции флавоноидов. Проведен анализ литературы на тему экстракции флавоноидов, выявлено какие методы экстракции флавоноидов наиболее актуальны.

Ключевые слова: *экстракция флавоноидов, экстрагент, методы экстракции.*

Экстракция растительного сырья с целью извлечения из него фармакологически активных веществ является одной из важных задач для фармации. Галеновые препараты выделены в отдельный класс. Их лечебное действие обусловлено не каким-либо одним действующим веществом, а всем комплексом находящихся в них биологически активных веществ, усиливающих, ослабляющих или видоизменяющих действие основных веществ. В некоторых случаях галеновые препараты имеют определенные преимущества перед синтетическими химическими препаратами.

Использование сырья, содержащего флавоноиды является перспективным. Флавоноидные соединения зарекомендовали себя как мощные антиоксиданты с комплексной фармакологической активностью, которая включает капилляроукрепляющее, противовоспалительное, антиаллергическое, спазмолитическое, анаболическое, антитромботическое, венотонизирующее, гипохолестеринемическое, антиатеросклеротическое, кардиостимулирующее, противоопухолевое, противовирусное, гепатозащитное и эндотелиопротекторное действие [1, 2, 3, 4, 5].

Существует ряд направлений в улучшении процесса экстракции с целью увеличения выхода действующих веществ, к ним относят: совершенствование методов экстракции; использование улучшенного оборудования; изучение физико-химических особенностей процессов экстракции экстрагируемых веществ и экстрагента.

Процесс экстракции состоит из нескольких стадий: смачивания, набухания, адсорбции и десорбции, диффузии. Изучение детализировано каждого этапа экстракции может способствовать выявлению закономерностей для пути увеличение выхода экстрагируемых веществ. Известно, что на процесс экстракции влияет: температура, длительность экстракции, вид экстракции, использование конкретного растворителя, добавление поверхностно-активных веществ (ПАВ) или же присутствие природных ПАВ в сырье [6].

Процесс экстракции происходит между двумя фазами: твёрдой (растительный материал) и жидкой (экстрагент). Протекание диффузии обусловлено различным содержанием растворимых веществ в указанных фазах и заключается в переходе вещества из твёрдой фазы в жидкую. Процесс перехода веществ из одной фазы в другую называют массообменом, или массопередачей, в изолированной замкнутой системе, состоящей из двух или большего количеств фаз. Он возникает самопроизвольно и протекает до тех пор, пока между фазами в данных условиях температуры и давления не установится подлинное динамическое фазовое равновесие, при котором в единицу времени из первой фазы во вторую переходит столько же молекул, сколько в первую из второй. В процессе массообмена между фазами, при отсутствии химического взаимодействия компонентов системы, фактором интенсивности служит разность концентраций [6].

Особое место занимает степень измельчения растительного материала, которая определяет поверхность соприкосновения фаз (чем она больше, тем скорее протекает диффузия). Однако очень мелкие растительные порошки содержат много разрушенных клеток, из которых в извлечение переходит большое количество балластных веществ, нерастворимых частиц и коллоидов, также очень мелкий порошок образует с растворителем тестообразную массу, что затрудняет экстрагирование. Повышение растворимости путем измельчения приводило к усилению антиоксидантной активности, а также капилляропротективного действия [7].

Основной движущей силой диффузионного процесса является разность концентраций. Диффузионный процесс при экстракции протекает до установления динамического равновесия концентраций. Поэтому в процессе экстракции необходимо поддерживать максимальную разность концентраций.

Под влиянием температуры усиливается процесс диффузии и диализа, материал быстрее набухает. Однако, повышение температуры не всегда целесообразно, так как может привести к разрушению термолабильных лекарственных веществ, ухудшению растворения или испарению некоторых веществ, переходу в извлечение большего количества балластных веществ, а также — коллоидов и нерастворимых веществ, что затрудняет дальнейшую очистку извлечения, увеличивает его вязкость и ухудшает процесс фильтрации.

Коэффициент диффузии обратно пропорционален вязкости экстрагента. Следовательно, в менее вязких жидкостях быстрее протекают диффузионные процессы.

После измельчения растительного материала экстрагент за счет смачивания и капиллярных сил проникает в клетку через поры. На процесс экстракции влияет поверхностное натяжение и вязкость растворителя. Впитываясь, жидкость растекается по поверхности клетки, это приводит к значительному увеличению поверхности соприкосновения фаз и ускоряет процесс растворения экстрагируемых веществ. Чем больше поверхностное натяжение экстрагента, тем меньше граница раздела фаз, тем меньше сырье смачивается экстрагентом. Следовательно, ПАВы улучшают процесс смачивания и растекания жидкости, таким образом, они ускоряют процесс проникновения экстрагента в ткани растительного материала [8].

При растворении растворимые вещества растворяются, высокомолекулярные соединения и коллоидные вещества набухают, далее неограниченно набухающие вещества переходят в золь, а часть гелей пептизируется. Степень набухания сырья зависит от химической природы жидкости. Наиболее сильное набухание вызывает вода, наименьшее неполярные растворители. Набухаемость сырья при экстрагировании спиртом зависит от содержания в нем воды. Являясь гидрофильным веществом, спирт вступает в конкуренцию с клеточным коллоидом за воду.

В процессе экстракции растворитель должен преодолеть силы силами притяжения, которыми связаны некоторые вещества внутри клетки, то есть в процессе экстракции будет происходить процесс десорбции ряда веществ.

Благодаря разности осмотических давлений растворимые вещества выходят из клетки, а в нее проникает растворитель; процессы осмоса и диализа приводят к набуханию растительного материала. Основными физико-химическими процессами являются диффузия, протекающая до наступления динамического равновесия концентраций растворенных веществ в клетке и вне ее [9].

К наиболее распространённым экстрагентам для извлечения флавоноидов относят воду очищенную и этиловый спирт [10, 11, 12].

Преимущества воды очищенной как извлекателя: хорошо проникает через клеточные стенки (если они не пропитаны гидрофобными веществами), растворяет многие лекарственные вещества, доступность, дешевизна и соответствие всем требованиям техники безопасности, фармакологическая индифферентность.

Недостатки воды очищенной как извлекателя: в ней не растворимы многие неполярные лекарственные вещества, она имеет большое поверхностное натяжение, отсутствуют антисептические свойства, вызывает гидролитическое расщепление многих веществ, имеет большие значения температуры кипения (100 °С) и теплоты парообразования (539 ккал/кг, или 2258 кДж/кг).

Преимущества этилового спирта как извлекателя: обладает бактериостатическим действием, инактивирует ферменты, вследствие летучести этилового спирта спиртовые растворы легко сгущаются до состояния густых и порошкообразных веществ, имеет более низкие, чем у воды, значения теплоты парообразования (216,4 ккал/кг, или 906,7 кДж/кг) и температуры кипения, доступность и относительная дешевизна.

Недостатки этилового спирта как извлекателя: огне- и взрывоопасность, фармакологически не индифферентен (оказывает местное и общее действия на организм человека).

При выборе растворителя исходят из принципа «подобное растворяется в подобном». Для извлечения полярных веществ применяют полярный экстрагент, неполярных — неполярный экстрагент. О полярности экстрагента можно судить по значению диэлектрической проницаемости: чем она выше, тем полярнее экстрагент.

Свойства растворителей, используемых в качестве экстрагентов, представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Свойства растворителей, используемых в качестве экстрагентов

растворитель	диэлектрическая проницаемость	температура кипения, °С	плотность при 20 °С, г/см^3	поверхностное натяжение при 20 °С, Н/м*10^3	вязкость при 20 °С, мПа*с
вода очищенная	78,2	100,0	1,00	72,75	1,00
спирт метиловый	37,9	64,6	0,793	22,99	0,60
спирт этиловый	25,2	78,39	0,789	22,03	1,20
ацетон	20,7	56,24	0,790	23,70	0,32
спирт пропиловый	19,7	97,2	0,804	22,90	2,23
дихлорэтан	10,3	83,5	1,26	32,2	0,89
метиленхлоистый	9,1	40,00	1,33	27,50	0,45
этилацетат	6,0	77,15	0,90	23,75	0,49
хлороформ	4,7	61,26	1,49	27,14	0,57
эфир этиловый	4,2	34,5	0,71	16,49	0,23
бензол	2,3	78,50	0,88	28,87	0,65
углеродчетыреххлористый	2,2	76,80	1,595	25,68	0,97
гексан	1,9	68,74	0,659	1,41	0,31

Выбор метода экстракции в значительной степени влияет на выход извлекаемых веществ. Мацерация и перколяция находят место для экстракции флавоноидов до сих пор. В этих методиках используют такие растворители, как воду, этанол, метанол, ацетон. Эти традиционные методы экстракции характеризуются использованием большого количества растворителя, более низкими выходами экстракции и длительным временем экстракции по сравнению с другими методами. При термической обработке, деградация химических структур, экстрагированных флавоноидов может привести к снижению биоактивности. Из испытанных растворителей этанол и метанол наиболее широко используются для извлечения флавоноидов благодаря более высоким выходам [13].

Кроме традиционных методов экстракции широкое распространение получили новые и передовые методы. Сверхкритическая флюидная экстракция и импульсная экстракция электрическим полем являются одними из наиболее устойчивых альтернатив традиционным методам. Процесс экстракции флавоноидов обычно осуществляется с использованием органических растворителей, смешанных с водой или без нее. Извлечение можно контролировать с помощью различных параметров, таких как выбор процедуры экстракции, а также расход, используемый для экстракции, растворитель и температура, давление и время. Кроме того, существуют другие методы с аналогичными результатами; эти методы включают использование экстракции микроорганизмами и ферментами [13].

В последнее время появляются два наиболее широко используемых метода извлечения флавоноидов: **микроволновая печь (**emerging microwave **(MAE)), или сверхвысокочастотная экстракция (СВЧ-экстракция) и технологии ультразвуковой экстракции (**ultrasound-assisted extraction **UAE).**

СВЧ – это электромагнитный спектр излучения в диапазоне от 300 МГц (радиоизлучение) до 300 ГГц (инфракрасное излучение). Этот метод нагрева использует микроволновую энергию и основан на прямом воздействии микроволн на дипольную поляризацию и молекулы ионной проводимости.

СВЧ-экстракция позволяет значительно сократить время экстракции широкого спектра соединений, а также уменьшает объемы используемых растворителей. Также было доказано, что выходы экстракции биологически активных соединений данным методом превосходят традиционные, такие как мацерацию, экстракцию в аппарате «сокслет» и

др. Сокращение времени экстракции и использование растворителей используются для повышения стоимости экстракции [14, 15].

Ультразвуковая экстракция основана на явлении акустической кавитации, которое заключается в образовании пузырьков и последующем разрыве, вызывающем высвобождение биологически активных соединений, причем этот разрыв зависит от условий экстракции.

Кавитационный эффект, создаваемый этой методикой, не только позволяет разрушать клеточные стенки растительного материала, но также способствует уменьшению размера частиц, что благоприятствует взаимодействию растворитель–субстрат. Существует множество переменных, которые могут оказывать влияние на процессы экстракции флавоноидов и, следовательно, на количество экспериментов; для оптимизации конкретного процесса обычно используются экспериментальные матрицы для выполнения процесса оптимизации с целью определения условий, способствующих восстановлению максимального содержания флавоноидов. В большинстве опубликованных работ для достижения этой цели была выбрана методология поверхностного отклика.

К достоинствам данной методики относят высокий выход, сокращение времени экстракции, также она улучшает биологические свойства получаемых экстрактов.

Извлечение биологически активных соединений зависит от целого ряда факторов, таких как используемая частота (обычно от 20 кГц до 100 МГц), выбор растворителя, концентрация растворителя, соотношение фаз, температура и время экстракции [14].

Сверхкритическая флюидная экстракция (Supercritical Fluid Extraction (SFE)) один из последних методов экстракции флавоноидов. Любое вещество при температуре и давлении выше его термодинамической критической точки является сверхкритической жидкостью. В этих условиях свойства жидкостей порождают высокую диэлектрическую проницаемость и низкую вязкость растворителей, используемых для улучшения процесса переноса вещества. При методологии SFE выход при экстракции флавоноидов значительно выше, чем в других методиках.

Наиболее часто используемым растворителем в этом методе экстракции является углекислый газ (CO_2). Многочисленные преимущества, такие как то, что он легко воспламеняется, нетоксичен, дешев и очень легко удаляется из-за своей летучести.

Определенными преимуществами данной методики экстракции являются низкие температуры, которые поддерживают целостность продуктов, высокая летучесть растворителей, которые сохраняют отходы на низком уровне, экстракция осуществляется без фазовых превращений, легкое разделение летучих и нелетучих соединений. Однако, данная методика представляют собой некоторые ограничения: трудное равновесие между растворенным веществом и растворителем, которое может потребовать применение других процессов разделения, высокое давление препятствующие непрерывному добавлению твердых веществ в экстракт, высокие эксплуатационные расходы, затраты на техническое обслуживание и т.д.

Ферментативная экстракция является перспективной альтернативой традиционным методам экстракции, где используется большое количество растворителя. Преимуществами данного метода являются селективность и специфичность действия ферментов, их способность катализировать реакции в водных растворах в мягких условиях.

Сочетание ферментативного гидролиза и ультразвуковой экстракции было использовано для извлечения флавоноидов из листьев голубиного гороха (Cajanus cajan), листьев сельдерея (Apium graveolens), мякоти пастушьей сумки (Capsella bursa-pastoris) и сусла шелковицы (Morus nigra) [14].

Особое внимание следует обратить на наличие нежелательной ферментативной активности при ферментативной экстракции флавоноидов. Эти действия могут быть вызваны эндогенными ферментами растительного сырья или побочными действиями коммерческих препаратов [14].

Таким образом, повысить выход флавоноидов при экстракции можно подобрав оптимальный метод экстракции, растворитель, необходимое измельчение. В решении данного вопроса важным является рассмотрение процесса экстракции со стороны физико-химических аспектов: влияния добавления ПАВ, температуры, изучение поверхностного натяжения растворителей, их вязкости. Более детальное рассмотрение процессов адсорбции и десорбции между твердым веществом (измельченным сырьем) и растворителем также является актуальным для увеличения выхода продукта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аляутдин РН, и др. Лекарствоведение: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019

2. Жохова ЕВ. Фармакогнозия: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019

3. Коняев ИС, Калиновская ОВ, Безрукова УА. Исследование суммарного содержания компонентов антиоксидантной системы у разных видов рода лук (Allium L.). Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии : материалы III Всерос. науч.-практич. конф. Ульяновск, 26 мая 2020: 58-63.

4. Куркин ВА, Поройков ВВ, Куркина АВ, Авдеева ЕВ, Правдивцева ОЕ. Флавоноиды лекарственных растений: прогноз антиоксидантной активности. Современные проблемы науки и образования. 2015;2-2. Доступно по: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23252

5. Veena Sharma, Pracheta Janmeda. Extraction, isolation and identification of flavonoid from Euphorbia neriifolia leaves. Arabian Journal of Chemistry. May 2017;10(4):509-514

6. Легостева АБ, Абросимова ОН, Каухова ИЕ. Химия и технология фитопрепаратов. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2018.

7. Muthukumaran P, Sathiskumar T, Alamelumangai M., J. Dhanalakshmi, M. Mathumitha and R. Saranya renganayak. Extraction and Antioxidant Activity of Flavonoids from Seed Coat of Borassus flabellifer Linn using Orthogonal Array (L16(4^4)). Department of Biotechnology, Kumaraguru College of Technology. India. 10 November 2017. Coimbatore 641 049

8. Феськова ЕВ, Леонтьев ВН, Игнатовец ОС, Адамцевич НЮ, Бесараб АЮ. Условия экстракции и идентификации флавоноидов, стимулирующих регенерацию тканей. Труды БГТУ. 2019: 49-53

9. Апаева АВ, Ямансарова ЭТ, Куковинец О. С.. Исследование экстракции флавоноидов из плодовых оболочек гречихи в различных условиях. Вестник Башкирского университета. 2015: 1223 – 1225

10. Синютина СВ, Романцова СВ, Савельева ВЮ. Экстракция флавоноидов из растительного сырья и изучение их антиоксидантных свойств. Вестник ТГУ. 2011: 345-347

11. Синютина СЕ, Романцова СВ, Савельева ВЮ. Экстракция флавоноидов из растительного сырья и изучение их антиоксидантных свойств. Вестник российских университетов. Математика. 2011: 345-347

12. Кутателадзе ГР, Федосеева ЛМ. Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории Алтайского края. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2019: 80-86

13. Один АП. Преимущества использования этилового спирта как экстрагента для получения красных антоциановых красителей из растительного сырья. Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2004: 46-48

14. Mónica L. Chávez-González 1, Leonardo Sepúlveda, Deepak Kumar Verma, et al. Aguilar. Conventional and Emerging Extraction Processes of Flavonoids. Processes. – 7 April 2020: 1-29

15. Прокопчук ДИ, Покровский ОИ, Паренаго ОО, Багателия СА, и др. Сравнение качественного состава экстрактов листьев лавра, полученных методами сверхкритической флюидной экстракции и свч-экстракции. Химия растительного сырья. 2018:169-177

SUMMARY

THE MAIN FACTORS INFLUENCING THE FLAVONOID EXTRACTION PROCESS

Vasilyeva P. A., PhD student, of 1 year of study
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The factors the process of flavonoid extraction are influenced and the methods of flavonoid extraction are considered. The analysis of the literature on the topic of flavonoid extraction was carried out, and it was revealed which methods of flavonoid extraction are most relevant.

Key words: *flavonoid extraction, extractant, extraction methods.*

REFERENCES

1. Alyautdin R.N. [et al.]. Pharmacology: textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2019 (in Russ)

2. Zhokhova EV. Pharmacognosy: textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2019 (in Russ)

3. Konyaev IS, Kalinovskaya OV, Bezrukova UA. Study of the total content of the components of the antioxidant system in different species of the genus onion (Allium L.). Fundamental and applied research in priority areas of bioecology and biotechnology: materials of the III All-Russian Scientific and Practical Conference. Ulyanovsk, May 26, 2020: 58-63 (in Russ)

4. Kurkin VA, Poroikov VV, Kurkina AV, Avdeeva EV, Pravdivtseva OE. Flavonoids of medicinal plants: prognosis of antioxidant activity. Modern problems of science and education. 2015:2-2 Available at: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23252 (in Russ)

5. Veena Sharma, Pracheta Janmeda. Extraction, isolation and identification of flavonoid from Euphorbia neriifolia leaves. Arabian Journal of Chemistry. May 2017:10(4):509-514

6. Legosteva AB, Abrosimova ON, Kaukhova IE. Chemistry and technology of phytopreparations. Saint Petersburg: SPHFU, 2018. (in Russ)

7. Muthukumaran P, Sathiskumar T, Alamelumangai M, Dhanalakshmi J, Mathumitha M. and R. Saranya renganayak. Extraction and Antioxidant Activity of Flavonoids from Seed Coat of Borassus flabellifer Linn using Orthogonal Array (L16(4^4)). Department of Biotechnology, Kumaraguru College of Technology. India. 10 November 2017. Coimbatore 641 049

8. Feskova EV, Leontiev VN, Ignatovets OS, Adamtsevich NYu, Besarab AYu. Conditions of extraction and identification of flavonoids stimulating tissue regeneration. Proceedings of BSTU. 2019: 49-53 (in Russ)

9. Apaeva AV, Yamansarova ET, Kukovinets OS. Investigation of flavonoid extraction from buckwheat fruit shells under various conditions. Bulletin of the Bashkir University. 2015: 1223–1225 (in Russ)

10. Sinyutina SV, Romantsova SV, Savel'eva VYu. Extraction of flavonoids from plant raw materials and study of their antioxidant properties. Vestnik TSU. 2011: 345-347 (in Russ)

11. Sinyutina SE, Romantsova SV, Savel'eva VYu. Extraction of flavonoids from plant raw materials and study of their antioxidant properties. Bulletin of Russian Universities. Mathematics. 2011: 345-347 (in Russ)

12. Kutateladze GR, Fedoseeva LM. Research on the development and validation of methods for the quantitative determination of flavonoids in sour sorrel grass harvested in the Altai Territory. Development and registration of medicines. 2019: 80-86 (in Russ)

13. Odin AP. Advantages of using ethyl alcohol as an extractant for obtaining red anthocyanin dyes from vegetable raw materials. Izvestiya vysshego uchebnykh zavedeniy. Food technology. 2004: 46-48 (in Russ)

14. Mónica L. Chávez-González 1, Leonardo Sepúlveda, Deepak Kumar Verma, et al. Aguilar. Conventional and Emerging Extraction Processes of Flavonoids. Processes. 7 April 2020: 1-29

15. Prokopchuk DI, Pokrovsky OI, Parenago OO, Bagatelia SA, et al. Comparison of the qualitative composition of laurel leaf extracts obtained by supercritical fluid extraction and microwave extraction methods. Chemistry of plant raw materials. 2018: 169-177 (in Russ)

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ РЕКТИФИКАЦИОННОЙ КОЛОННЫ НЕПРЕРЫВНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСИ ХЛОРОФОРМ – ЭТАНОЛ

Воловей А.Г., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Маркова А.В.**, к.т.н., доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: volovey@mail.ru

Проведен расчет ректификационной колонны непрерывного действия для разделения смеси хлороформ – этанол, которая является отходом фармацевтического производства. На основе проведенной многофакторной оптимизации найдена конфигурация колонны и оптимальные режимные параметры.

Ключевые слова: *ректификационная колонна, ситчатая тарелка, флегмовое число, оптимизация, многофакторная оптимизация.*

Фармацевтическую субстанцию фармакопейного бетакаротина получают очисткой от примесей методом перекристаллизации в хлороформе с последующим высаливаем кристаллов из раствора этиловым спиртом.

При этом после фильтрования партии и промывки кристаллов образуются большое количество отходов. Отходы (согласно регламенту) содержат 40% (масс.) хлороформа, 54% (масс.) этанола, 6% (масс.) примесей смол и субстанции фармакопейного бетакаротина. По стандартам регламента жидкие отходы направляются в контейнер для вывоза на шламонакопитель.

Представляет интерес исследование возможности регенерации жидких отходов и возвращения их в производственный цикл. Простейшим способом решения задачи является организация процесса простой перегонки. При этом в перегонном кубе должны остаться высокомолекулярные примеси. В результате можно получить дистиллят, очищенный от примесей, но содержащий смесь летучих компонентов (хлороформа и бензола). Глубокое разделение компонентов осуществляется только в процессе непрерывной ректификации.

Целью настоящей работы являлся расчет, выбор и оптимизация ректификационной колонны непрерывного действия для разделения смеси хлороформ – бензол для возврата компонентов в производственный цикл.

Рассматривалась ректификационная колонна непрерывного действия. При выборе колонны необходимо учитывать следующее. Во-первых, в качестве контактного элемента колонны была выбрана ситчатая тарелка как простая по конструкции и надежная в эксплуатации. Во-вторых, учитывая размер партии отхода, целесообразно подбирать колонну небольших размеров. Производительность колонны должна быть не слишком большой, сопоставимой с размером партии. И, наконец, желательно подобрать стандартную колонну, так как она будет дешевле, чем нестандартная.

Минимальный диаметр стандартных колонн равен 400 мм [1]. Колонны стандартного диаметра могут работать при разных производительностях. Поэтому для данного диаметра колонны выбирался ряд подходящих производительностей. По методикам, изложенным в [2 – 4], методом итераций рассчитывались конструктивные параметры колонны: расстояние между тарелками, высота сливной планки, число реальных тарелок. Расчеты проводились в среде Matcad Prime. Число теоретических тарелок рассчитывалось по специально написанной программе.

Исходные данные для расчета выбирались исходя из свойств бинарной смеси. Хлороформ с этанолом образует азеотропную смесь, содержащую 93% (масс.) хлороформа, кипящую при 59° С. Это обстоятельство определило состав получаемого дистиллята. Так, концентрация хлороформа в дистилляте составляет x_d = 92% (масс); концентрация хлороформа в кубовом остатке – x_w = 5% (масс). Концентрация хлороформа в исходной смеси соответствует данным регламента: x_f = 40% (масс). При каждой производительности расчеты проводились для нескольких флегмовых чисел. Наименьшее флегмовое число составляло 1,8, наибольшее равно пяти. При меньших значениях флегмового числе возрастало число теоретических тарелок, при большем число теоретических тарелок уменьшалось несущественно.

Результаты расчета конструктивных параметров колонны представлены в таблице.

Таблица – Результаты расчета параметров ректификационной колонны

Производительность по питанию, кг/ч	Флегмовое число	Число теоретических тарелок	Расстояние между тарелками, м	Высота сливной планки, см	Число реальных тарелок $n_л$	Высота тарельчатой части колонны, м	Гидравлическое сопротивление колонны, кПа	Теплосъем в дефлегматоре, кВт
1000	1,8	13	0,25	3	37	9,25	12,95	688
				5	32	8	13,02	
	2,17	11	0.25	3	30	7,5	12,02	780
				5	27	6,75	12,32	
	3	10	0,35	3	27	9,45	14,6	984
				5	23	8,05	13,60	
	5	8	0,60	3	20	12	19,76	1476
				5	18	10,8	18,59	
800	1,8	13	0,20	3	38	7,6	10,63	551
				5	32	6,4	10,87	
	2,17	11	0.20	3	31	6.2	9,68	624
				5	27	5,4	10,03	
	3	10	0,25	3	27	6,75	10,92	787
				5	23	5,75	10,55	
	5	8	0,40	3	20	8,0	13,86	1181
				5	18	7,2	13,35	
600	1,8	13	0,20	3	38	9,25	8,49	413
				5	32	8	9,18	
	2,17	11	0.20	3	32	7,5	7,74	468
				5	26	6,75	7,89	
	3	10	0,20	3	28	9,45	8,27	590
				5	23	8,05	8,15	
	5	8	0,30	3	21	12	9,63	885
				5	19	10,8	9,70	

Из таблицы следует, что при фиксированном диаметре колонны, помимо производительности, основным параметром, влияющим на геометрию колонны, является флегмовое число (*R*). При увеличении флегмового числа увеличивается расстояние между тарелками. Затраты теплоты на ректификацию возрастают. Увеличивается и гидравлическое сопротивление колонны.

Однако с увеличением флегмового числа уменьшается число теоретических и действительных тарелок.

Высота тарельчатой части колонны при некотором значении флегмового числа принимает минимальное значение. Это связано с тем, что с ростом флегмового числа. уменьшение числа реальных тарелок компенсируется увеличением расстояния между ними.

С увеличением высоты сливной планки число действительных тарелок уменьшается. Это связано с увеличением высоты газожидкостного слоя на тарелке, что приводит к увеличению её эффективности.

Дальнейшая задача заключалась в нахождении оптимального флегмового числа, при использовании многокритериальной целевой функции [5].

Целевая функция строилась следующим образом. Полагаем, что стоимость колонны пропорционально числу реальных тарелок ($n_р$), высота колонны (*H*) определяет требование к высоте производственного помещения, а теплосъем в дефлегматоре (*Q*) характеризует энергозатраты на ректификацию. Все эти показатели выступали критериями оптимальности, при этом оптимизируемым параметром является флегмовое число. Гидравлическое сопротивление колонны в расчет не принималось, так как в пределах заданной производительности изменялось не слишком сильно.

Для колонны заданной производительности целевая функция имеет вид:

$$\Phi(R) = \phi 1 \frac{n_p(R)}{n_{p\min}} + \phi 2 \frac{Q(R)}{Q_{\min}} + \phi 3 \frac{H(R)}{H_{\min}} \to \min .$$

Здесь ϕ1, ϕ2, ϕ3 – весовые коэффициенты, определяемые экспертной оценкой.

Нормировочные коэффициенты (с индексом min) соответствуют минимальным значениям критериев в исследуемом диапазоне изменения флегмового числа. Все значения величин брались для сливной планки высотой 5 см, так как при

этом значении эффективность тарелки выше. Весовые коэффициенты принимались равными: ϕ1 = 0,4; ϕ2 = 0,4; ϕ3 = = 0,2. Заметим, что окончательный выбор значений весовых коэффициентов должен решаться экспертным советом представителей производства.

На рис. 1 представлены зависимости (*R*) от *R* для разных производительностей колонны по исходной смеси.

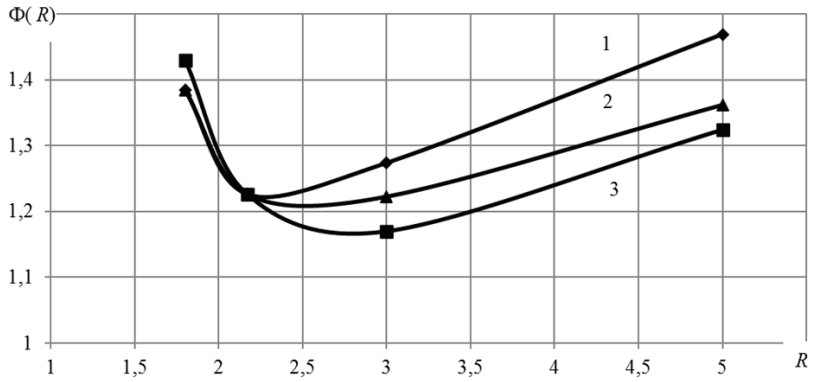


Рисунок 1. Зависимость Ф(*R*) от *R* при производительности по сходной смеси: 1 – 1000 кг/ч; 2 – 800 кг/ч, 3 – 600 кг/ч

Из рисунка следует, что построенная целевая функция в исследуемом интервале флегмовых чисел имеет минимум, причем не лежащий на концах интервала. Найденное минимальное значение целевой функции соответствует оптимальному флегмовому числу. При увеличении производительности оптимальное флегмовое число сдвигается в сторону увеличения. Так, для производительности 1000 кг/ч оптимальное значение флегмового числа равно 2,17, для производительности 800 кг/ч -2,5, а для производительности 600 кг/ч –3,0.

На основании проведенных расчетов установлено, что при постоянном диаметре колонны существует оптимальное флегмовое число, соответствующее минимуму некоторой целевой функции, которая является косвенным показателем суммарных затрат на ректификацию. Предложена оптимальная конфигурация ректификационной колонны с ситчатыми тарелками минимального стандартного диаметра 400 мм для разделения смеси хлороформ – этанол. Для производительности 800 кг/час по исходной смеси оптимальное флегмовое число равно 2,5. При этом число действительных тарелок – 26, высота тарельчатой части 5.5 м, гидравлическое сопротивление 10,2 кПа, теплосьем в дефлегматоре – 695 кВт.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каталог колонных аппаратов 2014. Научно-производственное предприятие «35-й Механический завод». Доступно по: https://mz35.ru/wp-content/uploads/2015/03/kolonni.pdf [Доступ 06 март, 2021].

2. Рамм ВМ. Абсорбция газов. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Химия, 1976.

3. Александров ИА. Ректификационные и абсорбционные аппараты. Методы расчета и основы конструирования. 2-е изд. перераб. М.: Химия, 1971.

4. Багатуров СА. Основы теории и расчёта перегонки и ректификации. Изд. 3-е, перераб. М. «Химия», 1974.

5. Штойер Р. Многокритериальная оптимизация. Теория, вычисления, приложения. М.: Радио и связь, 1992.

SUMMARY

SELECTION OF THE OPTIMAL CONTINUOUS DISTILLATION COLUMN FOR THE SEPARATION OF THE CHLOROFORM – ETHANOL MIXTURE

Volovey A.G., 2st year undergraduate
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197022, Russian Federation

A continuous distillation column is designed for the separation of a mixture of chloroform-ethanol, which is a waste product of pharmaceutical production. Based on the multi-factor optimization, the column configuration and optimal operating parameters were found.

Key words: *distillation column, strainer plate, phlegm number, optimization, multi-factor optimization.*

REFERENCES

1. Catalog of column apparatuses 2014. Scientific and production enterprise «35th Mechanical Plant» Available at: https://mz35.ru/wp-content/uploads/2015/03/kolonni.pdf [Accessed 06 March 2021].

2. Ramm VM. Gas absorption. 2nd ed., reprint. and add. Moscow: Chemistry, 1976. (in Russ).

3. Alexandrov IA. Rectification and absorption apparatuses. Methods of calculation and bases of design. 2nd ed. pererab. Moscow: Chemistry, 1971. (in Russ).

4. Bagaturov SA. Fundamentals of the theory and calculation of distillation and rectification. Ed. 3rd, pererab. Moscow «Chemistry», 1974. (in Russ).

5. Steuer R. Multi-criteria optimization. Theory, calculations, applications. Moscow: Radio and Communications, 1992 (in Russ).

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ТАБЛЕТОК ТОРАСЕМИД С ПРИМЕНЕНИЕМ КОНЦЕПЦИИ КАЧЕСТВО ЧЕРЕЗ РАЗРАБОТКУ И МЕТОДА ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Голубев А.Н., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Сорокин В.В.**, канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: artyom.golubev@spcpu.ru

Произведена оптимизация состава таблеток Торасемид. В качестве основного метода исследования использовалось планирование эксперимента (design of experiment) с внедрением основ современного подхода качество через разработку (quality by design).

Ключевые слова: *качество через разработку, quality by design, планирование эксперимента, DoE, фармацевтическая разработка, оптимизация состава.*

Разработка новых лекарственных средств является сложным и длительным процессом. Это связано с тем, что в процессе создания новых лекарственных средств, исследователю необходимо учитывать большое количество факторов, влияющих на их качество, эффективность и безопасность. Для ускорения процесса разработки применяется широкий спектр различных вспомогательных инструментов, одними из которых являются статистические программные пакеты. Их использование позволяет снизить продолжительность и трудоёмкость процесса разработки. В частности, многие программные пакеты имеют встроенные алгоритмы, позволяющие осуществлять планирование экспериментов (design of experiments). Использование данного метода позволяет единовременно исследовать влияние различных параметров (состав, технологические параметры, условия окружающей среды) на разрабатываемый лекарственный препарат. При этом использование метода планирования эксперимента позволяет вести разработку в соответствии с концепцией Quality by design (качество через разработку), что очень важно для обеспечения качества и безопасности препарата на протяжении всего жизненного цикла препарата [1].

Целью исследования являлось осуществление процесса оптимизация состава таблеток Торасемид.

Для разработки таблеток Торасемид использовался подход «quality by design» и рекомендации руководства ICH Q8 «Фармацевтическая разработка».

В ходе исследования использовались вещества: Торасемид (Torasemid Ph, Jiangsu D&R Pharmaceutical Corp., Китай), маннитол (Mannitol A, Shanxi Bonde Biotech Co., Китай), микрокристаллическая целлюлоза (microcellulose PH-101, Silverline Chemicals, Индия), крахмал кукурузный (corn strarch, Silverline Chemicals, Индия), кроскарамелоза натрия (croscaramelose sodium A, Silverline Chemicals, Индия), кремния диоксид (silicon dioxide, Jiangsu D&R Pharmaceutical Corp., Китай), магния стеарат (magnesium stearate ph, Silverline Chemicals, Индия).

Для проектировки пространства дизайна использовали DOE (Design of Experiments) – планирование эксперимента. Разработка плана эксперимента проводилась в программном пакете JMP Pro 14 (ver.14.3.0).

При оптимизации состава использовали критерий D-оптимальности. Критерий D-оптимальности фокусирует внимание на точках на внешних краях проектного пространства, что позволяет подчеркнуть обнаружение входных параметров (CMA), которые связаны с изменениями в выходных параметрах (CQA) [2].

Получаемые таблетки анализировали по следующим показателям:

1) ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул» [3], на тестере распадаемости ZT 220 [Erweka GmbH. Германия],

2) ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» [3] на тестере прочности TBH 125 [Erweka GmbH. Германия];

3) сжимаемость порошка, оцениваемая по показателю – число Хауснера (H) – характеристика сжимаемости порошка. Для расчета использовалась формула 1, где $\rho_у$ – плотность после уплотнения, ρ – насыпная плотность до уплотнения.

$$H = \frac{\rho_у}{\rho} \quad (1)$$

4) сыпучесть порошка – индексу Карра (J). Для расчета использовалась формула 2:

$$J = 100\% \times \frac{\rho_у - \rho}{\rho_у} \quad (2)$$

Определение плотностей производилось в соответствии с ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» [3] на тестере насыпной плотности SVM 121 [Erweka GmbH. Германия].

В ходе первого этапа осуществлена разработка целевого профиля качества готового продукта (Таблица 1). В его основу легли показатели качества для таблеток приведенные в Государственной Фармакопее РФ 14 издания.

Таблица 1 – Целевой профиль качества продукта

Элемент профиля		Ожидаемые значения или характеристика
Лекарственная форма		Таблетки
Путь введения		оральный
Содержание действующего вещества		10 мг
Показатели качества	Описание	Плоскоцилиндрические таблетки, белые, без сколов, с ровной, однородной поверхностью
	Растворение	За 45 мин, в раствор должно перейти не менее 75% действующего вещества
	Распадаемость	Не более 15 минут
	Истираемость	Потеря в массе до 1 % (прибор 1)
	Прочность на раздавливание	Не менее 40 Н
	Микробиологическая чистота	В соответствии с ОФС. 1.2.4.0002.18

На втором этапе осуществлен анализ компонентного состава таблеток Торасемид с точки зрения возможного влияния каждого компонента на показатели качества готового продукта. Дополнительно были установлены границы содержания для компонентов, в пределах которых возможно их варьирование. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Критические параметры исходного сырья

Компонент	Назначение	Оценка влияния на элемент QTPP	Границы содержания
Торасемид	Действующее вещество	-	10 мг
Маннитол	Наполнитель и корригент вкуса	распадаемость, растворение	42 – 126 мг
Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ)	Связывающий вещество	истираемость, прочность на раздавливание	21– 105 мг
Крахмал кукурузный прежеланитизированный	связующее вещество, дезинтегрант, смазывающее	истираемость, прочность на раздавливание, распадаемость	21 – 100 мг
Кроскарамелоза натрия	супердезинтегрант	распадаемость, растворение	2,1 – 31,5 мг
Кремния диоксид колоидный	глидант	однородность дозирования, прочность, растворение, распадаемость	0,21 – 1,89 мг
Магния стеарат	стеарат кальция	однородность массы, однородность дозирования, описание	0,21 – 1,89 мг

В рамках третьего этапа, с помощью инструментов анализа рисков, определены критические показатели качества для таблеточной смеси и для готовых таблеток, которые могут быть учтены при оптимизации состава лекарственной формы. В качестве критических атрибутов качества выбраны распадаемость таблеток, прочность таблеток на сжатие, прессуемость и сыпучесть смеси. После чего для каждого из них определены критерии приемлемости для оптимизации.

Для разработки и оптимизации состава таблеток был разработан следующий алгоритм проектирования в среде JMP [6]:

1) ***DOE>Custom Design (индивидуальный дизайн);***

2) **Responses (отклики)**: вводили ***Response Name (наименование откликов); Goal (целевое значение для дальнейшей оптимизации); Lower/Upper Limit (максимальный/минимальный значения для признака при наличии).***

3) В меню настройки плана Advanced Option (Продвинутые настройки) > Mixture Sum (сумма смеси) задавали планируемую массу таблетки;

4) В **Factors (факторы)** вводили наименования компонентов, которые меняли и их ***Values (границы изменения)***, тип факторов ***Continuous (непрерывные)***, тип изменения – ***Easy (простое)***;

5) В Model (модель) для большей точности в раскрывающемся списке Interations (взаимодействия) выбирали 2nd (двойные взаимодействия факторов)

6) В области **Design Generation (генерирование плана)**, в поле ***Number of Replicate Runs (количество повторных прогонов)*** – вводили 1; выбирали опцию ***Recommend (рекомендуемое)***;

7) использовали **Make Design** (Получить план).

Следующий этап состоял в получении составов, предложенных программой в результате построения плана эксперимента и анализ этих составов по выбранным показателям качества. Результаты экспериментов занесены в программу и проведен их анализ. Для этого был использован следующий алгоритм:

1) В боковом меню выбирали Model (модель)

2) Проверяли выбор всех оцениваемых показателей качества, при необходимости добавляли недостающие отклики путем двойного нажатия в поле Select Columns / «выбрать колонку с данными». В поле Emphasis (акцент) использовали функцию Effect screening (обзор эффектов). Далее проводили анализ.

Заключительный этап состоял в интерпретации результатов проведенного анализа. Были исследованы созданные модели для каждого из оцениваемых показателей качества. Все 4 модели оказались пригодными для исследования, так как среднеквадратичное отклонение для каждой из них не ниже 0,85 (при критерии приемлемости не менее 0,8).

Провели анализ профиля прогнозирования с помощью функции желательности. Данная функция позволяет спрогнозировать состав и его характеристики, наиболее подходящие с точки зрения установленных критериев. Результаты данного анализа представлены на рисунке 1.

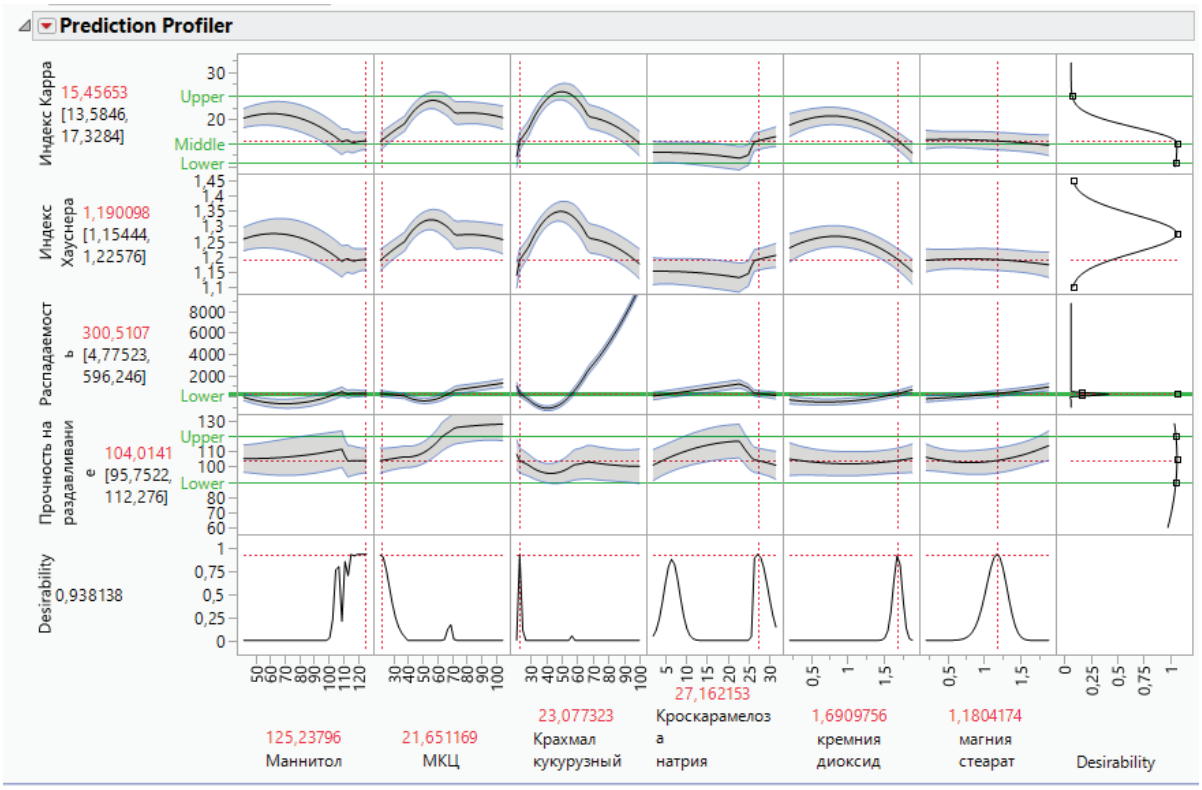


Рисунок 1. Профили прогнозирования после применения функции максимальной желательности

Полученный состав на 93,8% удовлетворяет установленным критериям желательности, что является хорошим результатом (при критерии приемлемости от 85%).

Далее произвели сравнение модельных и фактических данных, для этого были получены таблетки определенного состава и выполнен их анализ по показателям качества. Результаты эксперимента и их сравнение с модельными значениями приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Оценка показательности оптимизационной модели

Показатель качества	Значения в результате моделирования	Фактические	Отклонение
Распадаемость	3 мин 3 сек	3 мин 12 сек	4,9%
Прочность на раздавливание	103,1 Н	98,2 Н	4,8%
Индекс Карра	15,46%	16,01%	3,5%
Индекс Хауснера	1,19	1,22	2,5%

Из анализа полученных результатов можно сделать вывод о том, что полученная модель адекватна и показательна.

В ходе выполнения исследовательской работы произведена оптимизация состава таблеток Торасемид с применением концепции качество через разработку и метода планирования эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kuo PJ, Lee CL, Wang JH, Hsieh SY, Huang SC, Lam CF. Inhalation of volatile anesthetics via a laryngeal mask is associated with lower incidence of intraoperative awareness in non-critically ill patients. PLoS One. 2017;12(10):e0186337. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186337.

2. ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development, step 5. [Электронное издание]. Режим доступа: https://www.ich.org/page/quality-guidelines [Доступ 06 март, 2021].

3. Государственная Фармакопея РФ 14 изд. [Электронное издание]. Режим доступа: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php [Доступ 06 март, 2021].

SUMMARY

OPTIMIZATION OF THE COMPOSITION OF TORASEMIDE TABLETS USING THE CONCEPT OF QUALITY BY DESIGN AND DESIGN OF EXPERIMENT

Golubev A.N., 2nd year master student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The composition of Torasemide tablets was optimized. As the main research method, we used the design of experiment (design of experiment) with the introduction of the basics of the modern approach quality through development (quality by design).

Key words: *quality by design, design of experiment, DoE, pharmaceutical development, optimization composition of tablets.*

REFERENCES

1. Kuo PJ, Lee CL, Wang JH, Hsieh SY, Huang SC, Lam CF. Inhalation of volatile anesthetics via a laryngeal mask is associated with lower incidence of intraoperative awareness in non-critically ill patients. PLoS One. 2017;12(10): e0186337. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186337.

2. ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development, step 5. Available at: https://www.ich.org/page/quality-guidelines [Accessed 06 March, 2021]

3. Gosudarstvennaja farmakopeja RF XIV izd. [Jelektronnoe izdanie]. Rezhim dostupa: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php [Accessed 06 March, 2021]

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ТАБЛЕТОК МИКРОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ ГАЗОФАЗНОГО ГИДРОЛИЗА

Гришанин В.С., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Вайнштейн В.А.**, докт. фарм. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: vladislav.grishanin@spcpu.ru

Изучены свойства микрокристаллической целлюлозы (МКЦ), получаемой принципиально новым способом – газофазным гидролизом, а также возможности применения её в технологии приготовления таблеток. Установлена целесообразность использования данного способа воспроизводства микрокристаллической целлюлозы.

Ключевые слова: *микрокристаллическая целлюлоза, таблетки, вспомогательные вещества, газофазный гидролиз.*

Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) часто используется в качестве наполнителя при производстве таблеток. В настоящее время МКЦ в России не производится, вся продукция импортируется [1]. Организация производства микрокристаллической целлюлозы по инновационной технологии позволит нашей стране уйти от зависимости от импорта в этой сфере и стать поставщиком МКЦ на мировой рынок. Целью данной работы стало сравнение показателей таблеток, в составах которых использовались импротная МКЦ и МКЦ, полученная методом газофазного гидролиза.

Объектами исследования служили модельные таблетки, имеющие различные составы и технологии приготовления.

В качестве модельного вещества, позволяющего произвести сравнение исследуемых технологий гранулирования, был выбран парацетамол (ПЦМ). Выбор парацетамола обусловлен тем, что он достаточно легко высвобождается, входит в состав многих лекарственных препаратов, обладает технологическими свойствами, присущими многим субстанциям нестероидных противовоспалительных средств (НПВС). Содержание парацетамола в составе таблетной смеси составляет 50%, что соответствует 200 мг на таблетку массой 400 мг. Первичные гранулы, получали методом влажного ситового гранулирования.

Вспомогательные вещества, используемые для приготовления модельных таблеток:

Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) – это продукт, получающийся в результате химической деструкции целлюлозы, основными свойствами которого будут высокая степень чистоты и высокое процентное содержание упорядоченной части целлюлозы с кристаллической ориентацией полимерных молекул.

Сахар молочный (лактоза) – используется в качестве наполнителя. Представляет собой белые кристаллы или белый кристаллический порошок без запаха, слабого сладкого вкуса.

Крахмал картофельный – используется в качестве основы для увлажнителя и наполнителя/разрыхлителя. Особенностью картофельного крахмала, отличающей его от многих других крахмалов (например, получаемых из зерна кукурузы, пшеницы), является высокая начальная вязкость крахмального клейстера. Именно поэтому в качестве основы для приготовления крахмального клейстера был выбран именно картофельный крахмал. Представляет собой однородный порошок белого цвета.

Поливинилпирролидон – водорастворимый полимер, состоящий из мономерных звеньев N-винилпирролидона. В технологии таблеток используется в качестве связующего вещества. В сухом виде поливинилпирролидон имеет вид белого или светло-желтого гигроскопичного порошка, легко поглощающего до 40% воды из влажного воздуха.

Кальция стеарат или магния стеарат – используется как смазывающий и антифрикционный агент при производстве таблетированных и порошковых форм.

Методики получения таблеток с различными составами:

I. Получение таблеткок с увлажнителем из крахмального клейстера (с перерасчётом на приготовление 40 грамм таблетмассы).

1. Приготовление крахмального клейстера:

1.1. Примерно 4-5 грамм крахмала заливали небольшим количеством воды и тщательно перемешивали;

1.2. К полученной суспензии приливали 40-50 мл кипящей воды и тщательно перемешивали;

1.3. Охлаждали полученный увлажнитель до комнатной температуры;

1. Смешивали в стакане парацетамол (20 г), МКЦ (12 г), лактозу (5,6 г) до однородности;

2. К смеси порошков добавляли небольшими порциями раствор гранулирующей жидкости и перемешивали до получения массы, уминающейся в комок, но не прилипающей к пальцам;

3. Высушивали увлажнённую смесь при температуре (65 – 75)^{0}С до постоянной массы;

4. Протирали высушенную массу через сито с диаметром отверстий 1 мм;

5. Опудривали высушенную массу стеаратом магния (0,4 г) в аналоге «пьяной» бочки;

6. Настроили таблеточный пресс, засыпали массу для таблетирования в бункер и провели процесс таблетирования, устанавливая разные значения давления прессования.

II. Получение таблеток с использованием в качестве увлажнителя водного раствора поливинилпирролидона (ПВП) (с перерасчётом на приготовление 40 грамм таблетмассы).

Приготовление водного раствора ПВП:

1.1. 10 грамм ПВП отвешивали во флакон объёмом 250 мл;

1.2. Приливали во флакон 100 мл воды очищенной;

1.3. Перемешивали до полного растворения ПВП, оставили раствор на сутки;

1. Смешивали в стакане ПЦМ (20 г), МКЦ (2 г), лактозу (11,2 г) до однородности;

2. К смеси порошков добавляли небольшими порциями раствор гранулирующей жидкости и перемешивали до получения массы, уминающейся в комок, но не прилипающей к пальцам;

3. Подсушивали массу и протирали её через сито с диаметром отверстий равным 1 мм;

4. Досушивали увлажнённую смесь при температуре 70°С до постоянной массы;

5. Опудривали высушенную массу стеаратом магния (0,4 г) в аналоге «пьяной» бочки;

6. Настроили таблеточный пресс, засыпали массу для таблетирования в бункер и провели процесс таблетирования, устанавливая разные значения давления прессования.

III. Получение таблеток с использованием в качестве увлажнителя спиртового раствора поливинилпирролидона (с перерасчётом на приготовление 40 грамм таблетмассы).

1. Приготовление спиртового раствора ПВП:

1.1. 10 грамм ПВП отвешивали во флакон объёмом примерно 250 мл;

1.2. Приливали во флакон 100 мл спирта этилового;

1.3. Равномерно переворачивая флакон дожидались полного растворения ПВП;

1.4. Оставили раствор на сутки.

2. Смешивали в стакане ПЦМ (20 г), МКЦ (2 г), лактозу (11,2 г) до однородности.

3. К смеси порошков добавили небольшими порциями раствор гранулирующей жидкости и перемешали до получения массы, уминающейся в комок, но не прилипающей к пальцам.

4. Затем получали таблетки, как опио в вариантах I и II.

Для сравнения также были изготовлены модельные таблетки, в составе которых использовалась импортная микрокристаллическая целлюлоза COMPRECEL M101D+ («Mingtai Chemical Co., Ltd.», Тайвань). Методика получения данных таблеток аналогична той, что была представлена выше.

В результате анализа данных таблеток, были получены следующие данные:

Таблица 1 – Результаты анализа модельных таблеток, в состав которых входила импортная микрокристаллическая целлюлоза COMPRECEL M101D+

№ состава	Средняя масса таблетки, г	Среднее квадратическое отклонение	Относительное отклонение, %
I состав	0,3734	0,0116	3,1038
II состав	0,3822	0,0096	2,5185
III состав	0,3786	0,0048	1,2676

Значения средней массы и среднего квадратичного отклонения позволяют оценить воспроизводимость технологии прессования в зависимости от гранулирующего агента и усилия прессования. Как видно из полученных данных, для МКЦ COMPRECEL M101D+ лучшая и высокая воспроизводимость достигается при гранулировании спиртовым раствором ПВП.

Таблица 2 – Результаты определения массы модельных таблеток, полученных по технологии с гранулированием водным крахмальным клейстером; с МКЦ, полученной методом газофазного гидролиза

Значение усилия прессования, кН	Средняя масса таблетки, г	Среднее квадратическое отклонение, г	Относительное отклонение, %
0,08	0,2322	0,0141	6,0913
0,20	0,2458	0,0061	2,4985
0,30	0,2299	0,0109	4,7421
0,89	0,2459	0,0113	4,5753

Таблица 3 – Результаты определения массы модельных таблеток, полученных по технологии с гранулированием водным раствором ПВП; с МКЦ, полученной методом газофазного гидролиза

Значение усилия прессования, кН	Средняя масса таблетки, г	Среднее квадратическое отклонение	Относительное отклонение, %
0,04	0,2397	0,0105	4,3779
0,10	0,2501	0,0119	4,7658
0,23	0,2577	0,0064	2,4891
0,46	0,2526	0,0096	3,8029
1,07	0,256	0,0080	3,1439

На основании анализа данных, представленных в таблицах 2 и 3, установлено, что таблетки, полученные по технологии с гранулированием крахмальным клейстером при усилии прессования 0,20 кН и таблетки, полученные по технологии с гранулированием водным раствором ПВП при усилии прессования 0,23 кН, не уступают по данным показателям таблеткам, в составе, которых использовалась импортная МКЦ. Относительно модельных таблеток, полученных при других усилиях прессования, видно что они несколько уступают таблеткам, в состав которых включена импортная МКЦ, но требуются дальнейшие исследования для выявления того, насколько данные значения являются критичными.

Таблица 4 – Результаты определения массы модельных таблеток, полученных по технологии с гранулированием спиртовым раствором ПВП; с МКЦ, полученной методом газофазного гидролиза

Значение усилия прессования, кН	Средняя масса таблетки, г	Среднее квадратическое отклонение	Относительное отклонение, %
0,09	0,2876	0,0075	2,6118
0,15	0,2877	0,0069	2,4022
0,23	0,2881	0,0092	3,1879
0,52	0,2708	0,0088	3,2324
0,79	0,275	0,0101	3,6873

На основании полученных данных, представленных в таблице 4 видно, что все модельные таблетки, в получении которых использовалась МКЦ, полученная методом газофазного гидролиза и спиртовой раствор ПВП в качестве увлажнителя, демонстрируют удовлетворительную воспроизводимость технологии, но несколько уступают по таблеткам с аналогичным раствором увлажнителя, но с импортной МКЦ.

Исследована возможность применения микрокристаллической целлюлозы, получаемой методом газофазного гидролиза, в технологии приготовления таблеток. Установлено, что предложенный способ производства МКЦ может быть целесообразен в случае дефицита поставляемой в данное время импортной МКЦ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сизов АИ, Васильев ВВ. Инновационная технология получения микрокристаллической целлюлозы. ЛесПромИнформ. 2019;143(5):118-120.

SUMMARY

COMPARATIVE STUDY OF THE POSSIBILITY OF APPLICATION OF MICROCRYSTALLINE CELLULOSE OBTAINED BY GAS-PHASE HYDROLYSIS METHOD IN THE TECHNOLOGY OF TABLETS

Grishanin V.S., master's student 2nd year
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The properties of microcrystalline cellulose (MCC) obtained by fundamentally new method – gas-phase hydrolysis, as well as the possibility of its use in the technology of tablets preparation have been studied. The feasibility of using this method of microcrystalline cellulose reproduction has been established.

Key words: *microcrystalline cellulose, tablets, excipients, gas-phase hydrolysis.*

REFERNCES

1. Sizov AI, Vasiliev VV. Innovative technology for obtaining microcrystalline cellulose. LesPromInform. 2019;143(5):118-120. (in Russ)

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПОДБОРА ОБОРУДОВАНИЯ ПРИ ТЕХНИЧЕСКОМ ОСНАЩЕНИИ НОВОГО ПРОИЗВОДСТВА ПО ПОЛУЧЕНИЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Давыдова И.В., магистрант 2 года обучения
Руководители: **Салимова Е.Л.**[1], кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель НОЦ иммунобиотехнологии, **Шаврина М.С.**[2], начальник отдела рекомбинантные белки департамента фармацевтической разработки ФГУП СПбНИИВС ФМБА России
[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
[2]Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России)
198320, Санкт-Петербург, Красное Село, улица Свободы, 52
E-mail: davydova.inga@yandex.ru

Описано составление спецификации требований пользователя (URS, User Requirements Specification), указаны разделы, которые необходимо обязательно включать в данный документ и специфические требования, касаемые биотехнологического оборудования.

Ключевые слова: *URS, спецификация требований пользователя, FAT, SAT, оборудование.*

Биотехнологическое направление одно из самых бурно развивающихся в нашей стране. На сегодняшний день строительство и оснащение новых биотехнологических площадок в России набирает новый темп. За временной промежуток, начиная с 2015 и заканчивая 2020 годом было, реализовано строительство нескольких крупных фармплощадок, таких как: ООО «ПК-137», дочернее предприятие крупной международной компании BIOCAD [1], ООО «Генериум-Некст» [2], ООО «Эдвансд Фармасьютикалс» [3] и т.д.

Строительство новых участков или их переоборудование связано прежде всего с коронавирусной инфекцией. т.е. с нехваткой производственных мощностей по выпуску ковидной вакцины, а также новых препаратов собственной разработки, например таких препаратов, как туберкулин.

Большую часть времени занимает подбор оборудования. К оборудованию для биотехнологических производств выдвигается целый ряд требований. В зависимости от процесса, от штамма-продуцента или клеточной линии, объема и других условий подбираются специфические параметры оборудования (исходя из предъявляемых требований). С учетом этих требований, а также особенностей конкретных процессов разработано большое число конструкций аппаратов для биотехнологических процессов. Конструктивное оформление оборудования также подбирается исходя из особенностей технологии, производительности и других показателей. Аппаратурное оформление технологических стадий производства одних лекарственных средств может сильно отличаться от других. Но есть определенные принципы, по которым биотехнологическое оборудование изготавливается. Во-первых, оно изготавливается по требованиям GMP, во-вторых, из нержавеющей стали высоколегированных марок и в-третьих, внутренняя поверхность оборудования (и по

возможности внешняя), должна бать тщательно отполирована и быть без грубообработанных деталей, что в дальнейшем поможет при очистке этого оборудования.

Спецификации требований пользователя (URS, User Requirements Specification) является документом, в котором определены требования и ожидания пользователя конечного продукта.

Под конечным продуктом подразумевается оборудование, его форматные части и системы, связанные с ним, а также программное обеспечение, которым может быть укомплектовано данное оборудование.

Спецификации требований пользователя оформляется как внутренний документ компании, который может включать следующие разделы:

1. Введение. Где описывается цель данного документа. Обычно она направлена для обеспечения гарантии строгой точности качества оборудования и продукции.

2. Положение по контракту. Здесь обычно описываются обязанности сторон, касаемо характеристики оборудования/систем, его обслуживания и ведения документации. Также обязательно должна быть прописана ответственность.

3. Описание. В данном пункте необходимо указать полное наименование поставляемого оборудования/системы, возможно, стоит добавить информацию о том, с какими веществами будет взаимодействовать внутренние поверхности оборудования. Или указать данную информацию в приложениях.

4. Объем поставки. Данный раздел может включать в себя: доставку указанного оборудования, монтаж, подключение, изоляцию материалов, а также необходимые приемочные, квалификационные работы/документацию и т.д. Также необходимо указать какие элементы должны быть предложены в качестве основных и запасных частей.

5. Положения. Обязательно должны быть соблюдены нормативные требования.

• Фармацевтические положения: проектирование должно осуществляться в соответствии с действующими положениями GMP ЕС.

• Технические положения;

• Техническая безопасность;

• Экологическая безопасность.

6. Условия. При описании данного пункта необходимо указать следующие этапы, но не ограничиваться ими:

• *Планировка и размещение оборудования.* Здесь необходимо указать в каком помещении и в каком классе чистоты будет находится закупаемое оборудование и при каких температурных условиях и влажности должно работать.

• *Промежуточные отчеты.* Необходимо прописать какие документы должны быть предоставлены на этом этапе, например:

▪ DQ (Квалификация проекта) производится на заводе производителя (DQ по стандартам производителя). Предоставляется заказчику протокол и отчет.

▪ Заводские приемо-сдаточные испытания (FAT) / Factory Acceptance Tests (FAT): IQ, OQ – оборудования и IQ, OQ – компьютеризированной системы. Участие представителей Заказчика в предотгрузочных испытаниях (FAT). Срок проведения согласовывается с Заказчиком. Квалификация проводится на заводе Заказчика. Квалификация IQ включает квалификацию всего оборудования и компьютеризированных систем, включая составные части. Предоставляется заказчику протокол и отчет.

▪ Поставка и монтаж. Продавец обязуется поставить оборудование на определенных условиях. Продавец должен оказать услуги по шефмонтажу (оказание услуг оформляется актом сдачи-приемки оказанных услуг), провести SAT (проведение SAT оформляется протоколами испытаний, отчетом и актом приемки оборудования) и оказать услуги по обучению персонала Заказчика (оказание услуг оформляется протоколом обучения и актом сдачи-приемки оказанных услуг).

▪ Приемо-сдаточные испытания участка (SAT) / Site Acceptance Tests (SAT): IQ, OQ – оборудования и IQ, OQ – компьютеризированной системы. Приемочные испытание SAT, в течение 10 дней не менее чем двумя инженерами фирмы-производителя, выполняемые одновременно с пуско-наладкой оборудования и компьютеризированных систем. Дата проведения согласовывается с заказчиком. Квалификация IQ включает квалификацию всего оборудования и компьютеризированных систем, включая составные части. Предоставляется заказчику протокол и отчет.

▪ Квалификация эксплуатации (PQ) проводится на заводе Заказчика.

• *Условия окружающей среды.* Необходимо прописать летние и зимние условия окружающей среды в помещении.

7. Требования к оборудованию. В данном разделе детально представлено техническое задание, в котором описаны все необходимые моменты.

8. Необходимые квалификационные работы. В данном разделе прописывается, что образцы протоколов поставляются Поставщиком и предварительно согласуются с Заказчиком. Список необходимых документов согласно техническому может быть следующий:

• Поддержка квалификации проекта (DQ) (обеспечение сертификатами, чертежами, отчетами и т.п);

• Приемо-сдаточные испытания на заводе (FAT):

o Подготовка протоколов для FAT Поставщиком;

o FAT протоколы предварительно утверждается Заказчиком;

o Выполнение FAT испытаний при участии Заказчика;

o Документирование FAT в протоколах и отчетах.

• Приемо-сдаточные испытания на участке Заказчика (SAT):

o Подготовка протокола для SAT Поставщиком;

o SAT протокол утверждается Заказчиком;
o Выполнение SAT при участии Заказчика;
o Документирование SAT в протоколах и отчетах.
• Квалификация рабочих характеристик (PQ) (участие Поставщика на выбор Заказчика).
9. Необходимые документы для квалификации и документирования.

Обобщая данную тему, можно сказать, что необходимо выполнить 3 главных пункта при составлении данного документа:

• Подготовленная URS должна быть согласована со всеми компетентными службами компании (т.е. рабочей группой) и утверждена, как документ потребителя;

• Каждой URS должен быть присвоен свой порядковый номер, с помощью которого можно следить за дальнейшими работами, такими как квалификация, тестирование (FAT/SAT) и т.д.;

• URS должна быть направлена потенциальным поставщикам оборудования/систем для оценки, согласования, а затем документ виде приложения должен стать частью контакта на поставку.

Делая вывод, хотелось бы сказать, что основные этапы подбора оборудования – это сложный и многофункциональный процесс, который включает в себя этапы от проектирования оборудования до его валидирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. ЗАО «Биокад» – строительство завода в Зеленограде. Доступно по: https://pharmdesign.ru/projects/zao-biokad-v-oez-alabushevo.html [дата обращения –19.02.2021];

2. ГЕНЕРИУМ запустил производство вакцины Спутник V. Доступно по: https://www.generium.ru/about/press_center/company_news/generium-zapustil-proizvodstvo-vaktsiny-sputnik-v/ [дата обращения –19.02.2020];

3. Эдвансд Фармасьютикалс. Доступно по: https://pharmdesign.ru/projects/edvansd-farmasyutikals.html [дата обращения –19.02.2020].

SUMMARY

THE MAIN STAGES OF THE SELECTION OF EQUIPMENT DURING THE TECHNICAL EQUIPMENT OF A NEW PRODUCTION FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEINS

Davydova I.V., 2nd year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The compilation of the User Requirements Specification (URS) is described, the sections that must be included in this document and the specific requirements related to biotechnological equipment are indicated.

Key words: *URS, user requirements specification, FAT, SAT, hardware.*

REFERENCES

1. CJSC «Biocad» – construction of a plant in Zelenograd. Available at: https://pharmdesign.ru/projects/zao-biokad-v-oez-alabushevo.html [accessed – 19.02.2020] (in Russ)

2. GENERIUM launched production of the Sputnik V vaccine Available at: https://www.generium.ru/about/press_center/company_news/generium-zapustil-proizvodstvo-vaktsiny-sputnik-v/ [accessed – 19.02.2020] (in Russ)

3. Advanced Pharmaceuticals Available at: https://pharmdesign.ru/projects/edvansd-farmasyutikals.html [accessed – 19.02.2020] (in Russ).

КАРАНДАШ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ НА ОСНОВЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА ХВОИ ЕЛИ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА

Данилова К.В., магистрант 1 года обучения
Руководитель: **Новикова Е.К.**, канд. фарм. наук, ст. преподаватель
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: konsta-kseniya@yandex.ru

Изучена перспективность получения карандаша лекарственного на основе сухого экстракта и эфирного масла из хвои ели обыкновенной, обладающего антибактериальным и муколитическим действием. Также исследовано влияния природы экстрагента, температуры и времени экстрагирования на содержание экстрактивных веществ.

Ключевые слова: *карандаш лекарственный, ель обыкновенная, хвоя ели, экстрактивные вещества, эфирное масло, сухой экстракт.*

В настоящее время заболевания органов дыхания остаются наиболее распространенными. Большинство заболеваний сопровождается кашлем: ОРВИ, бронхит, бронхиальная астма, заболевания ЛОР-органов, а также новая коронавирусная инфекция. Кашель – это защитный безусловный рефлекс на любое раздражение дыхательных путей, мешающее проходимости воздуха.

Для лечения кашля используют муколитические, отхаркивающие и противокашлевые средства. Муколитические средства – это лекарственные средства, разжижающие мокроту и облегчающие выведение ее из легких. Муколитики применяют при бронхитах, пневмонии, бронхиальной астме, оказывают влияние на сам процесс воспаления в дыхательных путях.

Согласно DSM group, за январь 2020 и 2021 года доля препаратов для лечения заболеваний респираторной системы уменьшилась на 1,3% в стоимостном выражении. При этом большая часть препаратов содержат действующие вещества синтетического происхождения.

Цель исследования: изучить перспективность получения медицинского карандаш на основе сухого экстракта и эфирного масло хвои ели, оказывающего антибактериальное и муколитическое действие.

Задачи исследования:

• Изучить перспективность применения карандашей лекарственных

• Изучить перспективность исследования хвои ели

• Изучить влияние природы экстрагента, температуры и времени экстрагирования на содержание экстрактивных веществ сухом остатке, полученном из хвои ели.

Медицинские карандаши, в последнее время, получили широкое распространение. Их используют в качестве ранозаживляющего агента, обезболивающего и антисептического средства, а также их применяют при лечении респираторных заболеваний. Ассортимент карандашей лекарственных, выпускаемых как отечественной фармацевтической промышленностью, так и зарубежной, достаточно ограничен.

Данную лекарственную форму можно использовать в ингаляционных процедурах. Карандаши лекарственные имеют преимущества в сравнении с другими формами для ингаляций: компактность и портативность, удобство применение, гигиеничность; также есть возможность введения в основу лекарственных веществ, имеющих разные физико-химические свойства, экономичность упаковки.

На рынке лекарственных средств на жировосковой основе пока нет продукта, в основе которого лежит сухой экстракт и эфирное масло хвои ели.

Эфирное масло хвоя ели обладает антибактериальными и противогрибковыми свойствами, в основном против грамм-положительных микроорганизмов, оказывает муколитическое действие, проявляет противовоспалительный и спазмолитический эффекты. Состав эфирного масла многообразен. В него входят монотерпены и сесквитерпены. Большинство компонентов очень полезны для человека. Камфен, фелландрен и лимонен обладают противовоспалительным эффектом, борнеол, борнилацетат, кадинен и сантен оказывают заживляющее действие. Камфора стимулирует дыхание и повышает тонус сосудов. Пинен способен улучшать память, улучшает дыхательную функцию и оказывает защитное действие на поджелудочную железу и легких.

Сухой экстракт регулирует обмен веществ, улучшает кроветворение, оказывает обезболивающее и бактерицидное действие.

Из выше сказанного, можно сделать вывод, что исследование хвои ели, обладающей множеством полезных свойств, является достаточно перспективным.

Изучение влияния природы экстрагента, температуры и времени экстрагирования на содержание экстрактивных веществ.

На содержание экстрактивных веществ, выделяемых из растительного материала, оказывается влияние множества факторов:

• метод экстрагирования

• экстрагент

• температурный режим

• длительность процесса

Для определения оптимальных условий процесса экстракции получали извлечение по следующей методике, изменяя исследуемый параметр.

Точную навеску сырья 5,0 г помещали в колбу на 100 мл, добавляли заданное количество экстрагента и выдерживали определённое время при различной температуре на ультразвуковой бане. Полученное извлечение отфильтровывали через бумажный фильтр и отстаивали в течение 2-х дней. После отставания извлечение выпаривали на атмосферном воздухе и сушили в сушильном шкафу до получения сухого остатка.

Изучалось влияние природы экстрагента на содержание экстрактивных веществ. В качестве экстрагента использовались вода очищенная и спирт этиловый с концентрацией 70%. Параметры экстрагирования: температура 50°С и время от 5 мин до 20 мин. График зависимости содержания экстрактивных веществ от природы экстрагента представлен на рисунке 1.

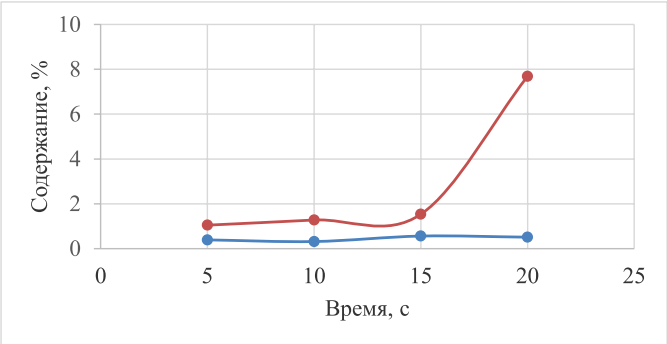


Рисунок 1. График зависимости содержания экстрактивных веществ от природы экстрагента

Таким образом, при использовании 70-ти % этилового спирта в качества экстрагента содержание экстрактивных веществ будет наибольшим.

Проводилось изучение влияния температуры в диапазоне от 30°С до 70°С при длительности экстрагирования 20 минут. Профиль зависимости содержания экстрактивных веществ от температуры представлен на рисунке 2.

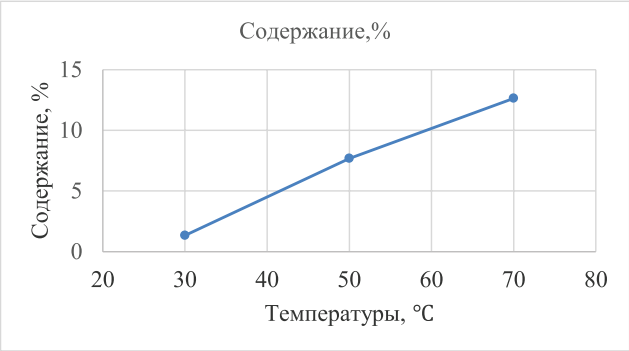


Рисунок 2. Профиль зависимости содержания экстрактивных веществ от температуры экстрагирования

Таким образом, можно сказать, что наибольшее количество экстрактивных веществ в сухом остатке будет при получении извлечения при температуре 70°С.

Для определения длительности, при которой в сухом остатке будет наибольшее количество экстрактивных веществ, проводили экстрагирование в интервале от 5 до 30 минут при температуре 70°С. График в зависимости количества экстрактивных веществ от времени представлен на рисунке 3.

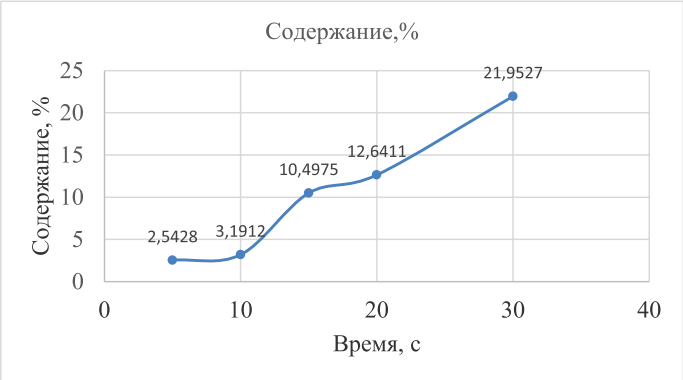


Рисунок 3. Профиль зависимости содержания экстрактивных веществ от времени экстрагирования

Итак, можно сделать вывод, что содержание экстрактивных веществ растет по мере увеличения времени экстрагирования.

Для экстрагирования экстрактивных веществ из хвои ели были выбраны следующие параметры: 70% этиловый спирт и температура 70°С. Метод: экстракция на ультразвуковой бане.

На основании обзора литературы можно сказать, о том, что получение медицинского карандаша на основе сухого экстракта и эфирного масла из хвои ели является перспективным.

Изучено влияние природы экстрагента, температуры и времени экстрагирования на содержания экстрактивных веществ. Выбраны параметры экстрагирования, при которых содержание экстрактивных веществ наибольшее: экстрагент – 70% этиловый спирт, Т = 70°С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. ОФС 1.4.1.0028.18 «Карандаши лекарственные». Москва, 2018. Доступно по: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php
2. DSM Group. Фармацевтический рынок России. Январь 2021. Доступно по: https://dsm.ru/upload/iblock/f6b/f6bcdbfd14cd6d5e6899b58770cd9d99.pdf
3. Обзор рынка противокашлевых и отхаркивающих препаратов. Фармацевтический вестник. 2017;3:874.
4. Кузнецова ЛС, Лихота ТТ. Разработка состава, технологии и анализ карандашей медицинских с камфорой. Фундаментальные исследования. 2011;11(3):522-525.
5. R05 Кашель. Регистр лекарственных средств России Доступно по: https://www.rlsnet.ru/mkb_index_id_7948.htm
6. Природа против кашля. Ремедиум Доступно по: https://remedium.ru/pharmacy/priroda-protiv-kashlya

SUMMARY

MEDICINAL PENCIL BASED ON DRY EXTRACT OF SPRUCE NEEDLES AS A PROMISING DOSAGE FORM

Danilova K.V., 1-year Master's Degree
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The perspectives of obtaining a medicinal pencil based on dry extract and essential oil from common spruce needles, possessing antibacterial and mucolytic effects, have been studied. The influence of the extractant, temperature and time on the yield of extractives from raw materials was also investigated.

Key words: *medicinal pencil, Norway spruce, spruce needles, extractives, essential oil, dry extract.*

REFERENCES

1. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. OFS 1.4.1.0028.18 "Medicinal pencils". Moscow, 2018. Available at: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php
2. DSM Group. Russian pharmaceutical market. January 2021. [Electronic resource]. Available at: https://dsm.ru/upload/iblock/f6b/f6bcdbfd14cd6d5e6899b58770cd9d99.pdf
3. Market overview of antitussive and expectorant drugs. Pharmaceutical Bulletin. 2017;3:874.
4. Kuzneczova LS, Lixota TT. Development of the composition, technology and analysis of medical pencils with camphor. Basic research. 2011;11(3):522-525.
5. R05 Cough. Register of medicines of Russia. Available at: https://www.rlsnet.ru/mkb_index_id_7948.htm
6. Nature against cough. Remedium. Available at: https://remedium.ru/pharmacy/priroda-protiv-kashlya

РАЗРАБОТКА СОСТАВА КРЕМА НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА ЧЕРЕДЫ ТРЕХРАЗДЕЛЬНОЙ ТРАВЫ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ЭКЗЕМЫ

Дмитриева В.Д., студ. 5 курса
Руководители: **Буракова М.А.**, к. фарм. н., доц., **Скляревская Н.В.**, к. фарм. н., доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: dmitrieva.viktoriya@pharminnotech.com

В ходе исследования были определены основные группы биологически активных веществ, их качественный и количественный состав в образцах череды трехраздельной травы. Подобран рациональный режим двухфазной экстракции для сырья череды трехраздельной, получены экстракты, содержащие флавоноиды и каротиноиды. Был разработан состав крема на основе полученных экстрактов.

Ключевые слова: *череда трехраздельная, флавоноиды, каротиниоды, двухфазная экстракция, крем.*

Подходы к лечению экземы являются актуальными, поскольку удельный вес заболеваемости среди кожной патологии в мире составляет 30–40%. Несмотря на развитие рынка синтетических препаратов, растительные дерматологические средства не потеряли своей значимости – их продолжают широко применять в комплексном лечении кожи, в том числе в лечении этого заболевания [1]. Поэтому разработка состава крема на основе экстракта череды трехраздельной травы для комплексной терапии и профилактики экземы является актуальной задачей. Череда трехраздельная (*Bidens tripartita* L.) – однолетнее травянистое растение семейства *Asteraceae*, трава которого широко используется в дерматологии, в комплексном лечении таких заболеваний, как экзема, псориаз, диатез, аллергия, угревая сыпь [2]. Применение сырья *Bidens tripartita* в дерматологии обусловлено ее химическим составом. Трава череды трехраздельной содержит каротиноиды, аскорбиновую

кислоту, флавоноиды, дубильные вещества, полисахариды и другие биологически активные вещества, то есть как липофильные, так и гидрофильные соединения, благоприятно влияющие на исход заболевания [3].

Таким образом, целью исследования является разработка состава крема на основе экстракта череды трехраздельной травы для комплексной терапии и профилактики экземы.

В качестве объекта исследования использовали четыре образца череды трехраздельной травы. Сырье было заготовлено в период массового цветения в окрестностях г. Санкт-Петербурга (2017 г.) и в Ленинградской области (2020 г.). В исследовании также использовали образцы промышленного изготовления фирм-производителей АО «Красногорсклексредства» (2019 г.) и ООО «Фирма «Здоровье» (2020 г.). Фитохимический анализ проводили по общепринятым методикам с использованием качественных реакций на основные группы биологически активных веществ. Для определения качественного состава флавоноидов использовали хроматографию в тонком слое сорбента. Количественную оценку содержания флавоноидов в траве череды проводили методом дифференциальной спектрофотометрии после реакции с алюминия хлорида раствором 2% по методике Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) [4]. Количественное содержание каротиноидов определяли спекротофотометрическим методом при длине волны 450 нм.

Двухфазную экстракцию осуществляли на ультразвуковой ванне ПСБ-Галс (Россия). В рациональном режиме экстрагирования, были получены масляный и пропиленгликолевый экстракты, содержащие соответственно каротиноиды и флавоноиды, которые затем вводили в состав крема. Осуществляли выбор основы для крема на основе органолептических свойств для последующей разработки косметического средства с масляным и пропиленгликолевым экстрактами череды трехраздельной. Крем представлял собой эмульсию второго рода – вода-в-масле, для наилучшего удержания влаги в коже при экземе.

Полученный крем был подвергнут анализу по следующим показателям: внешний вид, цвет, запах, pH водной вытяжки, коллоидная стабильность.

Коллоидную стабильность определяли по методике В.М. Грецкого. 10 мл крема вносили в пробирку, которую помещали в морозильную камеру холодильника на 30-40 мин. Затем пробирку погружали в воду с температурой 25° С для оттаивания и центрифугировали в течение 5 мин при частоте вращения 6000 об/мин.

Коллоидную стабильность (К) рассчитывали по формуле:

$$К = \frac{H1}{H},$$

где H_1 – высота жидкости, выделившейся после центрифугирования, мм;

Н – высота слоя крема в пробирке первоначальная, мм.

Крем, у которого К=0 считали стабильным.

Определение pH проводили следующим образом: навеску крема 2 г вносили в стакан с 50 мл воды очищенной, нагретой до температуры 50-60° С и встряхивали в течение 30 мин. Вытяжку фильтровали через ватный тампон и проводили потенциометрическое определение pH полученного извлечения. Удовлетворительный диапазон значений: 5,0-6,5 [5,6].

В образцах надземной части *Bidens tripartita* были обнаружены флавоноиды, дубильные вещества, кумарины, полисахариды, сапонины, каротиноиды и хлорофиллы. Методом хроматографии в тонком слое сорбента на пластинках «Sorbfil ПТСХ–АФ–А–УФ» в системе растворителей *н*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2) в сравнении со стандартными образцами в траве череды трехраздельной идентифицировали рутин, кверцетин, гиперозид, лютеолин.

На следующем этапе исследования определяли количественное содержание флавоноидов и каротиноидов в образцах сырья. Содержание флавоноидов в траве череды трехраздельной составило от 2,7% до 3,5%. Установлено, что большее количество флавоноидов извлекается из сырья, заготовленного в Ленинградской области в 2020 г. Количественное содержание каротиноидов в надземной части *Bidens tripartita* составило от 0,1% до 0,2%. Определено, что большее количество каротиноидов извлекается из сырья, заготовленного в Ленинградской области (2020 г.).

Для выделения БАВ липофильной и гидрофильной фракций использовали метод двухфазной системы экстрагентов. Данный метод позволил выделить липофильную и гидрофильную фракции за один технологический цикл. В качестве экстрагентов использовали кукурузное масло и спирт этиловый 70%. Так как спирт способен проникать в кожу, вызывая обезвоживание, в состав экстрагента введен пропиленгликоль в количестве 20%. Были применены следующие условия экстрагирования: рабочая частота ультразвука 34 кГц, соотношение сырье экстрагент (1:10), время проведения процесса – 5, 10, 15, 20, 30 мин, температура – 50° С. Оценку эффективности процесса проводили по сумме каротиноидов и флавоноидов в полученных экстрактах. В ходе исследований было установлено, что рациональный режим экстрагирования достигается при 50° С в течение 10 минут. В результате было получено два экстракта на основе кукурузного масла и пропиленгликоля, которые были введены в состав крема.

Масляный экстракт представляет собой источник каротиноидов и хлорофиллов. Каротиноиды оказывают противовоспалительное и ранозаживляющее действие. Хлорофиллы – антиоксидантное действие, ускоряют заживление ран, повышают упругость кожи и улучшают ее внешний вид.

Пропиленгликолевый экстракт содержит флавоноиды, которые обуславливают противовоспалительное, а также антимикробное и антиаллергенное действие.

В ходе исследования нами были разработаны следующие композиции основ, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Компонентный состав основ

Компоненты		Состав 1	Состав 2	Состав 3
Масляная фаза, %	Масла, %	Кукурузное масло 20%	Кукурузное масло 10 % Кокосовое масло 10%	Кукурузное масло 18% Кокосовое масло 2%
	Эмульгаторы, %	Липодерм 10 – 15%	Липодерм 10 – 15%	Воск пчелиный 2% МГД 4% Ланолин безводный 3%
Водная фаза, %		Пропиленгликоль 5% ТЭА 0,3% Вода очищенная до 100 %	Пропиленгликоль 5% ТЭА 0,3% Вода очищенная до 100 %	Пропиленгликоль 5% ТЭА 0,3% Вода очищенная до 100 %

Контроль качества основ осуществляли по следующим параметрам: внешний вид, цвет, запах, pH водной вытяжки, коллоидная стабильность, результаты анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты анализа основ

Наименование показателя	Характеристика и норма	Экспериментальные значения		
		Состав 1	Состав 2	Состав 3
Органолептические свойства	Желтоватый, однородный, легкой консистенции, хорошо впитывается, при растирании на коже отсутствует липкость, ощущается легкий запах кукурузного масла	Желтый, однородный, легкой консистенции, плохо впитывается, оставляет липкость на коже, присутствует раздражающий запах кукурузного масла	Желтоватый, неоднородный, плотной консистенции, плохо впитывается, оставляет жировую пленку и липкость на коже, присутствует легкий аромат кукурузного масла	Желтоватый, однородный, легкой консистенции, хорошо впитывается, при растирании на коже отсутствует липкость, ощущается легкий запах кукурузного масла
Коллоидная стабильность	Стабилен	Не стабилен	Не стабилен	Стабилен
Водородный показатель pH	5,0-6,5	5,5±0,1	6,4±0,3	6,0±0,1

В результате исследования было установлено, что состав 3 обладал удовлетворительными технологическими показателями, а составы 1 и 2 не соответствовали заявленным критериям.

Для улучшения терапевтического эффекта в состав основы № 3 дополнительно были введены следующие компоненты:

• Коллаген – образует воздухонепроницаемый и влагоудерживающий слой, усиливает процессы; регенерации

• Сквалан – восстанавливает роговой слой кожи, стимулирует клеточный рост, способствует глубокому проникновению в кожу витаминов

• Мочевина – стимулирует выработку ферментов, которые ускоряют обновление клеток эпидермиса

• Д-пантенол – снимает зуд и болевые ощущения, оказывает увлажняющее действие и справляется с воспалительными процессами

• Витамин Е – способствует поддержанию синтеза коллагена и эластина, антиоксидант.

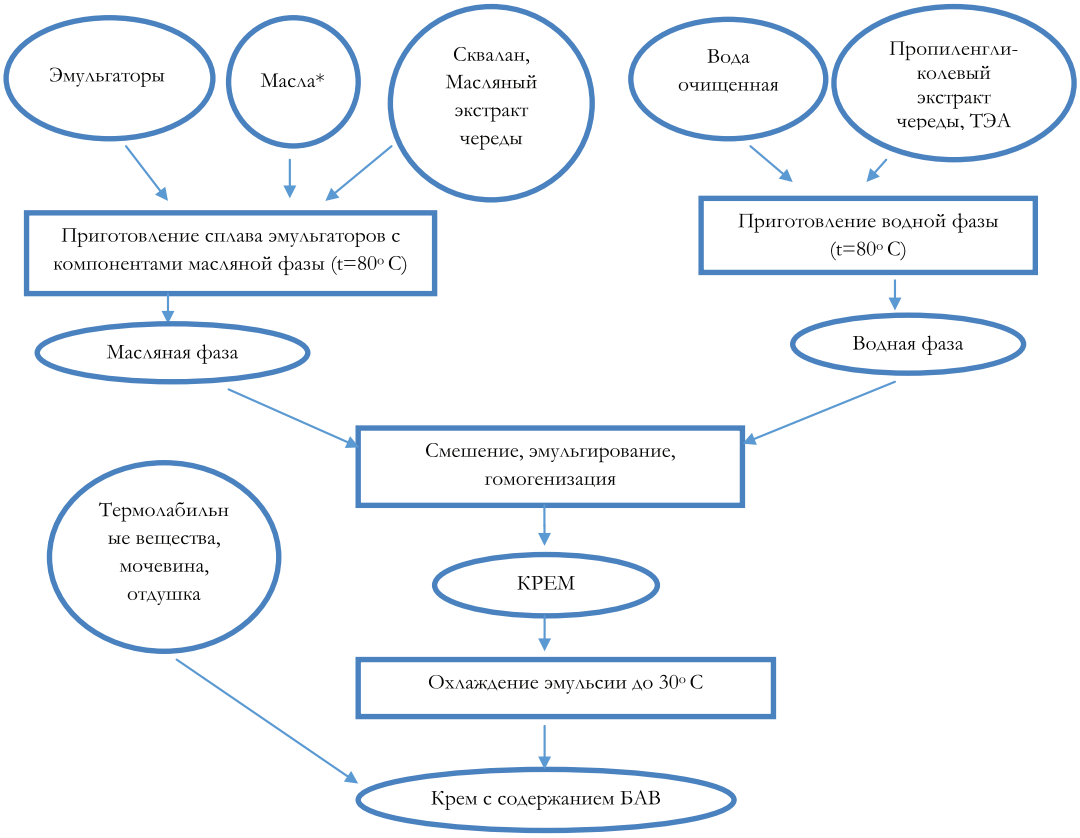
Для приятного аромата было предложено введение ароматизаторов. В качестве консервантов были выбраны метилпарабен (нипагин) и пропилпарабен (нипазол), которые препятствуют микробной контаминации [7, 8]. Таким образом, был определен состав крема на основе экстрактов сырья *Bidens tripartita* (таблица 3).

Таблица 3 – Состав крема на основе экстрактов череды трехраздельной

Компонент	Процент %
Вода очищенная	До 100%
Кукурузное масло	18%
МГД	4%
Масляный экстракт череды, содержащий каротиноиды	3%
Пропиленгликолевый экстракт череды, содержащий флавоноиды	5%
Ланолин безводный	3%
Воск пчелиный	2%
Сквалан	2%
Кокосовое масло	2%
Мочевина	2%
Д-Пантенол	1,5%
Витамин Е	1%

Компонент	Процент %
Коллаген	1%
Нипагин Нипазол	0,3%
Триэтаноламин (ТЭА)	0,3%
Эфирное масло	0,1%

Процессуальная схема получения крема представлена на рисунке 1.



Примечание: *Масла – кукурузное и кокосовое масло;
**Термолабильные вещества – витамин Е, коллаген, Д-пантенол

Рисунок 1. Процессуальная схема получения эмульсионного крема на основе экстракта череды трехраздельной

Таким образом, на основе количественного определения действующих веществ был определен образец травы череды трехраздельной, содержащий большее количество каротиноидов и флавоноидов, выбран рациональный режим экстрагирования, получен масляный экстракт, содержащий каротиноиды, и пропиленгликолевый экстракт, содержащий флавоноиды. На основании полученных результатов получены составы основ, проведен анализ их технологических свойств, а также разработан состав крема, применяемого в комплексной терапии экземы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клинические рекомендации Экзема. Общероссийская общественная организация «Российское общество дерматовенерологов и косметологов». 2020.

2. Zargari A. Medicinal Plants, Vol 1. 5th Edn. Tehran: Tehran University Publications, 2001

3. Thomas Fleming. Physician's Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines. Medical Economics Company, Inc. at Montvale, NJ 07645-1742. 2000

4. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд., т. 4. ОФС.2.5.0048.15 «Череды трехраздельной трава». Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

5. El-Beltagi HES, Mohamed AA. Variations in fatty acid composition, glucosinolate profile and some phytochemical contents in selected oil seed rape (Brassica napus L.) cultivars. Fats Oil. 2010;61(2):143-150.

6. Szydlowska-Czerniak A, Trokowski K, Karlovits G, Szlyk E (). Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties. J. Agric. Food Chem. 2010;58:7502- 7509.

7. ТР ТС 009/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности парфюмерно-косметической продукции». Доступно по: http://docs.cntd.ru/document/902303206

8. Пучкова Т. Косметическая химия. Москва: Школа косметических химиков, 2005.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF THE CREAM COMPOSITION BASED ON THE EXTRACT OF BURR MARIGOLD FOR COMPLEX THERAPY AND PREVENTION OF ECZEMA

Dmitrieva V.D., 5th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

In the course of the study, the main groups of biologically active substances, their qualitative and quantitative composition in samples of a series of Burr Marigold were identified. A rational mode of two-phase extraction was selected for the raw materials of a tripartite sequence, extracts containing flavonoids and carotenoids. The composition of the cream was developed based on the obtained extracts.

Key words: *Bidens tripartita, Burr Marigold, flavonoids, carotenoids, biphasic extraction, cream*

REFERENCES

1. Klinicheskie rekomendacii Ekzema. Obshcherossijskaya obshchestvennaya organi-zaciya «Rossijskoe obshchestvo dermatovenerologov i kosmetologov», 2020. (in Russ)
2. Zargari A. Medicinal Plants, Vol 1, 5th Edn. Tehran: Tehran University Publications, 2001.
3. Thomas Fleming. Physician's Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines. Medical Economics Company, Inc. at Montvale, NJ 07645-1742. 2000
4. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd. Tom 4. OFS.2.5.0048.15 «CHeredy trekhrazdel'noj trava». Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)
5. El-Beltagi HES, Mohamed AA. Variations in fatty acid composition, glucosinolate profile and some phytochemical contents in selected oil seed rape (Brassica napus L.) cultivars. Fats Oil. 2010;61(2):143-150.
6. Szydlowska-Czerniak A, Trokowski K, Karlovits G, Szlyk E. Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties. J. Agric. Food Chem. 2010;58:7502-7509.
7. TR TS 009/2011 Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza "O bezopasnosti parfyumerno-kosmeticheskoj produkcii". Available at: http://docs.cntd.ru/document/902303206 (in Russian)
8. Puchkova T. Kosmeticheskaya himiya. Moscow: SHkola kosmeticheskih himikov, 2005.

ОБЗОР ПРЕИМУЩЕСТВ НАНОСИСТЕМЫ С БЕТУЛИНОМ КАК ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА С ПОВЫШЕННОЙ БИОДОСТУПНОСТЬЮ

Жидких А.С., магистрант 1 года обучения
Руководитель: **Шиков А.Н.**, докт. фарм. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: zhidkih.anna@pharminnotech.com

Бетулин – представитель пентациклических тритерпеноидов, содержащийся в больших количествах в коре березы. На сегодняшний день имеется множество исследований, доказывающих активность бетулина против раковых леток, против вирусов, а также против бактериальных инфекций. Но особенности строения бетулина затрудняют его растворимость в организме, и, следовательно, снижают его биодоступность. С помощью наночастиц(НЧ) мезопористого кремнезема удается способствовать пролонгированию терапевтического эффекта и устранить проблемы, связанные с плохой растворимостью. В данном обзоре обобщены возможности бетулина в борьбе с многочисленными заболеваниями, дана характеристика наноматериала мезопористого кремнезема, а также представлена сравнительная характеристика биодоступности свободного бетулина с биодоступностью наносистемы, содержащей бетулин.

Ключевые слова: *бетулин, наносистема, биодоступность, мезопористый кремнезем, мезопористые наночастицы кремнезема*

Природные соединения с недавних пор стали все больше привлекать внимание исследователей в качестве эффективной терапии против множества заболеваний. Бетулин – это тритерпеновый спирт ряда лупана, имеющий брутто-формулу $C_{30}H_{50}O_2$ и химическое название бетуленол. Он содержится в большом количестве растений, но в промышленных масштабах его можно получить только экстракцией из пробкового слоя внешней коры Betula alba, B. pendula, B. pubescens и B. platyphylla [1]. В воде нерастворим, но сравнительно хорошо растворяется в кипящем этаноле, серном эфире, хлороформе и бензоле.

Бетулин обладает ценными фармакологическими свойствами. Его эффективность была доказана против бактериальных инфекций и вирусов, а также существует ряд исследований, подтверждающих противораковую активность. Оценка токсичности показывает, что бетулин является абсолютно безопасным соединением и не проявляет токсических эффектов [2]. Однако плохая растворимость данного соединения делает его применение практически невозможным, так как биодоступность чрезвычайно мала.

Доставка лекарств на основе наночастиц – один из наиболее многообещающих подходов к решению проблем, связанных с доставкой терапевтических соединений к интересующему месту. Размер частиц в наномасштабе обеспечивает им доступ ко многим другим недоступным областям тела. С помощью систем доставки лекарств на основе наночастиц интересующее лекарство может накапливаться в необходимом месте, благодаря чему лекарство проникает через целевые клетки [3]. Среди наноматериалов, представляющих интерес для фармацевтических разработок, мезопористые наночастицы диоксида кремния обеспечивают идеальную платформу для исследовательских усилий. Функциональные преимущества и гибкие возможности дизайна мезопоистых наночастиц кремнезема(МЧК) делают их привлекательными инструментами для доставки лекарств [3].

Актуальность данного исследования обусловлена ценностью бетулина, как биологически активного вещества, способного бороться с множеством тяжелых заболеваний. Основной акцент ученых направлен на модификацию данного соединения, например, поиск новых составов, новых улучшенных производных с целью повышения их растворимости в воде и улучшении направленного действия на необходимые клетки организма. Бетулин, захваченный наносистемой, позволяет решить главную проблему биодоступности данного соединения.

Целью данного обзора является обобщение возможности бетулина в борьбе с вирусами и инфекционными заболеваниями, а также в борьбе с раком, представить общую характеристику наноматериала мезопористого кремнезема и представить основные преимущества наноносителей, а также сравнить биодоступность свободного бетулина с биодоступностью наносистемы, содержащей бетулин.

1. **Фармакологические свойства бетулина**

1.1 **Бетулин как противораковый агент**

Сейчас основной акцент новых стратегий лечения рака направлен на разработку методов, оказывающих минимум побочных эффектов на организм человека. Особое внимание уделяется соединениям природного происхождения, в частности терпены [4].

Как показывают исследования in vivo и in vitro бетулин проявляет цитотоксичность к многим раковым клеткам, при этом оставаясь безопасным для доброкачественных клеток. Интенсивность свойств бетулина, подавляющих рост раковых клеток, во многом зависит от типа этих клеток. В ряде исследований была доказана цитотоксичнсть бетулина против нервных опухолевых клеток, рака легких, рака груди, шейки матки и др. Также бетулин препятствовал миграции раковых клеток [4].

Таким образом, если синергировать типичные синтетические лекарственные препараты(ЛП), которые применяют в терапии рака, с бетулином, можно повысить эффективность лечения.

1.2 **Гепатопротекторная активность бетулина**

Установлено, что бетулин также эффективен при лечении гепатита С, поражающего печень. Несмотря на то, что типовое лечение гепатита С пегилированным интерфероном и рибавирином довольно результативное и уничтожает вирус, отмечается низкая переносимость и множественные побочные эффекты [5].

Обнаружено противовирусное действие бетулина как in vitro на культивированных клетках, на которых создавалась модель гепатита С, так и in vivo на мышах и крысах. Также было проведено исследование на пациентах, страдающих хроническим гепатитом С, на выявление гепатопротекторной активности беутлина. Анализ показал, что к концу 12 недели экспериментального лечения уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) и РНК ВГС были снижены, и заметно облегчились клинические симптомы [6].

1.3 **Антибактериальная активность бетулина**

Инфекционные заболевания, которые вызваны бактериями множественной лекарственной устойчивости(МЛУ) стали очень серьезной проблемой. Фактически единственным способом борьбы с этими бактериями использование либо новых антибиотиков, либо комбинацией антибиотиков разных категорий [1]. Растущее число бактериальных инфекций вызывается устойчивыми к антибиотикам штаммами и стойкими биопленками, которые представляют собой структурированные сообщества бактериальных клеток [7].

Для доказательства противовоспалительного эффекта бетулина при грамотрицательной бактериальной пневмонии, было исследовано его влияние на индуцированную липополисахаридами(ЛПС) активацию клеточных линий in vitro. Результаты экспериментов показали, что введение бетулина снижает экспрессию медиаторов воспаления. В ходе исследования in vivo мышам индуцировали острое повреждение легких и вводили внутрибрюшинно бетулин в дозах 4 мг/кг и 8 мг/кг. После анализов было доказано, что бетулин способствует снижению отека легких на 7,8-10,6% и уровня провоспалительных цитокинов. Результаты гистологического исследования влияния бетулина на пневмонию, индуцированную жизнеспособной E. Coli, представлены на рисунке 1 [8].

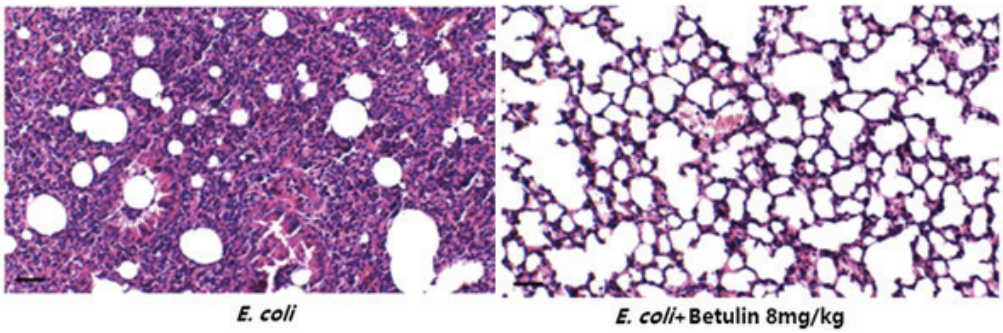


Рисунок 1. Гистологический анализ. Влияние бетулина на рост клеток *E. coli*

По результатам анализа было замечено снижение КОЕ ровно через сутки у мышей, которым вводили бетулин 8мг/кг [8].

Исследование влияния бетулина на повреждения лёгких и печени при сепсисе проводили на крысах, создавая модель сепсиса и вводя внутрибрюшинно дозы бетулина 4 мг/мл и 8 мг/мл. В рамках эксперимента был выявлен заметный рост выживаемости около 60%, снижены отек легких и повреждение печени [9]. Следовательно, можно судить о бетулине, как о дальнейшей стратегии в лечении сепсиса.

Mycobacterium tuberculosis является основным возбудителем туберкулеза. Для выявления антимикобактериальной активности помимо бетулина были выбраны еще три производных данных соединения. Результаты эксперимента говорят о наивысшей антимикобактериальной активности бетулина на фоне остальных соединений: минимальная ингибирующая концентрация 12,5 мкг/мл и концентрация полумакисмального ингибирования 2,4 мкг/мл [10].

1. **Наноматериалы мезопористого кремнезема**

1.1. **Общая характеристика наночастиц мезопористого кремнезема**

Кремнезем уже был изучен как наноноситель для таких ЛП как ибупрофен, каптоприл, камптотецин, итраконазол, индометацин, сальвианоловая кислота В, белки и ДНК.

Основная методика для изготовления НЧ предполагает золь-гель синтез, т.е. реакция между предшественником, например, тетраэтилортосиликатом (ТЭОС) и водным раствором низкомолекулярного спирта в присутствии катализатора гидролиза аммиака [11]. Мицеллы, образованные катионными поверхностно-активными веществами (ПАВ), также применяют в качестве темплатов, вокруг которых конденсируются силикаты. В ходе реакции олигомеров кремниевой кислоты (ОКК) с мицеллами ПАВ происходит их превращение в упорядоченную мезофазу [12].

Типовым способом загрузки лекарственных соединений в наносистему является погружение МЧК в расвтор лекарственного средства (ЛС). Однако использование мезопористых наночастиц в немодифицированном виде приводит к резкому высвобождению ЛП [14]. Химический метод покрытия поверхности МЧК различными функциональными группами с целью их модификации является исторически наиболее развитым. Он решает ряд проблем с загрузкой, доставкой и высвобождением ЛС. В частности, модификация основана на прививке алкоксисиланов на внутреннюю или внешнюю поверхность наночастиц. В результате появляется возможность контролировать гидрофильностью/гидрофобностью полимера [12].

1.2. **Основные преимущества наночастиц мезопористого кремнезема**

Основными аспектами при разработке наноносителей является достижение ими биосовместимости и безопасности. Также наноносители должны обеспечивать высокую биодоступность, которая будет способствовать максимальному терапевтическому эффекту при однократной дозе. Важно чтобы данная наносистема доставляла молекулы лекарства точно в клетки/ткани-мишени. Основные свойства, которыми должна обладать разрабатываемая наносистема, представлены в таблице 1 [13].

Таблица 1 – Свойства наноносителей

Преимущества наноносителей перед свободными лекарствами	Наноноситель должен
• Защита ЛП от преждевременной деградации • Предотвращение преждевременного взаимодействия ЛП с биологической средой • Повышение абсорбции и проницаемости лекарств в выбранной клетке/ткани • Контроль фармакокинетики и профиля распределения ЛС в тканях	• Быть изготовленным из биосовместимого материала • Показывать высокую биодоступность • Быть растворимым или коллоидным в водных условиях • длительный срок хранения

Доказано, что аморфная форма диоксида кремния нетоксична, растворяясь в воде, он образует кремниевую кислоту, которую использует организм человека как питательное вещество. Мезопористый диоксид кремния обладает рядом преимуществ: биосовместимость, долговечность, универсальность, легкость разработки различных модификаций поверхности, настраиваемая пористость. Лекарства могут быть загружены в поры для поддержания аморфоподобной формы, что повышает их растворимость в воде.

2. **Сравнительная характеристика биодоступности свободного бетулина и наноситемы с бетулином**

Биофармацевтические свойства наносистем бетулина изучены in vitro с помощью теста «Растворение» для предварительной оценки биодоступности при пероральном введении. Для сравнения использовали свободную субстанцию бетулина и наноситемы, содержащие 20 и 30% бетулина. В качестве среды растворения была выбрана двухфазная среда вода: октанол. На рисунке 2 показаны результаты [15].

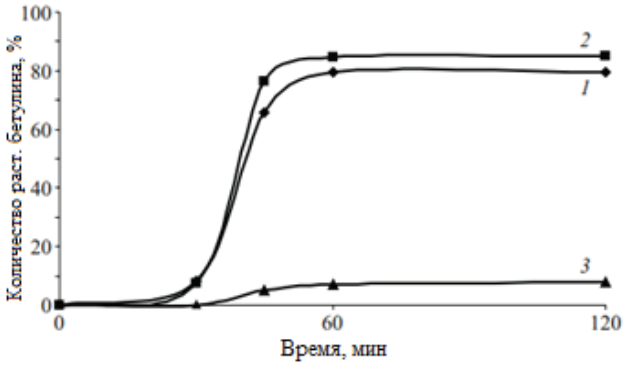


Рисунок 2. Растворение бетулина из наносистем в двухфазной среде: наносистема бетулина (20%) (1), наносистема бетулина (30%) (2), бетулин (3)

Максимальное растворение бетулина достигалось именно из наносистем и составляло около 80%. Включение субстанции бетулина в наносистему позволяет повысить его биодоступность in vitro. Скорость растворения увеличилась в 12 раз по сравнению с исходным веществом [15].

Для доказательства повышенной биодоступности бетулина, захваченного наносистемой, была исследована фармакокинетика и тканевое распределение после однократной дозы эндотрахеального введения крысам свободного бетулина и наносистемы с бетулином. Концентрации ЛС в плазме в различные интервалы времени показаны на рисунке 3 [16].

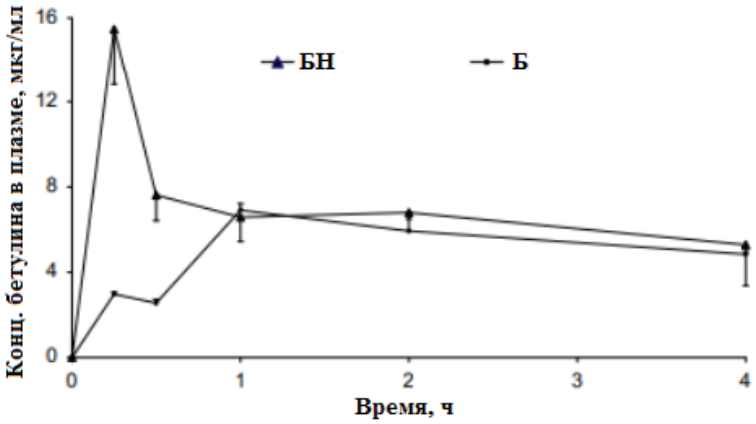


Рисунок 3. Распределение *in vivo* бетулина в Б и БН после эндотрахеального введения крысам. Средние (± стандартное отклонение) концентрации лекарственного средства в плазме. Бетулин Б, бетулин БН, захваченный наносистемой

На основании анализа данных, представленных на рисунке 3, бетулин из наносистемы быстро обнаруживался в кровотоке. Максимальный уровень ЛС в плазме был достигнут через 15 минут, в то время как максимальный уровень свободного бетулина наблюдался через 1 час [16].

По результатам всестороннего обзора возможностей применения бетулина следует отметить, что все больше исследований подтверждают фармакологическую активность данного природного соединения в борьбе с инфекционными и вирусными заболеваниями, а также против рака. Ограничением терапевтической эффективности бетулина является его плохая растворимость. Решением может быть использование наноносителей для целенаправленной доставки бетулина к клеткам/тканям мишеням. Доказано, что мезопористые наночастицы кремнезема безопасны и долговечны, не обладают токсичностью и легки в использовании для загрузки и высвобождения ЛС. На сегодняшний день существует ряд исследований, доказывающих повышение растворимости бетулина из наносистемы в сравнении со свобоными бетулином. Наносистема с бетулином обладает наибольшей биодоступностью. Таким образом, достижения, полученные в рамках исследований, обобщенных в данном обзоре, могут способствовать разработке новых эффективных фармацевтических препаратов с бетулином, которые могут быть полезны для лечения множества заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amiri S, Dastghaib S, Ahmadi M, Mehrbod P, Khadem F, Behrouj H, et al. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. Biotechnology Advances. Elsevier BV. 2020 Jan;38:107409. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.06.008.

2. Makarova MN, Shikov AN, Avdeeva OI, Pozharitskaya ON, Makarenko IE, Makarov VG, et al. Evaluation of acute toxicity of betulin. Planta Med. 2011;7(12):1411. DOI: 10.1055/s-0031-1282806.

3. Şen Karaman D, Manner S, Rosenholm JM. Mesoporous silica nanoparticles as diagnostic and therapeutic tools: how can they combat bacterial infection? Therapeutic Delivery. Future Science Ltd. 2018 Mar;9(4):241–4. DOI: 10.4155/tde-2017-0111.

4. Król SK, Kiełbus M, Rivero-Müller A, Stepulak A. Comprehensive Review on Betulin as a Potent Anticancer Agent. BioMed Research International. Hindawi Limited. 2015;2015:1–11. DOI: 10.1155/2015/584189.

5. Navaneethan U, Kemmer N, Neff GW. Review: predicting the probable outcome of treatment in HCV patients. Ther. Adv. Gastroenterol. SAGE Publications. 2009 Aug 17;2(5):287–302. DOI: 10.1177/1756283x09339079.

6. Shikov AN, Djachuk GI, Sergeev DV, Pozharitskaya ON, Esaulenko EV, Kosman VM, et al. Birch bark extract as therapy for chronic hepatitis C – A pilot study. Phytomedicine. Elsevier BV. 2011 Jul;18(10):807–10. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.01.021.

7. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS. Wiley. 2013 May;121:1–58. DOI: 10.1111/apm.12099.

8. Wu Q, Li H, Qiu J, Feng H. Betulin protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. Microbial Pathogenesis. Elsevier BV. 2014 Oct;75:21–8. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.08.005.

9. Zhao H, Liu Z, Liu W, Han X, Zhao M. Betulin attenuates lung and liver injuries in sepsis. International Immunopharmacology. Elsevier BV. 2016 Jan;30:50–6. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.11.028.

10. Li H, Webster D, Johnson JA, Gray CA. Anti-mycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant Alnus incana. Journal of Ethnopharmacology. Elsevier BV. 2015 May;165:148–51. Available from: DOI: 10.1016/j.jep.2015.02.042.

11. Meynen V, Cool P, Vansant EF. Verified syntheses of mesoporous materials. Microporous and Mesoporous Materials. Elsevier BV. 2009 Oct;125(3):170–223. DOI: 10.1016/j.micromeso.2009.03.046.

12. Дементьева ОВ. Мезопористые частицы-контейнеры из кремнезема: новые подходы и новые возможности. Коллоидный журнал. 2020;82(5):523–47. DOI: 10.31857/s0023291220050031.

13. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nature Nanotechnology. Springer Science and Business Media LLC. 2007 Dec;2(12):751–60. DOI: 10.1038/nnano.2007.387.

14. Rosenholm JM, Lindén M. Towards establishing structure–activity relationships for mesoporous silica in drug delivery applications. Journal of Controlled Release. Elsevier BV. 2008 Jun;128(2):157–64. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.02.013.

15. Karlina MV, Pozharitskaya ON, Shikov AN, Makarov VG, Mirza S, Miroshnyk I, et al. Biopharmaceutical study of nanosystems containing betulin for inhalation administration. Pharmaceutical Chemistry Journal. Springer Science and Business Media LLC. 2010 Dec;44(9):501–3. DOI: 10.1007/s11094-010-0502-x.

16. Pozharitskaya ON, Karlina MV, Shikov AN, Kosman VM, Makarov VG, Casals E, et al. Pharmacokinetics and Tissue Disposition of Nanosystem-Entrapped Betulin After Endotracheal Administration to Rats. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. Springer Science and Business Media LLC; 2016 May 7;42(2):327–32. DOI: 10.1007/s13318-016-0340-7

SUMMARY

OVERVIEW OF THE ADVANTAGES OF BETULINE NANOSYSTEM AS A DRUG WITH INCREASED BIOAVAILABILITY

Zhidkih A.S., 1st year master student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Betulin is a representative of pentacyclic triterpenoids, contained in large quantities in birch bark. To date, there are many studies proving the activity of betulin against cancer cells, against viruses, and also against bacterial infections. But the structural features of betulin complicate its solubility in the body, and, therefore, reduce its bioavailability. With the help of silica nanoparticles (NPs), it is possible to promote prolongation of the therapeutic effect and eliminate the problems associated with poor solubility. This review summarizes the capabilities of betulin in the fight against numerous diseases, characterizes the mesoporous silica nanomaterial, and presents a comparative characteristic of the bioavailability of free betulin with the bioavailability of a nanosystem containing betulin.

Key words: *betulin, nanosystem, bioavailability, mesoporous silica, mesoporous silica nanoparticles.*

REFERENCES

1. Amiri S, Dastghaib S, Ahmadi M, Mehrbod P, Khadem F, Behrouj H, et al. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. Biotechnology Advances. Elsevier BV. 2020 Jan;38:107409. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.06.008.

2. Makarova MN, Shikov AN, Avdeeva OI, Pozharitskaya ON, Makarenko IE, Makarov VG, et al. Evaluation of acute toxicity of betulin. Planta Med. 2011;7(12):1411. DOI: 10.1055/s-0031-1282806.

3. Şen Karaman D, Manner S, Rosenholm JM. Mesoporous silica nanoparticles as diagnostic and therapeutic tools: how can they combat bacterial infection? Therapeutic Delivery. Future Science Ltd. 2018 Mar;9(4):241–4. DOI: 10.4155/tde-2017-0111.

4. Król SK, Kiełbus M, Rivero-Müller A, Stepulak A. Comprehensive Review on Betulin as a Potent Anticancer Agent. BioMed Research International. Hindawi Limited. 2015;2015:1–11. DOI: 10.1155/2015/584189.

5. Navaneethan U, Kemmer N, Neff GW. Review: predicting the probable outcome of treatment in HCV patients. Ther. Adv. Gastroenterol. SAGE Publications. 2009 Aug 17;2(5):287–302. DOI: 10.1177/1756283x09339079.

6. Shikov AN, Djachuk GI, Sergeev DV, Pozharitskaya ON, Esaulenko EV, Kosman VM, et al. Birch bark extract as therapy for chronic hepatitis C – A pilot study. Phytomedicine. Elsevier BV. 2011 Jul;18(10):807–10. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.01.021.

7. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS. Wiley. 2013 May;121:1–58. DOI: 10.1111/apm.12099.

8. Wu Q, Li H, Qiu J, Feng H. Betulin protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. Microbial Pathogenesis. Elsevier BV. 2014 Oct;75:21–8. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.08.005.

9. Zhao H, Liu Z, Liu W, Han X, Zhao M. Betulin attenuates lung and liver injuries in sepsis. International Immunopharmacology. Elsevier BV. 2016 Jan;30:50–6. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.11.028.

10. Li H, Webster D, Johnson JA, Gray CA. Anti-mycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant Alnus incana. Journal of Ethnopharmacology. Elsevier BV. 2015 May;165:148–51. Available from: DOI: 10.1016/j.jep.2015.02.042.

11. Meynen V, Cool P, Vansant EF. Verified syntheses of mesoporous materials. Microporous and Mesoporous Materials. Elsevier BV. 2009 Oct;125(3):170–223. DOI: 10.1016/j.micromeso.2009.03.046.

12. .Dementieva OV. Mesoporous particles-containers made of silica: new approaches and new opportunities. Colloidal journal. 2020;82(5):523–47. DOI: 10.31857/s0023291220050031. (in Russ)

13. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nature Nanotechnology. Springer Science and Business Media LLC. 2007 Dec;2(12):751–60. DOI: 10.1038/nnano.2007.387.

14. Rosenholm JM, Lindén M. Towards establishing structure–activity relationships for mesoporous silica in drug delivery applications. Journal of Controlled Release. Elsevier BV. 2008 Jun;128(2):157–64. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.02.013.

15. Karlina MV, Pozharitskaya ON, Shikov AN, Makarov VG, Mirza S, Miroshnyk I, et al. Biopharmaceutical study of nanosystems containing betulin for inhalation administration. Pharmaceutical Chemistry Journal. Springer Science and Business Media LLC. 2010 Dec;44(9):501–3. DOI: 10.1007/s11094-010-0502-x.

16. Pozharitskaya ON, Karlina MV, Shikov AN, Kosman VM, Makarov VG, Casals E, et al. Pharmacokinetics and Tissue Disposition of Nanosystem-Entrapped Betulin After Endotracheal Administration to Rats. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. Springer Science and Business Media LLC; 2016 May 7;42(2):327–32. DOI: 10.1007/s13318-016-0340-7

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БУТОНОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ (*SOPHORA JAPONICA GEMMAS*) И ЛИСТЬЕВ ГИНКГО БИЛОБА (*FOLIIS GINKGO BILOBA*)

Жумагазеева А.Ж., магистр 1 года обучения
Руководитель: **Легостева А.Б**. доц., кан. фарм. наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул.проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: asel.zhumagazeeva@spcpu.ru

В представленной работе экспериментально установлены числовые значения технологических характеристик измельченных бутонов софоры японской и листьев гинкго билоба. Проанализированы такие технологические свойства как фракционный состав, насыпная масса, сыпучесть и набухаемость сырья. Результаты проведённых исследований целесообразно учесть в процессе экстракции бутонов софоры и листьев гинкго билоба.

Ключевые слова: *измельченное растительное сырье, технологические свойства, листья гинкго билоба, бутоны софора японская, фракционный состав, насыпная масса, сыпучесть, набухаемость.*

Одним из основных приоритетных направлений в научном обеспечении индустрии мира считается поиск и создание лекарственных средств растительного происхождения, разработка высокоэффективных технологий, их получение и внедрение в промышленное производство. Для создания препаратов, используемых при сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ), в качестве растительного сырья представляют большой интерес такие растения как гинкго билоба и софора японская.

В частности, гинкго билоба широко используют в научной медицине, поскольку препараты на его основе снижают активность свертывающей системы крови, уменьшая показатель вязкости крови, оказывают антиагрегантный эффект, укрепляют сосудистые стенки и тонус венозных сосудов, снижают проницаемость стенки, оказывая противоотечное действие [1, 2]. Этот терапевтический эффект обусловлен присутствием флавоноидов (кверцетин, антоцианидины), дитерпенов (гинкголиды A, B, C, J, M), сесквитерпенов (билобалиды A, билобаноны), полисахаридов, органических кислот (линоленовая, шикимовая), аминокислот (тимин, аспарагин), эфирных масел, ароматических соединений, ферментов, макроэлементов (Ca, P, K) и др.

Вместе с тем, софора японская отличаются богатым и разнообразным химическим составом, в котором флавоноиды считают наиболее ценными биологически активными веществами (БАВ) бутонов софоры японской. Рутин, содержащийся в бутонах софоры, как известно, обладает Р-витаминной активностью, снижает ломкость и проницаемость капилляров, совместно с аскорбиновой кислотой принимает участие в окислительно-восстановительных процессах, замедляет действие гиалуронидазы [3, 4].

При разработке технологии фитопрепаратов для лечения ССЗ целью данного исследования является изучение технологических свойств бутонов софоры японской и листьев гинкго билобы. В задачи исследования входит определение фракционного состава, насыпной массы, сыпучести и набухаемости сырья [5].

Объектом исследования служат бутоны софоры японской *(Sophora japonica gemmas)* семейства бобовые (*Fabaceae)* и листья гинкго билоба *(Foliis ginkgo biloba)* семейства гинкговых *(Ginkgoaceae),* собранные в 2020 году в Крыму и Китае.

При экстрагировании растительного материала большое значение имеют характер и крупность измельченного сырья. Эти показатели позволяют увеличивать межфазную поверхность растительного материала при экстрагировании. Для оценки однородности сырья определяют его фракционный состав с помощью ситового анализа с использованием комплекта фармакопейных сит.

Для анализа берут 100 г измельченного материала и просеивают через набор сит с размерами отверстий № 70, 50, 30, 20, 10, 5, 5 и меньше. Закрывают крышкой и донышком и встряхивают в течение 5 минут. Далее по очереди освобождают содержимое каждого сита, взвешивают с точностью до 0,01 г и выражают массу в % по отношению к навеске.

Средний диаметр частиц сырья вычисляют по формуле:

$$D_{ср} = \frac{1}{\sum \frac{xi}{di}} \quad (1)$$

$$X_i = \frac{mi}{m} \quad (2)$$

$$D_i = \sqrt{d1 * d2} \quad (3)$$

где: m_i – масса n-ной фракции, г;

m – масса и навеска частиц сырья,г;

X_i – массовый выход частиц узкой фракции, доля;

di – средний геометрический диаметр частиц узкой фракции;

d1 – диаметр отверстия проходного сита, мм;

d2 – диаметр отверстия непроходного сита, мм.

Насыпная масса (dн, г/см^3). Насыпная масса – масса единицы объема свободно насыпанного измельченного сырья. В мерный цилиндр помещают измельченное сырье, слегка встряхивают для выравнивания до метки (постоянного объема). После цилиндр с сырьем или высыпанное сырье взвешивают с точностью до 0,01 г. Формула расчёта насыпной массы, г/см^3:

$$dн = Pн / Vн, \quad (4)$$

где: Рн – масса измельченного сырья при определенной влажности, г;

Vн – объем, который занимает сырье, см^3.

Определение насыпной массы необходимо для выбора размера экстрактора. (ГФ14)

Определение сыпучести. Сыпучесть (текучесть)- способность материала свободно высыпаться под действием силы тяжести. Сыпучесть измельченного сырья учитывается при расчете загрузочных устройств в экстракционных аппаратах и определения времени загрузки.

Сыпучесть определяется по массовой скорости истечения с использованием виброустройства для снятия сыпучих характеристик марки ВП 12А.

Включают виброустройство при закрытой заслонке и одновременно включают секундомер. После 20 секунд утряски, необходимой для получения стабильных показаний, открывают заслонку поворотом в сторону и наблюдают за истечением сыпучего материала из воронки в приемный стакан. По окончании истечения секундомер выключается.

Сыпучесть определяют по формуле:

$$Vc = M / (t-20), \quad (5)$$

Где: Vc – сыпучесть, г/с;

M – масса навески, г;

t – полное время опыта, с;

20 – время утряски, с.

Второй метод определения сыпучести основан на определении угла естественного откоса, зависящего от геометрических параметров конуса, образующегося при свободном насыпании материала на ровную поверхность. Угол естественного откоса служит показателем, определяющим потенциальную сыпучесть материала и характеризующим также форму, размер частиц и когезионные свойства сыпучих материалов.

Определение набухаемости сырья. При расчете необходимого количества экстрагента для получения настоек, экстрактов и выбора коэффициента заполнения экстракторов следует учитывать количество жидкой фазы, остающейся в растительном материале за счет его набухания и увеличения объема набухшего сырья.

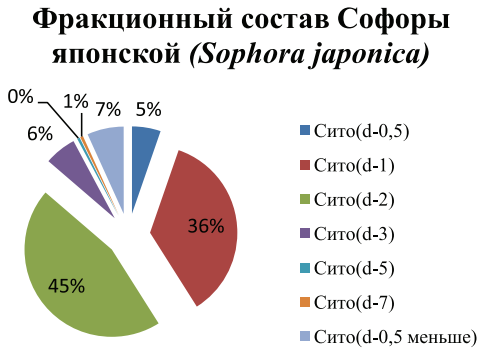
10,0 г растительного сырья заливали отмеренным количеством экстрагента (100мл) и оставляют на 3 часа. Затем сливали свободный экстрагент в мерный цилиндр и определяли его объем, а увлажненный растительный материал взвешивали. Коэффициент поглощения сырья Кп рассчитывали по формуле:

$$Кп = m / m_0, \quad (6)$$

где: m – масса сырья после набухания, г;

m_0 – навеска сырья,г.

Результаты изучения технологических свойств сырья бутонов софора японская *(Sophora japonica)* и листьев гинкго билоба *(Ginkgo biloba)* приведены ниже.



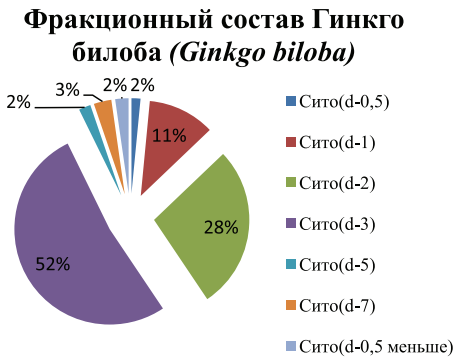


Рисунок 1. Результаты фракционного состава

Таблица 1 – Технологические свойства измельченного сырья

Показатель	Бутоны Софоры японской *(Sophora japonica)*	Листья Гинкго билоба *(Ginkgo biloba)*
Насыпная масса, г	23,32±2,01	13,46±1,31
Сыпучесть, г/с	6,97±0,65	1,04±0,10
Набухаемость	3,10±0,26	3,26±0,10

В результате проведенных вычислений фракционный состав показал однородность сырья. Определена насыпная масса, которая необходима для выбора размера экстрактора. Установлена сыпучесть измельченного сырья, которая учитывается при расчете загрузочных устройств в экстракционные аппараты. Определена набухаемость сырья, учитывающаяся при расчете необходимого количества экстрагента для получения дальнейшего экстракта.

Изучены технологические свойства: фракционный состав, насыпная масса, сыпучесть и набухаемость сырья бутонов софоры японской *(Sophora japonica)* и листьев гинкго билоба *(Ginkgo biloba)*.Полученные данные будут использованы для выбора емкости оборудования, подбора загрузочных средств, расчета количества экстрагента и проведения оптимизации процесса экстрагирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bikram Singh, Pushpinder Kaur, Gopichand, R.D. Singh, P.S. Ahuja: Biology and chemistry of Ginkgo biloba. 176 061, India: Fitoterapia, 2008;№ 79:401–418

2. Ji H, Zhou X, Wei W, Wu W, Yao S. Ginkgo Biloba extract as an adjunctive treatment for ischemie stroke: A systematic review and meta- analysis of randomized clinical trials. Medicine (Baltimore). 2020;99 (2). el8568. doi: 10.1097MD.0000000000018568

3. Ковалева ЛГ, Сампиев АМ, Хочава МР, Никифорова ЕБ. Современное состояние и перспективы дальнейшего исследования плодов софоры японской. Актуальные проблемы медицины. 2012;22(141).

4. Ковалева ЛГ, Сампиев АМ. Исследование фенольных соединений плодов софоры японской. Современные проблемы науки и образования 2013;6:1014.

5. Государственная Фармакопея РФ – 14 изд. в 4 томах. М.: МЗ РФ, 2018. – Федеральная электронная медицинская библиотека. Доступно по: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php

SUMMARY

TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF JAPANESE SOPHORA BUDS (*SOPHORA JAPONICA GEMMAS*) AND LEAVES OF GINKGO BILOBA (*FOLIIS GINKGO BILOBA*)

Zhumagazeeva A.Zh., Master of 1 year of study
St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University,
197376, St. Petersburg, prof. Popova, 14, Russian Federation

In the present work, numerical values of the technological characteristics of crushed buds of Sophora japonica and ginkgo biloba leaves are experimentally established. Such technological properties as fractional composition, bulk mass, flowability and swelling of raw materials are analyzed. The results of the conducted studies should be taken into account in the extraction of sophora buds and ginkgo biloba leaves.

Key words: *crushed vegetable raw materials, technological properties, ginkgo biloba leaves, Japanese sophora buds, fractional composition, bulk mass, flowability, swelling.*

REFERENCES

1. Bikram Singh, Pushpinder Kaur, Gopichand, R.D. Singh, P.S. Ahuja: Biology and chemistry of Ginkgo biloba. 176 061, India: Fitoterapia. 2008;79:401–418

2. Ji H, Zhou X, Wei W, Wu W, Yao S. Ginkgo Biloba extract as an adjunctive treatment for ischemie stroke: A systematic review and meta- analysis of randomized clinical trials. Medicine (Baltimore). 2020;99 (2). el8568. doi: 10.1097MD.0000000000018568

3. Kovaleva LG, Sampiev AM, Khochava MR, Nikiforova EB. Current state and prospects for further research of the fruits of Japanese Sophora. Actual problems of medicine. 2012;22(141). (In Russ)

4. Kovaleva LG, Sampiev AM. Study of phenolic compounds of Japanese Sophora fruits. Modern problems of science and education. 2013;6:1014. (In Russ)

5. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. in 4 volumes. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2018. Federal Electronic Medical Library Available at: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (In Russ)

ВЫБОР СОСТАВА ЛЕЧЕБНО-КОСМЕТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПСОРИАЗА

Казанова А.Н., студент 2 курса магистратуры

Руководители: **Буракова М.А.**, к. фарм. н. доц.; **Абросимова О.Н**., к.фарм.н. доц.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация

E-mail: anzhelika.kazanova@spcpu.ru

Предложен состав эмульсионного крема для профилактики больных псориазом с противовоспалительным антибактериальным эффектом, содержащего экстракт сухой папайи.

Ключевые слова: *псориаз, профилактика псориаза, эмульсионный крем.*

Псориаз является одним из наиболее распространенных хронических дерматозов, значительно ухудшающих качество жизни, работоспособность и социальную активность пациентов. Согласно статистическим данным, этой патологией страдает 2-7 % населения [1]. На российском фармацевтическом рынке средства для наружной терапии псориаза представлены в основном мазями на основе глюкокортикостероидов и их комбинаций с салициловой кислотой, антимикробными и противогрибковыми веществами , а также дерматотропными средствами на основе витаминов А, Е и D [2]. Актуальным является расширение ассортимента мягких форм для профилактики псориаза. Средства для ухода за кожей способствуют улучшению общего состояния больных псориазом, поскольку уменьшают дискомфорт и улучшают внешний вид кожи.

Целью работы является теоретическое и экспериментальное обоснование состава косметического средства для профилактики псориаза.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

• изучить современный ассортимент вспомогательных веществ, используемых в производстве этой группы косметических средств

• разработать состав косметического средства для профилактики псориаза.

Эмульсионные кремы представляют собой дисперсные системы, содержащие масляную (липофильную) фазу, водную (гидрофильную) фазу и поверхностно-активные вещества (ПАВ) – эмульгаторы.

В качестве масляной фазы при выборе состава лечебно-косметического крема использовали масло кокоса, масло черного тмина, льняное масло. Выбор масел обусловлен их фармакологическим действием.

Масло кокосовое содержит комплекс биологически активных веществ, обладающих противогрибковым, антибактериальным и противовоспалительными свойствами.

Льняное масло содержит полиненасыщенные кислоты, витамины F, A, E, B, K, насыщенные жирные кислоты.

Масло черного тмина обеспечивает увлажнение и питание клеток эпидермиса, обладает тонизирующим и регенерирующим действием, устраняет зуд.

В качестве активных добавок в состав крема введены:

• сухой экстракт папайи – обладает противовоспалительным и иммуномодулирующим действием, улучшает региональную микроциркуляцию и регенеративные процессы

• Аллантоин – **способствует заживлению кожи**, восстанавливает ее барьерные свойства, из-за чего является частым ингредиентом косметики для людей, страдающих дерматитом.

Для выбора рационального состава крема получили 8 вариантов экспериментальных образцов эмульсий различных по составу и соотношению вспомогательных веществ.

Экспериментальные составы представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Составы косметического крема

Название компонента	Количество компонента, %							
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8
Эмоленты								
Масло черного тмина	-	-	2	2	2	1	1	1
Льняное масло	4	8	2	2	2	2	2	2
Кокосовое масло	7	3	7	7	8	8	8	8
Эмульгаторы и со-эмульгаторы								
Ланолин	-	-	1	2	4	2	2	2
Цетиловый спирт	-	-	3	3	3	3	3	3
ОС-20	3	3	2	2	2	2	2	2
Стеариновая кислота	-	-	2	2	2	2	2	2
Эмульгатор Т-2	5	5	3	3	3	3	2	2
Увлажнитель								
Глицерин	4	4	4	4	4	4	4	4
Ароматизатор								
Эфирное масло базилика	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5
Активные вещества								
Сухой экстракт папайи	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2	1	1,5
Салициловая кислота	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Аллантоин	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристики образцов

Номер образца	Органолептические свойства	pH 20% раствора основы	Термическая стабильность	Коллоидная стабильность
№1	Белый, неоднородный, жидкой консистенции, хорошо впитывается, при растирании на коже наблюдается липкость	6,1±0,5	+	-
№2	Белый, неоднородный, более жидкой консистенции, хуже впитывается, при растирании на коже наблюдается липкость, наблюдается расслоение	6,5 ±0,4	+	-
№3	Белый, густоватой консистенции, хорошо впитывается, при растирании на коже отсутствует липкость, смывается, воздушный, пенится	6,4 ±0,3	+	+
№4	Белый, густоватой консистенции, хорошо впитывается, при растирании на коже отсутствует липкость, смывается, пенится, легкий	6,2 ±0,5	+	+
№5	Белый, густоватой консистенции, долго впитывается, при растирании на коже отсутствует липкость, смывается плохо, жирный, приятный запах	6,5 ±0,3	+	+
№6	Песочного цвета, густоватой консистенции, хорошо впитывается, при растирании на коже отсутствует липкость, смывается хорошо, легкая защитная пленка, небольшое расслоение, приятный запах	6,5 ±0,3	+	+
№7	Светло-бежевого цвета, густоватой консистенции, хорошо впитывается, при растирании на коже отсутствует липкость, смывается хорошо, легкая защитная пленка, приятный запах	6,1 ±0,3	+	+
№8	Кремового цвета, густоватой консистенции, хорошо впитывается, при растирании на коже отсутствует липкость, смывается хорошо, легкая защитная пленка, приятный запах	6,0 ±0,3	+	+

Заявленным требованиям [3] соответствовал образец №8.

Таблица 3 – Состав эмульсионного крема

Компонент	Содержание на 100 %
Кокосовое масло	8
Глицерин	4
Цетиловый спирт	3
Ланолин	2
Льняное масло	2
ОС-20	2
Стеариновая кислота	2
Эмульгатор Т-2	2
Сухой экстракт папайи	1,5
Масло черного тмина	1
Салициловая кислота	0,7
Эфирное масло базилика	0,5
Аллантоин	0,2
Вода очищенная	До 100

Масштабирование процесса производства является важным процессом. Перенос технологии из условий лаборатории к условиям полупромышленного производства заключался в анализе оборудования на способность осуществить требуемый технологический процесс в соответствии с разработанной стандартной операционной процедурой по приготовлению крема, анализе рисков с помощью диаграммы Ишикавы (рис. 1).

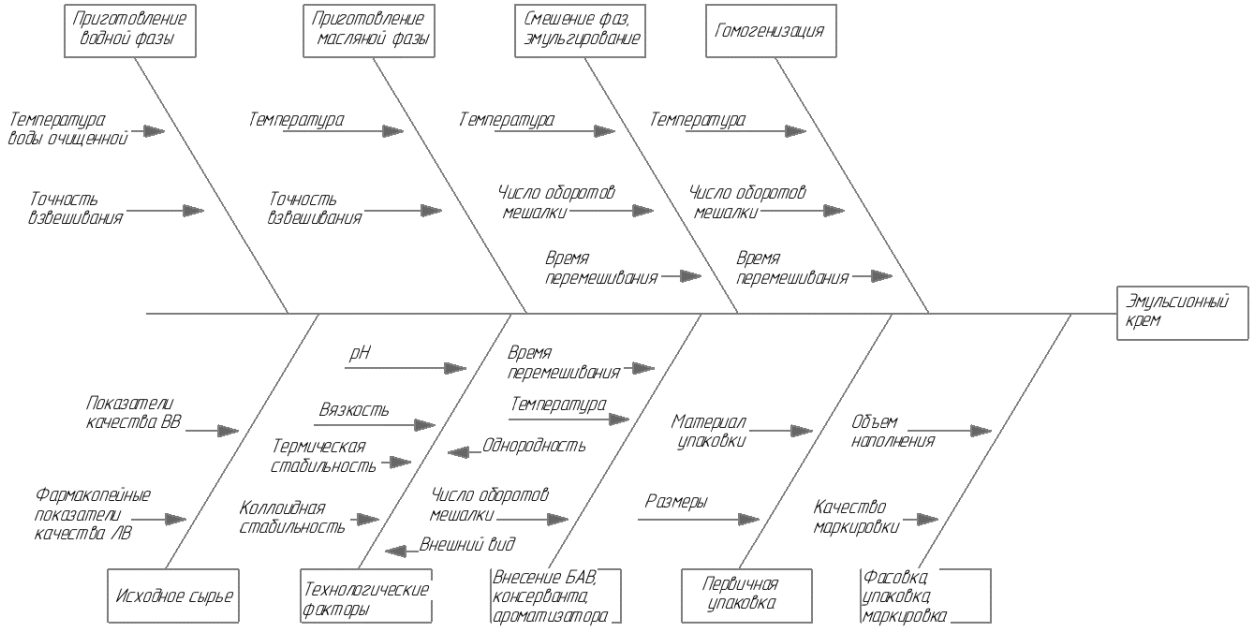


Рисунок 1. Диаграмма Ишикавы

Пилотная серия, производимая в GMP тренинг-центре, превышала лабораторную в 10 раз.

Производство крема производили в помещении изготовления мазей, кремов и линиментов на участке мягких лекарственных форм GMP тренинг-центра СПХФУ. На участке мягких лекарственных форм поддерживали класс чистоты D.

В условиях полупромышленного производства получены 2 серии крема эмульсионного. Полученный крем соответствовал всем требованиям нормативной документации [3]. Воспроизводимые показатели качества крема, полученного в лабораторных условиях, подтверждают эффективность разработанной технологии производства.

Таблица 4 – Показатели качества крема полученного в полупромышленных условиях

Показатель	Норма	Экспериментальный показатель
Внешний вид	Однородная масса, не содержащая посторонних примесей	Однородная масса, не содержащая посторонних примесей
Цвет	Свойственный цвету данного крема	кремовый
Запах	Свойственный запаху данного крема	Приятный карамельно- ванильный аромат базилика

Показатель	Норма	Экспериментальный показатель
Водородный показатель, pH 20% раствора крема	5,0-9,0	6,2±0,2
Коллоидная стабильность	Стабилен	Стабилен
Термостабильность	Стабилен	Стабилен
Вязкость, мПа*с	-	10560±850

На основании проведенных исследований выбраны ингредиенты эмульсионного крема: эмоленты (масло кокосовое, льняное, черного тмина) – 11%; эмульгаторы (цетиловый спирт, Т-2, ланолин, стеариновая кислота, ОС-20) – 11%, БАВ (сухой экстракт папайи, аллантоин, салициловая кислота) – 2,4%, эфирное масло базилика – 0,5%, глицерин – 4%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хлебникова АН. Современные подходы к наружной терапии псориаза. Вестник дерматологии и венерологии. 2012;1:86-91.

2. Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru [Дата обращения – 17.01.2021].

3. ГОСТ 31460-2012 Кремы косметические. Общие технические условия. Доступно по: http://docs.cntd.ru/document/1200096465 (Дата обращения 17.01.2021)

4. Котлуков ВК, Казюкова ТВ, Айрапетян АС. Наружная противовоспалительная терапия атопического дерматита у детей. Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова. Москва

5. Selvaraj S. et al. Flavonoid–metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents. Medicinal Research Reviews. 2014;34(4):677-702.

SUMMARY

CHOICE OF A MEDICINAL-COSMETIC PRODUCT FOR THE PREVENTION OF PSORIASIS

Kazanova A.N., 2nd year student
St.Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, prof.Popov St., St.Petersburg, 197376, Russian Federation

The composition of the ingredients of an emulsion cream for the prevention of psoriasis patients with anti-inflammatory antibacterial effect, containing dry papaya extract, is proposed.

Key words: *psoriasis, psoriasis prevention, emulsion cream.*

REFERENCES

1. Khlebnikov AN. Modern approaches to external therapy for psoriasis. Bulletin of Dermatology and Venereology. 2012;1:86-91. (In Russ)

2. State Register of Medicines. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru [Date of treatment – 01/17/2021]. (In Russ)

3. GOST 31460-2012 Cosmetic creams. General specifications. Available at: http://docs.cntd.ru/document/1200096465 (Date of treatment 01/17/2021) (In Russ)

4. Kotlukov VK, Kazyukova TV, Hayrapetyan AS. External anti-inflammatory therapy for atopic dermatitis in children. Russian National Research Medical University. N.I. Pirogov, Moscow. (In Russ)

5. Selvaraj S. et al. Flavonoid – metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents. Medicinal Research Reviews. 2014;34(4):677-702.

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ ХИТОЗАНА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Каргин В.С., асп. 2 года обучения
Руководители: **Пятигорская Н.В.**, докт. фарм. наук, проф.,
Бркич Г.Э., канд. фарм. наук
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет),
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр.2, Российская Федерация
E-mail: kvc12.kargin@yandex.ru

За последние 15 лет исследования, связанные с изучением хитозана и его производных, многократно увеличились. На текущий момент ведутся разработки по расширению номенклатуры лекарственных средств на основе хитозана и его липофильных композиций.

Результаты. В результате проведения информационного поиска были установлены основные формы производных хитозана, а также направления их применения. Современные достижения науки по созданию растворимых форм хитозана позволяют рассматривать их в качестве не только действующих веществ, но и компонентов для стабилизации лекарственных форм, а также «потенцирования» терапевтической активности фармацевтических субстанций.

Ключевые слова: *хитозан, лекарственная форма, гель, лекарственное средство, липофильность, фармацевтическая субстанция.*

В литературных источниках встречаются упоминания о различных солевых формах хитозана, зависящих от среды растворения полимера. В частности, среды растворения – это растворы кислот, которые взаимодействуют со свободными аминогруппами, тем самым образуя растворимый комплекс хитозана анионного характера [1].

Анионные комплексы хитозана представлены гелями различной вязкости. Вязкость зависит от pH среды растворения, в которую помещен полимерный комплекс.

Цель данного обзора заключалась в изучении литературных и патентных источников о применении различных растворимых форм хитозана для разработки состава лекарственных форм.

Следует отметить, что хитозановый комплекс имеет слабые фармакологические свойства, которые усиливаются после введения различных лекарственных средств, иммобилизованных в его полимерную основу. Более того, в свою очередь хитозан способствует стабилизации фармацевтической субстанции (ФС) и ее равномерному высвобождению из системы лекарственной формы (ЛФ) [1]. Подобный подход к выбору компонентов ЛФ основан на «совместном потенцировании» вспомогательных и действующих веществ, на основе которого были разработаны несколько ФС таких как хитозан/мирамистин и хитозан/химопсин, которые уже зарегистрированы на территории РФ [1, 2].

Авторами патента [3] был разработан состав геля, содержащего нековалентно-связанные нано частицы серебра в качестве действующего вещества для образования стабильной формы лекарственного средства. При сочетании гелеобразующего агента с ионом металла образуется стабильный комплекс с ионными связями между полимером и серебром. За последнее время появилось множество составов, где ион металла выступает в качестве активного компонента [4, 5].

Также установлены смеси составов, где в качестве ФС выступают липофильные соединения, а иногда и целый комплекс веществ липофильного характера [2, 6]. Примером может служить лекарственное средство «Гель ранозаживляющий», содержащий в составе ЛС липофильной структуры под торговым наименованием мирамистин, а также химопсин, протеолитическая активность которого усиливается после взаимодействия с хитозаном при помощи водородных связей [6].

Хитозановый полимер имеет гибкую конформационную структуру, изменение которой возможно контролировать в заданном реологическом диапазоне. Подобные конформации достигаются путем внесения вспомогательных веществ. К таким компонентам относятся группы веществ, корректирующие вязкость, контролирующие набухание и предотвращающие образование конгломератов хитозана. Гели на основе хитозана применяются в качестве антибактериальных, ранозаживляющих средств для лечения ожогов [6, 7].

Гели на основе производных хитозана обладают различными свойствами, которые зависят от присоединённых функциональных групп к скелету полимера. Существует возможность модификации по двум типам групп – это гидроксильные (например, карбоксиметилхитозан), аминогруппные (например, сукцинилхитозан). Также существуют полимеры хитозана, замещенные по нескольким функциональным группам: N-сукцинил-O-карбоксиметил и N,O-карбоксиметил-хитозана [8]. Данные соединения практически нерастворимы в гидрофильных средах и могут выступать в случае необходимости не биодеградируемой основой для различных ФС, например, при разработке медицинских повязок [7].

Гели карбоксиметилхитозана обладают амфотерными свойствами, поэтому в них можно иммобилизировать вещества кислого и щелочного характера, обладающие гидрофобными свойствами [9]. Примером может служить применение карбоксиметилхитозана в офтальмологических гелях и растворах в качестве вспомогательного вещества [10, 11] – структурообразователя и стабилизатора, поддерживающего необходимый интервал вязкости [11].

Оценке высвобождения ФС из полимерных композиций производных хитозана посвящены многочисленные исследования [12-14]. Изучено высвобождение салицилатов из гидрогеля на основе структурированного карбоксиметилхитозана, которое показало, что при pH = 1,0 за 120 часов высвобождение ФС составило 83% [12]. Также проведена оценка набухания композиции и сорбции Cu (II) из этого полимера [13]. Пространственно структурированный карбоксиметилхитозан также применялся в качестве носителя для создания препарата имидоклоприда (его содержание в сшитых частицах хитозана составляло 25,1%). Высвобождение субстанции при данном количественном содержании в ЛС составило 6 суток, что являлось одним из основных требований разработчиков [14].

В ином исследовании пленки, изготовленные из данного типа гелей, оказались чувствительны к изменению pH и применялись для изолирования in vitro прометазина гидрохлорида [15].

Авторы статьи [16] использовали N-сукцинилхитозан для комплексной иммобилизации противомикробных лекарственных средств (диоксидин и хлоргексидин). Такое комплексное ЛС показало более высокую эффективность в тестах на антибактериальную активность против таких микроорганизмов как EnterobacterSPP, Citobacter-SPP, Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, чем у составов без применения N-сукцинилхитозана в качестве вспомогательного вещества.

В исследовании [17] было высказано предположение об использовании N-сукцинилхитозан в качестве носителя для противоопухолевых средств. Дизамещенный N-сукцинил-О-карбоксиметил хитозан был использован в качестве матрицы для иммобилизации ФС противоопухолевого действия – каптотецина [18].

Практически у всех модифицированных производных хитозана (N-сульфотохитозана, частично N-ацетилированный хитозана, N,О-карбоксиметил-хитозана) обнаружена гемостатическая активность. У перечисленных аналогов была изучена адгезия и морфология частиц крови при контакте с полимерами [19].

Структура хитозанового геля позволяет иммобилизировать липофильные структуры и молекулы. Было проведено изучение терапевтической активности хитозанового геля с таурином и аллантаином на крысах, который оказывал лучшее ранозаживляющее действие по сравнению с контролем [20].

Растворимые формы хитозана в виде гелей применяются в качестве офтальмологических [10, 11], интраназальных [21] средств доставки ФС, а также для наружного применения [6,7].

Многочисленные исследования по направлению изучения производных хитозана для разработки лекарственных средств и медицинских изделий включают большое количество направлений. Современные достижения науки по созданию растворимых форм хитозана позволяют рассматривать их в качестве не только действующих веществ, но и компонентов для стабилизации ЛФ, а также «потенцирования» терапевтической активности ФС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза. Патент России № 2 697 869. 2018. Бюл. № 24. Пятигорская НВ, Беркич ГЭ, Беркич ЛЛ, и др.

2. Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза // Патент России № 2 687 102. 2018. Бюл. № 13. Пятигорская НВ, Беркич ГЭ, Беркич ЛЛ, и др.

3. Chitosan nano silver gel agent and uses thereof. Патент Китая № 101278896. 2006. Бюл. № 6. 谢松梅, 邹方明, 李长林

4. The Effect of a Nanostructured Chitosan–Bee Venom–Gold Nanoparticle System on Free Radical Process Activity, Blood System Adaptation, and Tumor Growth in Rats with Transplanted Cancer PC-1. Dydykina VN, Zotova JD, Mochalova AE, Smirnova LA, Koryagin AS. Biomedical investigations. 2015;7(2):41-46

5. Пористые композиционные материалы на основе хитозана для заполнения костных дефектов. Патент России № 2 376 019. 2007. Бюл. № 35. Баринов СМ, Смирнов ВВ, Федотов АЮ, и др.

6. Brkich LL, Pyatigorskaya NV. Development of a Scientific Methodological Approach to Expansion of Product Range for Treatment of Infected Wounds. Asian Journal of Pharmaceutics. 2017:739-744

7. Кильдеева НР, и др. Новый подход к созданию материалов с контролируемым выделенинием лекарственного вещества. Вестник Московского университета. Серия 2 Химия. 2000;41(6):423-425

8. Сливкин ДА, и др. Хитозан для фармации и медицины. Вестник ВГУ, серия: химия. Биология. Фармация. Воронеж. 2011;2:214-232.

9. Куликов СН, и др. Роль структуры в биологической активности хитозана. Вестник казанского технологического университета. Казань. 2007;6:11-16

10. Compositions containing o-carboxyloquel quitosan and uses in ophthalmology. Патент Португалии № 844868. 1996. Бюл. № 14. Shau-Fong Yen, Kenneth W Reed

11. Лозбина НВ, Большаков ИН, Лазаренко ВИ. Свойства хитозана и его применение в офтальмологии. Сибирское медицинское обозрение. Красноярск. 2015;5:5-13

12. Sun Liping, et al. Synthesis of carboxymethylchitosan hydrogels and their use for controlled release of drugs. Chen Xiao Gaofenzi xuebao. 2004;2:191-195.

13. Zhao Long, et al Obtaining cross-linked derivatives of carboxymethylchitin and their sorption capacity for copper (II) ions. J. Appl. Polym. Sci. 2004;91(1): 556-562.

14. Cheng Li-hong, Zhao Jing. Obtaining and controlled release of imidocloprid from carboxymethylchitosan gel particles. Jingxihuagong. 2005;22(9):653-657.

15. Seki Yoldas, Yurdakos Kadir. Preparation of pH-sensitive hydrogels in the form of films based on chitosan and epichlorohydrin and their application for in vitro isolation of promethazine hydrochloride. J. Appl. Polum. Sci. 2008;109(1):683-690.

16. Лапенко ВЛ, и др. Получение антибактериального комплекса на основе сукцинахитозана. Вестник вгу, серия: химия. Биология. Фармация. Воронеж. 2011;2:195-198

17. Wang Qin, Wang Ai-gin. Synthesis and properties of N-succinylchitosan. Gongneng gaofenzi xuebao. 2004;17(LP):51-54.

18. Yuan Lan-hua, Zhu Ai-ping. Solubilization and Controlled Release of Camptothecin by N-succinyl-O-carboxymethylchitosis.J. Yangzhou Univ. Natur. Sci. Ed. 2008;11(4)36-40.

19. Janvikul Wanida et al. Comparative in vitro hemostatic study of chitin, chitosan and their derivatives. J. Appi. Polym. Sci. 2006;102(LP):445-451.

20. Федосов ПА, и др. Изучение ранозаживляющего действия геля на основе хитозана с таурином и аллантоином. Современные проблемы науки и образования. 2015;4:572.

21. Яхкинд МИ, Таранцева КР. Наносистемы для интраназальной доставки лекарств. Известия пензенского государственного педагогического университета имени В.Г. Белинского Естественные науки. Пенза, 2012;29:284-292

SUMMARY

APPLICATION OF VARIOUS SOLUBLE FORMS OF CHITOSAN TO DEVELOP THE COMPOSITION OF DOSAGE FORMS

Kargin V.S., postgrad 2 years of study
Sechenov First Moscow State Medical University,
Department of industrial pharmacy. 8, p. 8, p. 2, Trubetskaya str, Moscow, 119991, Russian Federation

Over the past 15 years, research related to the study of chitosan and its derivatives has increased dramatically. Currently, developments are underway to expand the range of drugs based on chitosan and its lipophilic compositions.

The purpose of this review was to study the literature and patent sources on the use of various soluble forms of chitosan for the development of the composition of dosage forms.

Results: As a result of the information search, the main forms of chitosan derivatives were established, as well as the directions of their application. Modern scientific advances in the creation of soluble forms of chitosan make it possible to consider them as not only active substances, but also components for stabilizing dosage forms, as well as "potentiating" the therapeutic activity of pharmaceutical substances.

Key words: *chitosan, dosage form, gel, drug, lipophilicity, pharmaceutical substance.*

REFERENCES

1. Pharmaceutical substance for the treatment of infected wounds of various origins. Patent of Russia No. 2 697 869. 2018. Bul. No. 24. Pyatigorskaya NV, Brkich GE, Brkich LL, et al. (in Russ)

2. Pharmaceutical substance for the treatment of infected wounds of various origins. Patent of Russia No. 2 687 102. 2018. Bul. No. 13. Pyatigorskaya NV, Brkich GE, Brkich LL, et al. (in Russ)

3. Chitosan nano silver gel agent and uses thereof. Patent of China № 101278896. 2006. Bul. № 6. 谢松梅, 邹方明, 李长林

4. The Effect of a Nanostructured Chitosan–Bee Venom–Gold Nanoparticle System on Free Radical Process Activity, Blood System Adaptation, and Tumor Growth in Rats with Transplanted Cancer PC-1. Dydykina VN, Zotova JD, Mochalova AE, Smirnova LA, Koryagin AS. Biomedical investigations. 2015;7(2):41-46

5. Porous composite materials based on chitosan for filling bone defects. Patent of Russia No. 2 376 019. 2007. Byul. No. 35. Barinov SM, Smirnov VV, Fedotov AYu, et al (in Russ)

6. Brkich LL, Pyatigorskaya NV. Development of a Scientific Methodological Approach to Expansion of Product Range for Treatment of Infected Wounds. Asian Journal of Pharmaceutics. 2017:739-744

7. Kildeeva NR, et al. A new approach to the creation of materials with controlled release of a medicinal substance. Bulletin of Moscow University. Series 2 Chemistry. 2000;41(6):423-425 (in Russ)

8. Slivkin DA, et al. Chitosan for pharmacy and medicine. Bulletin of vsu, series: chemistry. Biology. Pharmacy. Voronezh. 2011;2:214-232. (in Russ)

9. Kulikov SN, et al. Role of the structure in the biological activity of chitosan. Bulletin of the kazan technological university. Kazan. 2007;6:11-16 (in Russ)

10. Compositions containing o-carboxyloquel quitosan and uses in ophthalmology. Patent of Portugal No. 844868. 1996. Bul. No. 14. Shau-Fong Yen, Kenneth W Reed

11. Lozbina NV, Bolshakov IN, Lazarenko VI. Chitosan properties and its application in ophthalmology. Siberian medical review. Krasnoyarsk. 2015;5:5-13 (in Russ)

12. Sun Liping, et al. Synthesis of carboxymethylchitosan hydrogels and their use for controlled release of drugs. Chen Xiao Gaofenzi xuebao. 2004;2:191-195.

13. Zhao Long, et al Obtaining cross-linked derivatives of carboxymethylchitin and their sorption capacity for copper (II) ions. J. Appl. Polym. Sci. 2004;91(1): 556-562.

14. Cheng Li-hong, Zhao Jing. Obtaining and controlled release of imidocloprid from carboxymethylchitosan gel particles. Jingxihuagong. 2005;22(9):653-657.

15. Seki Yoldas, Yurdakos Kadir. Preparation of pH-sensitive hydrogels in the form of films based on chitosan and epichlorohydrin and their application for in vitro isolation of promethazine hydrochloride. J. Appl. Polum. Sci. 2008;109(1):683-690.

16. Lapenko VL, et al. Obtaining an antibacterial complex based on succinachitosan. Vestnik vsu, series: chemistry. Biology. Pharmacy. Voronezh. 2011;2:195-198 (in Russ)

17. Wang Qin, Wang Ai-gin. Synthesis and properties of N-succinylchitosan. Gongneng gaofenzi xuebao. 2004;17(LP):51-54.

18. Yuan Lan-hua, Zhu Ai-ping. Solubilization and Controlled Release of Camptothecin by N-succinyl-O-carboxymethylchitosis. J. Yangzhou Univ. Natur. Sci. Ed. 2008;11(4)36-40.

19. Janvikul Wanida et al. Comparative in vitro hemostatic study of chitin, chitosan and their derivatives. J. Appi. Polym. Sci. 2006;102(LP):445-451.

20. Fedosov PA, et al. Study of wound-healing effect of gel based on chitosan with taurine and allantoin. Modern problems of science and education. 2015;4:572. (in Russ)

21. Yakhkind MI, Tarantseva KR. Nanosystems for intranasal drug delivery. News of the penza state pedagogical university named after VG Belinsky natural sciences. Penza, 2012;29:284-292 (in Russ)

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЧАЯ ИЗ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ТРАВЫ

Карчевская К.И., студ. 4 курса
Руководитель: **Лукашов Р.И.**, к.ф.н., доц.
Белорусский государственный медицинский университет,
220116, Минск, пр. Дзержинского, д. 83, Республика Беларусь
E-mail: karolinakarchevskaya@gmail.com

В ходе данной работы разработана технология получения чая из тысячелистника травы, а также установлено влияние наличия фильтр-пакета (ф/п) на степень и скорость высвобождения флавоноидов в горячую воду. Для получения водного извлечения с максимальным содержанием флавоноидов необходимо 1 ф/п поместить в стеклянную посуду, залить 300 мл горячей воды, закрыть крышкой и настаивать в течение 50 мин. Наличие ф/п не влияет на кинетику и степень высвобождения флавоноидов.

Ключевые слова: *тысячелистник, флавоноиды, спектрофотометрия.*

Тысячелистник обыкновенный – растение с широким спектром фармакологической активности, в т.ч. антиоксидантным, противовоспалительным и спазмолитическим действием, обусловленными наличием в составе лекарственного растительного сырья (ЛРС) тысячелистника флавоноидов, преобладающими среди которых являются 7-О-глюкозиды лютеолина и апигенина [1].

Изучаемое ЛРС используется для приготовления чая с целью реализации его спазмолитической активности. На данный момент в Республике Беларусь (РБ) зарегистрировано измельченное сырье в ф/п бумажных по 1,5 г, одним из показаний к применению которого является симптоматическое лечение болей спастического характера во время менструации [2]. Однако технология приготовления водного извлечения (чая), представленная в инструкции по медицинскому применению, разработана с учетом стандартизации тысячелистника травы по содержанию эфирного масла, т.к. на данный момент в Государственной фармакопее (ГФ) РБ представлена лишь одна методика стандартизации для изучаемого растения по вышеупомянутой группе биологически активных веществ (БАВ) [3].

Следует отметить, что спазмолитическая активность тысячелистника травы обусловлена наличием в нем флавоноидов, следовательно, разработка технологии получения водного извлечения, опираясь на количественное определение (КО) данной группы БАВ, а также подбор оптимального соотношения ЛРС и воды, позволит получить чай с наибольшим содержанием действующих флавоноидов. В итоге, получение лекарственной формы, обогащенной флавоноидами, будет повышать эффективность использования данного сырья.

Объектом исследования служила измельченная тысячелистника трава в ф/п по 1,5 г ООО «Калина», РБ (срок годности до 07.21).

В соответствии с инструкцией по медицинскому применению данного ЛРС рекомендуется для приготовления водного извлечения (чая) 1 ф/п залить 200 мл кипяченой (горячей) воды, закрыть крышкой и настаивать 15 минут.

Для определения оптимального времени настаивания чая 1 и 2 ф/п помещали в стеклянную посуду, заливали 200 мл кипяченой (горячей) воды, закрывали крышкой и настаивали в течение 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 и 60 мин. После чего проводили КО флавоноидов по разработанной ранее методике.

С целью определения оптимального соотношения ЛРС и воды 1 ф/п помещали в стеклянную посуду, заливали 37,5; 75; 150 и 300 мл кипяченой (горячей) воды, закрывали крышкой и настаивали в течение промежутка времени, подобранного в результате проведения предыдущего эксперимента (50 минут). После чего проводили КО флавоноидов.

Также было изучено влияние наличия ф/п на высвобождение флавоноидов. Для этого ЛРС, содержащееся в 1 ф/п помещали в стеклянную посуду, заливали 200 мл кипяченой воды, закрывали крышкой и настаивали в течение 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 и 60 мин. После чего проводили КО флавоноидов.

Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрически в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид.

Для приготовления испытуемого раствора к 100 мкл извлечения прибавляли 200 мкл 4% раствора алюминия хлорида, 10,0 мкл ледяной уксусной кислоты и доводили водой до 5,00 мл.

Для приготовления компенсационного раствора к 100 мкл извлечения добавляли 10,0 мкл кислоты уксусной ледяной, после чего доводили полученную смесь водой до 5,00 мл. Через 60 мин измеряли оптическую плотность испытуемого раствора при 400 нм против компенсационного раствора.

Содержание суммы флавоноидов (X, %) в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид рассчитывали по формуле 1.1:

$$X, \% = \left(\frac{A + 0{,}0174}{0{,}3474}\right) \times \frac{V}{10} / m \qquad (1.1)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
V – объем полученного водного извлечения (чая), мл;
m – масса навески измельченного сырья, г.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали при помощи программы Microsoft Excel 2016.

Методика КО флавоноидов в тысячелистника траве была разработана нами в ранее проведенных исследованиях [4].

Зависимость содержания флавоноидов (%) от времени настаивания представлена на рисунке 1.

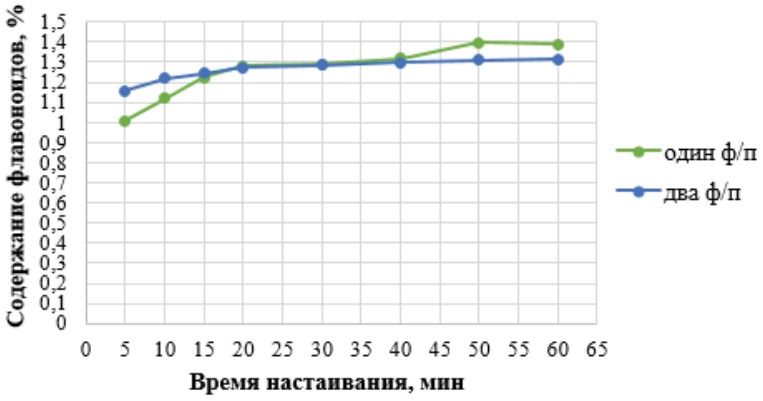


Рисунок 1. Зависимость процентного содержания флавоноидов от времени настаивания

Как видно из представленного рисунка 1, оптимальное время настаивания равно 50 мин (содержание флавоноидов 1,40 и 1,31% при заваривании 1 и 2 ф/п соответственно), в то время как в инструкции по применению рекомендуемое время составляет 15 мин. При этом заваривание в течение 50 мин 1 ф/п и 2 ф/п по сравнению с рекомендуемым промежутком времени для заваривания повышает содержание флавоноидов на 12,9% (отн.) и 5,2% (отн.). Следует отметить, что чай за 50 мин остывает и при пероральном приеме вероятность дискомфорта для слизистой оболочки полости рта снижается.

Процент флавоноидов при соотношении ЛРС и вода 1 к 25, 1 к 50, 1 к 100 и 1 к 200 составил 0,76; 1,01; 1,21 и 1,60% соответственно. Из полученных данных следует, что оптимально заливать 1 ф/п 300 мл кипяченой (горячей) воды для получения чая с максимальным содержанием флавоноидов.

Далее изучали влияние наличия ф/п на кинетику высвобождения флавоноидов из ЛРС, т.к. ф/п может создавать дополнительную преграду для высвобождения активных компонентов. Зависимость содержания флавоноидов от времени настаивания при использовании ЛРС без ф/п представлена на рисунке 2.

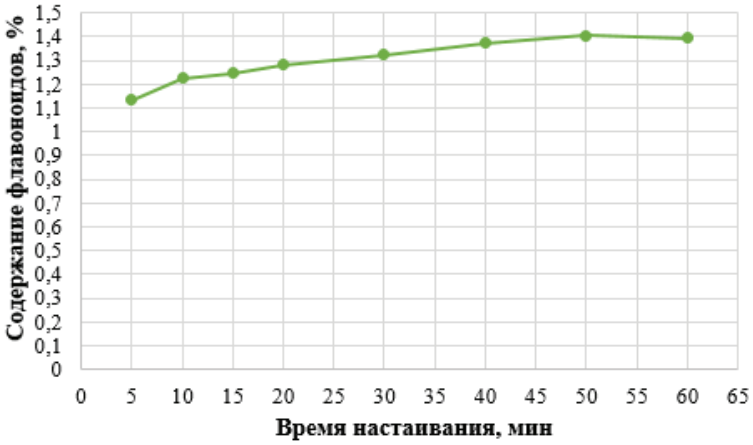


Рисунок 2. Зависимость процентного содержания флавоноидов от времени настаивания при использовании ЛРС без ф/п

Как видно из представленного рисунка 2, оптимальное время настаивания равно 50 мин (содержание флавоноидов 1,40%). При сопоставлении содержания флавоноидов при заваривании чая в ф/п и без них показано, что на 5 и 10 мин заваривания содержания разнились на 12,2% (отн.) и 9,5% (отн.), при дальнейшем настаивании достоверной разницы в содержаниях флавоноидов при получении чая в ф/п и без них не наблюдали. Исходя из этого можно сказать, что ф/п не оказывает значимого влияния на высвобождение флавоноидов, т.к. время достижения максимальной концентрации флавоноидов в чае, а также процентное содержание данной группы БАВ совпадают с таковыми значениями при использовании ЛРС в ф/п.

Для получения чая на основе тысячелистника травы в ф/п оптимальной является следующая технология приготовления: 1 ф/п поместить в стеклянную посуду, залить 300 мл кипяченой (горячей) воды, закрыть крышкой и настаивать в течение 50 мин.

Наличие ф/п значимо не влияет на кинетику и степень высвобождения флавоноидов в горячую воду.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ali SI, Gopalakrishnan B, Venkatesalu V. Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of Achillea millefolium L.: A Review. Phytotherapy Research. 2017;31(8):11–33. DOI: 10.1002/ptr. 5840.

2. Реестр лекарственных средств Республики Беларусь [Интернет]. УП Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; 2021 г. Доступно по: https://www.rceth.by/NDfiles/instr/20_01_2274_s.pdf

3. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 2 т. М-во здравоохр. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». Под общ. ред. СИ Марченко. 2-е изд. Т. 2. Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья. Молодечно: Тип. «Победа». 2016.

4. Карчевская КИ. Количественное определение флавоноидов тысячелистника травы. «Modern approach of experimental and preclinical pharmacology»: матеріали Міжнар. дист. наук.-практ. конф. 2021;103–104.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR PRODUCING TEA FROM YARROW HERB

Karchevskaya K.I., 4th year student
Belarusian State Medical University;
83, Dzerzhinsky Avenue, Minsk, 220116, Republic of Belarus

In the course of this work, a technology for obtaining tea from yarrow grass was developed, and the effect of the presence of a filter bag (f/b) on the degree and rate of release of flavonoids into hot water was established. To obtain an aqueous extract with a maximum content of flavonoids, it is necessary to place 1 f/b in a glass dish, pour 300 ml of hot water, close the lid and leave for 50 minutes. The presence of f /b does not affect the kinetics and the degree of release of flavonoids.

Key words: *yarrow, flavonoids, spectrophotometry.*

REFERENCES

1. Ali SI, Gopalakrishnan B, Venkatesalu V. Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of Achillea millefolium L.: A Review. Phytotherapy Research. 2017;31(8):11–33. DOI: 10.1002/ptr. 5840.

2. Register of medicines of the Republic of Belarus [Internet]. UE Center for Expertise and Testing in Health Care; 2021 Available at: https://www.rceth.by/NDfiles/instr/20_01_2274_s.pdf (in Russ)

3. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: in 2 volumes. Ministry of Health care of the Rep. of Belarus, UE Center for Expertise and Testing in Health Care; under total. ed. SI Marchenko. 2nd ed. V. 2. Quality control of substances for pharmaceutical use and medicinal plant raw materials. Molodechno: Printing house "Victory". 2016: 1368. (in Russ)

4. Karchevskaya KI. Quantification of the flavonoids of the herb yarrow. "Modern approach of experimental and preclinical pharmacology": materials of the international dist. scientific practical conf. 2021;103-104. (in Russ)

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ОРАЛЬНО ДИСПЕРГИРУЕМЫХ ТАБЛЕТОК

Касымов И.Д.[1], Кузнецов А.Г.[2], магистранты 1 года обучения
Руководитель: **Басевич А.В.,** к.фарм.н., доц.
[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
[2]Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики,
197101, г. Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д. 49, Российская Федерация
E-mail: kasymov.ilya@pharminnotech.com

Предложено использование технологий машинного обучения для разработки состава и технологии орально диспергируемых таблеток. Описан первый этап исследования: моделирование и сбор экспериментальных данных для построения первичной модели. Изучены существующие технологические подходы к производству орально диспергируемых таблеток, выбрана и обоснована технология прямого прессования. Разработан план и матрица эксперимента по сбору первичных данных.

Ключевые слова: *орально диспергируемые таблетки, машинное обучение, планирование эксперимента.*

Введение. Орально диспергируемые таблетки (ОДТ) – таблетки, предназначенные для помещения в полость рта, где они быстро диспергируются до проглатывания [1]. Данный способ приёма позволяет избавиться от основных недостатков классических таблеток: сниженной в сравнении с другими лекарственными формами (ЛФ) биодоступностью, неприятного вкуса, необходимости наличия воды под рукой, возможности подавиться таблеткой при приёме и некоторых других. Учитывая эти преимущества, разработка составов и технологий ОДТ сегодня оправдана и перспективна [2].

Нами было выдвинуто предположение, что технологии машинного обучения, которые сегодня набирают популярность и успешно используются в решении самых разных прикладных задач, можно применить и для разработки оп-

тимального состава и подбора технологических параметров производства орально диспергируемых таблеток. Таким образом, целью настоящего исследования является разработка состава ОДТ на основе применения модели машинного обучения. Для её достижения были поставлены следующие задачи:

• изучение перечня вспомогательных веществ (ВВ), используемых в составах ОДТ;

• определение технологических свойств образцов ВВ;

• создание плана и матрицы эксперимента по сбору первичных данных для модели машинного обучения и непосредственный сбор данных;

• создание модели и проверка её адекватности, а также получение оптимального состава на основе полученной модели.

Машинное обучение

Суть применения машинного обучения в разработке состава и технологии ОДТ заключается в том, что на основе большого количества экспериментальных данных есть возможность найти некоторые закономерности и построить на их основе модель, при помощи которой можно прогнозировать свойства таблетки в зависимости от состава [5, 6]. На основе анализа литературы [1] были выбраны следующие параметры (отклики и предикторы) с целью проведения разработки ОДТ, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Отклики и предикторы в разработке состава и технологии ОДТ

№ состава	Отклики		Предикторы									
	Прочность таблетки, кН	Время диспергирования, сек	Содержание наполнителя, %	Содержание дезинтегранта, %	Усилие прессования, кН.	Форма	Размер частиц, мкм	Полидисперсность, мкм^2	Контактный угол, ° смачивания	Время/скорость смешения	Масса таблетки, мкг	Порозность слоя таблетки, %
№ i	…	…	…	…	…	…	…	…	…	…	…	…

В работе были использованы следующие вспомогательные вещества: маннитол (Pearlitol®, Roquette, Франция), сорбитол (Neosorb®, Roquette, Франция), мальтодекстрин (Glucidex®, Roquette, Франция), микрокристаллическая целлюлоза (Vivapur® 102, JRS Pharma, Германия), декстроза (Roquette, Франция), лактоза (Lactochem® Crystals, DFE Pharma, Германия), кроскарамелоза натрия (Solutab®, Roquette, Франция), натрия крахмал гликолят (Glycolys®, Roquette, Франция), кросповидон (Kollidon CL-SF, BASF, Германия), готовая смесь для прессования ОДТ (Ludiflash, BASF, Германия), крахмал кукурузный (Roquette, Франция), крахмал картофельный (Roquette, Франция), поливинилпирролидон (Polyplasdone XL-10, Ashland, США), тальк (Nitika, Индия), магния стеарат (Roquette, Франция), кальция стеарат (Tablube C, Nitika, Индия), натрия стеарилфумарат (Pruv®, JRS Pharma, Германия).

Прочность модельных таблеток проверяли в соответствии с ОФС 1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание». Время диспергирования измерялось согласно ОФС 1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул».

Определение технологических свойств вспомогательных веществ проводили по таким показателям, как описание, ситовой анализ, степень сыпучести порошков (по углу откоса и по прохождению через воронку), потеря в массе при высушивании и растворимость согласно соответствующим методикам Государственной Фармакопеи 14 издания. Также изучали размер частиц методом микроскопии, прессуемость веществ, насыпные характеристики по методике из ОФС 1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков».

Для построения матрицы эксперимента использовали программу рандомизации значений параметров исходя из их необходимого минимального количества.

Изучение перечня ВВ, используемых в составе ОДТ. В ходе изучения литературных данных [2, 3, 4] было установлено, что основными подходами к производству ОДТ можно считать технологию прямого прессования, использование сухой или влажной грануляции и лиофилизацию раствора активной фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ, разлитого в блистерные ячейки. Существуют и другие технологии, но они носят частный характер. Ввиду преимущества прямого прессования, а именно экономичности – выпуск ОДТ таким способом возможен на оборудовании для производства классических таблеток – и высокой производительности подхода, в исследовании было решено опираться именно на технологию прямого прессования и прибегать к помощи грануляции только в особых случаях. От лиофилизации из-за её неоправданной в данном случае дороговизны и низкой производительности пришлось отказаться.

Опираясь на выбранную технологию необходимые вспомогательные вещества были разделены на группы: наполнители, дезинтегранты, связующие, опудриватели, вкусовые добавки. Также было решено включить в состав изучаемых вспомогательных веществ готовую смесь эксципиентов для изготовления ОДТ. Все выбранные для проведения исследования вспомогательные вещества указаны в разделе материалы и методы, а функциональное назначение каждого отдельного компонента отражено в матрице эксперимента по сбору первичных данных (таблица 2).

Изучение технологических свойств ВВ. Прежде чем составлять матрицу эксперимента, был проведён анализ технологических свойств отдельных образцов вспомогательных веществ. Результаты анализа некоторых ВВ представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Технологические свойства вспомогательных веществ, использованных в исследовании

Наименование ВВ / Показатель	Сорбитол	Маннитол	Ludiflash	Kollidon CL-SF
Описание	Порошок белого цвета из плотных частиц	Белый мелкокристаллический порошок. Пылящий, легко остаётся на поверхностях	Белый сыпучий порошок с частицами разных размеров	Белый мелкодисперсный порошок, сильнопылящий
Сыпучесть, сек	10,86±0,11	13,90±0,98	11,36±0,86	Очень плохая, образец не проходил через воронку полностью
Насыпные характеристики: ρ_0, г/мл $\rho_к$, г/мл	 0,611±0,018 0,676±0,003	 0,462±0,007 0,549±0,007	 0,510±0,002 0,645±001	 0,181±0,002 0,268±0,003
Прессуемость	Хорошая	Хорошая	Хорошая	Удовлетворительная
Растворимость в воде	Очень легко раствори м	Легко раствори м	Есть крупная нерастворимая в воде фракция	Не раствори м
Фракционный состав, %: 0,5 мм 0,25 мм 0,1 мм Менее 0,1	 98,86±0,01 0,72±0,01 0,34±0,01 0,06±0,01	 0,10±0,01 0,19±0,01 78,05±0,01 21,66±0,01	 6,03±0,01 14,64±0,01 74,30±0,01 5,03±0,01	 3,28±0,01 1,41±0,01 71,01±0,01 24,30±0,01

Планирование модельных составов для следующего этапа основывали с учетом данных представленных в таблице 2. Например, исходя из плотности наполнителей и их прессуемости, были выбраны их ориентировочные содержания.

Создание плана и матрицы эксперимента. Одним из ключевых этапов работы являлся сбор базы данных для заполнения таблицы откликов и предикторов и обучения модели. Для этого был разработан многофакторный эксперимент: не менее 30 серий модельных составов (таблица 3) были изготовлены и протестированы по свойствам «откликам», представленным в таблице 1. Каждая серия представлена минимум 20-ю таблетками. Между собой составы отличаются по всем «предикторам»: качественно, количественно и по технологическим параметрам изготовления. Запланированный эксперимент получился масштабным, что отражает особенность машинного обучения – чем больше входных данных, тем более точной будет модель. Результаты откликов и предикторов по отдельным сериям заносятся в таблицу 1 только после статистической обработки.

Таблица 3 – Матрица планирования эксперимента по разработке состава и технологии ОДТ

№ состава	Готовая смесь ВВ	Наполнители						Дезинтегранты						Связующие			Опудриватели			
	Ludiflash	Маннитол	Сорбитол	Мальтодекстрин	МКЦ	Декстроза	Лактоза	Kollidon CL-SF	Повидон (XL-10)	Кроскарамелоза натрия	Натрия крахмал гликолят	Крахмал кукурузный	Крахмал картофельный	ПВП	Крахмал кукурузный	Крахмал картофельный	Тальк	Магния стеарат	Кальция стеарат модифицированный	Натрия стеарил фумарат
1	300																			
2	100				50			40			80			27			3			
3	100				50			40			80			27			3			
4	100				50			40			80			27			3			
5	100				50			40				80		27			3			
6	100				50			40				80		27			3			
7		100			50			40				80		27			3			
8		100			50			40					80	27			3			
9		100			50			40					80	27				3		
10		100			50			40					80	27				3		
11		100			50			40					80		27			3		

№ состава	Готовая смесь ВВ	Наполнители						Дезинтегранты						Связующие			Опудриватели			
	Ludiflash	Маннитол	Сорбитол	Мальтодекстрин	МКЦ	Декстроза	Лактоза	Kollidon CL-SF	Повидон (XL-10)	Кроскармелоза натрия	Натрия крахмал гликолят	Крахмал кукурузный	Крахмал картофельный	ПВП	Крахмал кукурузный	Крахмал картофельный	Тальк	Магния стеарат	Кальция стеарат модифицированный	Натрия стеарил фумарат
12			100		50				40		80				27			3		
13			100		50				40		80				27			3		
14			100		50				40		80				27			3		
15			100		50				40			80			27			3		
16			100				50		40			80			27				3	
17				100			50		40			80			27				3	
18				100			50		40				80		27				3	
19				100			50		40				80		27				3	
20				100			50		40				80			27			3	
21				100			50		40				80			27			3	
22						100	50			40	80					27			3	
23						100	50			40	80					27				3
24						100	50			40	80					27				3
25						100	50			40		80				27				3
26						100	50			40		80				27				3
27						100	50			40		80				27				3
28						100	50			40			80			27				3
29						100	50			40			80			27				3
30						100	50			40			80			27				3

На основании результатов экспериментов согласно матрице планирования, имеющей вид таблицы 3, будет проведен анализ данных, заполнена таблица откликов и предикторов (таблица 1) и построена первичная модель машинного обучения, которая позволит выявить наиболее значимые параметры эксперимента.

В работе представлен подход к разработке состава и технологии орально диспергируемых таблеток на основе применения модели машинного обучения.

Были изучены актуальные подходы к производству ОДТ, выбрана и обоснована технология прямого прессования, изучены технологические свойства используемых вспомогательных веществ, на основе которых разработаны план и матрица эксперимента по сбору первичных данных.

Была разработана таблица откликов и предикторов по разработке состава и технологии орально диспергируемых таблеток. Результаты исследования необходимы для проведения второго этапа моделирования машинного обучения для построения модели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки». Доступно по: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/125/index.html.

2. Swarupa Arvapalli, D. Swamy, Shyamala. Oral disintegration tablets – an updated review. Indo american journal of pharmaceutical sciences. 2019;06(03) DOI: 10.5281/zenodo.2617331.

3. Шевченко АМ, Ковалевская ЕГ. Технологические особенности разработки состава и способов производства ородисперсных лекарственных форм. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014;1(6):24-30.

4. Блынская ЕВ, Тишков СВ, Алексеев КВ, и др. Особенности создания методом лиофилизации таблеток, диспергируемых в полости рта. Фармация. 2019;68(2):17-23. DOI: 10.29296/25419218-2019-02-03.

5. Kachrimanis K, Petrides M, & Malamataris S. Flow rate of some pharmaceutical diluents through die-orifices relevant to mini-tableting. International Journal of Pharmaceutics. 2005;303(1-2):72–80. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.07.003.

6. Burbidge R, Trotter M, Buxton B, & Holden S. Drug design by machine learning: support vector machines for pharmaceutical data analysis. Computers & Chemistry, 2001;26(1):5–14. doi:10.1016/s0097-8485(01)00094-8.

SUMMARY

APPLICATION OF MACHINE LEARNING TECHNOLOGIES IN THE DEVELOPMENT OF THE OPTIMUM COMPOSITION OF ORAL DISPERSIBLE TABLETS

Kasymov I. D., Kuznetsov A.G., 1th year masters of science
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation
Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics,
49, Kronverksky av., St. Petersburg, 197101, Russian Federation

The use of machine learning technologies for the development of the composition and technology of orally dispersible tablets is proposed. The first stage of the study is described: modeling and collecting experimental data for building a primary model. The existing technological approaches to the production of orally dispersible tablets have been studied, and the technology of direct compression has been selected and substantiated. The plan and matrix of the experiment for the collection of primary data have been developed.

Key words: *orally dispersible tablets, machine learning, experiment planning.*

REFERENCES

1. Gosudarstvennaja farmakopeja RF XIV izd. Tom 2. OFS.1.4.1.0015.15 «Tabletki». [Jelektronnoe izdanie]. (In Russian) Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/125/index.html.

2. Swarupa Arvapalli, D. Swamy, Shyamala. Oral disintegration tablets – an updated review. Indo american journal of pharmaceutical sciences. 2019;06(03) DOI: 10.5281/zenodo.2617331.

3. Shevchenko AM, Kovalevskaja EG. Tehnologicheskie osobennosti razrabotki sostava i sposobov proizvodstva orodispersnyh lekarstvennyh form. Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv. 2014;1(6):24-30. (In Russ).

4. Blynskaja EV, Tishkov SV, Alekseev KV, et al. Osobennosti sozdanija metodom liofilizacii tabletok, dispergiruemyh v polosti rta. Farmacija. 2019;68(2):17-23. DOI: 10.29296/25419218-2019-02-03. (In Russ).

5. Kachrimanis K, Petrides M, & Malamataris S. Flow rate of some pharmaceutical diluents through die-orifices relevant to mini-tableting. International Journal of Pharmaceutics. 2005;303(1-2):72–80. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.07.003.

6. Burbidge R, Trotter M, Buxton B, & Holden S. Drug design by machine learning: support vector machines for pharmaceutical data analysis. Computers & Chemistry, 2001;26(1):5–14. doi:10.1016/s0097-8485(01)00094-8.

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ГИДРАТАЦИИ ТОНКОЙ ПЛЁНКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМ С ДИАМЕТРОМ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИМ ЭФФЕКТИВНУЮ ДОСТАВКУ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ГОЛОВНОЙ МОЗГ

Кобылинская Н.Ю., магистрант 2 года
Руководитель: **Вайнштейн В.А.**, докт. фарм. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: nadezhda.kobylinskaya@spcpu.ru

В данной статье анализируется эффективность метода гидратации тонкой плёнки с точки зрения возможности получения липосом как носителей лекарственных средств с диаметром, позволяющим наиболее эффективно осуществлять доставку лекарственных средств в головной мозг.

Ключевые слова: *гематоэнцефалический барьер, липосомы, метод гидратации тонкой плёнки.*

Актуальность данной статьи обусловлена широкой распространённостью заболеваний головного мозга (например, болезни Альцгеймера [1], болезни Паркинсона [2], шизофрении [3]), а также тем, что они часто становятся причиной инвалидности и смерти пациентов (например, инсульты [4]). Лечение этих заболеваний, как правило, длительное и дорогостоящее.

Целью написания данной статьи является оценка возможности получения методом гидратации тонкой плёнки липосом – главных компонентов перспективных липосомальных лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний головного мозга – с диаметром, позволяющим им наиболее эффективно доставлять лекарственные средства в головной мозг.

Достижению поставленной цели будет способствовать решение следующих задач:

1. определение диаметра липосом, позволяющего им наиболее эффективно доставлять лекарственные средства в головной мозг;

2. сравнение диаметров липосом, полученных в ходе экспериментов разными исследователями методом гидратации тонкой плёнки, между собой и с определённым ранее допустимым диаметром;

3. оценка процента загрузки лекарственных средств в липосомы, полученные методом гидратации тонкой плёнки.

Лекарственные препараты, применяемые для лечения заболеваний головного мозга, должны обладать способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер.

Гематоэнцефалический барьер образован эндотелиальными клетками (образуют капилляры спинного и головного мозга) и периваскулярными клетками (астроцитами, перицитами, микроглиальными, гладкомышечными) [5]. Он есть у всех животных, обладающих развитой нервной системой [6].

Одним из эффективных способов преодоления гематоэнцефалического барьера с целью лечения различных заболеваний головного мозга является заключение лекарственных средств в липосомы, которые выполняют функцию носителей лекарственных средств.

Липосомы представляют собой пузырьки сферической формы, диаметром от 10 нм до 1 мкм и более, заполненные, как правило, водой с растворёнными в ней веществами, окружённые одним или несколькими двойными слоями (бислоями) липидов. И наружная, и внутренняя их поверхности являются полярными. Они могут быть носителями как липофильных, так и гидрофильных соединений [7].

Для эффективного преодоления гематоэнцефалического барьера липосомы не должны быть слишком большими, иначе они физически не смогут его преодолеть. Однако, слишком маленький объём липосом не позволит загрузить в них достаточное для терапии количество лекарственного средства. Таким образом, липосомы должны иметь средний размер. За средний диаметр можно принять значение от 100 до 1000 нм.

Метод гидратации тонкой плёнки достаточно часто используется для изготовления липосом. Суть этого метода заключается в получении тонкой плёнки путём растворения исходных липидов с последующим выпариванием растворителя. Затем образовавшуюся тонкую плёнку гидратируют раствором соли или буферным раствором.

В качестве иллюстрации метода гидратации тонкой плёнки можно привести описание получения S. K. Jain, D. V. Kohli и Vandana Soni липосом, нагруженных 5-фторурацилом. Они растворили стеариламин, холестерин и L-α-соевый фосфатидилхолин (липиды) в смеси метанола и хлороформа (в соотношении 1:2). Отлили тонкую плёнку путём выпаривания растворителя с помощью роторного испарителя при пониженном давлении. Высушенную тонкую плёнку гидратировали фосфатным солевым буфером (pH=7,4), содержащим 5-фторурацил. Далее содержимое колбы подвергли непрерывному встряхиванию на протяжении 1 часа. Полученные многослойные липосомы обрабатывали ультразвуком при температуре 48°C в течение 1 минуты для того, чтобы они стали однослойными [8].

Ниже приведены краткие сведения о сути экспериментов, в результате которых были получены липосомы, диаметры которых будут подвергнуты сравнению между собой и ранее определённым допустимым диаметром в Таблице 1.

Таблица 1 – Диаметр липосом

№	Диаметр полученных липосом, нм	Соответствие/Несоответствие допустимому диаметру
1	211,2 ± 0,8	Соответствует
2	114,3	Соответствует
3	105,1±2,2	Соответствует
4	121,0±2,1 (с антитрансферрином) 124,0±4,9 (с лактоферрином)	Соответствует
5	209,0 ± 0,8	Соответствует

Примечание:

1. Pranali Deshpande, Aditi Jhaveri, Bhushan Pattni и Vladimir Torchilin изготовили систему направленного транспорта росвератрола для лечения глиобластом (чрезвычайно агрессивных злокачественных опухолей головного мозга с очень плохим прогнозом для пациентов). Изготовленная ими система направленного транспорта состояла из липосом, нагруженных росвератролом и модифицированных фрагментами трансферрина [9].

2. Wei Cai, Jiantao Chen, Fabao Gao, Huile Gao, Qin He, Ling Mei, Kairong Shi, Yang Wang, Pengjin Zhu и Taili Zong, изготовили систему направленного транспорта с двойным нацеливанием для лечения глиом. Изготовленная ими система направленного транспорта состояла из липосом, нагруженных доксорубицином и конъюгированных с трансферрином и способным к проникновению в клетки пептидом TAT [10].

3. Huali Chen, Qin He, Rui Kuai, Ji Liu, Jie Tang, Yao Qin, Xiaoxiao Wang, Wenmin Yuan, Li Zhang, Qianyu Zhang, Zhirong Zhang и Qiang Zhang изготовили систему направленного транспорта доксорубицина для лечения глиомы. Изготовленная ими система направленного транспорта состояла из липосом, нагруженных доксорубицином и модифицированных ковалентно связанным с холестерином пептидом TAT [11].

4. Zisis Bimpisidis, Pierluigi Caboni, Gaetano Di Chiara, Francesco Corrias, Anna Maria Fadda, Francesco Lai, Maria Antonietta De Luca и Elias Maccioni изготовили систему направленного транспорта пептида сенктида. Изготовленная ими система направленного транспорта состояла из липосом, нагруженных пептидом сенктидом и модифицированных антитрансферрином и лактоферрином [12].

5. Huali Chen, Qin He, Wei Jiang, Ji Liu, Lei Tang, Yao Qin и Qianyu Zhang изготовили систему направленного транспорта доксорубицина для лечения глиомы. Изготовленная ими система направленного транспорта состояла из липосом, нагруженных доксорубицином и модифицированных лактоферрином [13].

Из таблицы 1 следует, что во всех рассмотренных случаях диаметры полученных липосом соответствовали допустимому и имели близкие друг другу значения.

В представленной ниже Таблице 2 сравниваются между собой проценты загрузки лекарственных средств в липосомы и даётся оценка их величинам.

Таблица 2 – Процент загрузки лекарственных средств в липосомы

№	Процент загрузки, %	Оценка процента загрузки
1	70–75	Средняя
2	Свыше 90	Высокая
3	93	Высокая

Из таблицы 2 следует, что не во всех рассмотренных случаях процент загрузки лекарственных средств в липосомы был высоким, однако низким он тоже не был.

На основании данных приведённых выше таблиц можно сделать вывод об эффективности метода гидратации тонкой плёнки с точки зрения возможности получения липосом как носителей лекарственных средств с диаметром, позволяющим наиболее эффективно осуществлять доставку лекарственных средств в головной мозг.

Диаметр липосом в липосомальных лекарственных препаратах должен быть определён как показатель «Размер частиц» согласно ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» [14]. Определение диаметра липосом осуществляется методом микроскопии. В качестве оборудования используется бинокулярный микроскоп, настроенный на 100-кратное увеличение.

Однако, несмотря на соответствие размеров липосом размерам невидимых частиц согласно ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения», они к таковым не относятся. Невидимые механические включения – это посторонние для лекарственного препарата подвижные нерастворимые частицы (за исключением пузырьков газа), размеры которых не превышают 100 мкм. Их обнаруживают различными методами (счётно-фотометрическим методом, методом электрочувствительных зон, методом микроскопии) [15]. Липосомы же являются главными компонентами лекарственных препаратов данного типа.

В статье было проведено сравнение диаметров липосом, полученных в ходе экспериментов разными исследователями методом гидратации тонкой плёнки, между собой и с определённым ранее допустимым диаметром, а также была дана оценка проценту загрузки лекарственных средств в липосомы, полученные данным методом. Сравнение диаметров показало, что во всех рассмотренных случаях диаметры полученных липосом соответствовали допустимому и имели близкие друг другу значения, а процент загрузки лекарственных средств в липосомы не во всех случаях был наиболее высоким, хотя во всех вариантах степень загрузки была достаточной для эффективного применения.

На основании полученных данных можно сделать вывод об эффективности метода гидратации тонкой плёнки с точки зрения возможности получения липосом как носителей лекарственных средств с диаметром, позволяющим наиболее эффективно осуществлять доставку лекарственных средств в головной мозг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавлева КС, Куташов ВА. Современный взгляд на болезнь Альцгеймера. Молодой ученый. 2015;23:341-347.

2. Разыщикова НМ. Генетические аспекты болезни Паркинсона. Молодой ученый, 2017. 12:148-151.

3. Захаров ОП, Куташов ВА. Современные методы лечения шизофрении. Молодой ученый. 2016;5:210-212.

4. Матвиец ВС, Куташов ВА. Современный взгляд на диагностику и дифференциальную диагностику геморрагического инсульта. Молодой ученый. 2015;19:291-294.

5. Begley D.J. The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. J. Pharm. Pharmacol. 1996;4:136–146.

6. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. Cell. Mol. Neurobiol. 2005;25:5–23.

7. Аляутдин РН. Транспорт лекарственных веществ через гематоэнцефалический барьер: линия Мажино или волшебный Сезам? Молекулярная медицина. 2012; 3:3-12.

8. Soni V, Kohli DV, Jain SK. Transferrin coupled liposomes as drug delivery carriers for brain targeting of 5-florouracil. Journal of Drug Targeting. 2005;13(4):245-250.

9. Jhaveri A, Deshpande P, Pattni B, Torchilin V. Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma. Journal of Controlled Release. 2018;277:89-101.

10. Zong T, Mei L, Gao H, et al. Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals. Molecular Pharmaceutics. 2014;11:2346-2357.

11. Qin Y., Chen H, Zhang Q, et al. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals. International Journal of Pharmaceutics. 2011;420:304-312.

12. Luca M.A.De, Lai F, Corrias F, et al. Lactoferrin- and antitransferrin-modified liposomes for brain targeting of the NK3 receptor agonist senktide: prepara

13. Chen H, Qin Y, Zhang Q, et al. Lactoferrin modified doxorubicin-loaded procationic liposomes for the treatment of gliomas. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011;44:164-173.

14. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.1.0007.15 «Лекарственные формы для парентерального применения». Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

15. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.2.0006.15 «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения». Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

SUMMARY

ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF THE THIN FILM HYDRATION METHOD FOR OBTAINING LIPOSOMES WITH A DIAMETER PROVIDING EFFECTIVE DELIVERY OF MEDICINES IN THE BRAIN

Kobylinskaya N.Y., 2th year undergraduate
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

This article analyzes the efficiency of the thin film hydration method from the point of view of the possibility of obtaining liposomes as carriers of drugs with a diameter that allows the most efficient delivery of drugs to the brain.

Key words: *blood-brain barrier, liposomes, thin film hydration method.*

REFERENCES

1. Zhuravleva KS, Kutashov VA. Sovremennyy vzglyad na bolezn' Al'tsgeymera. Molodoy uchenyy. 2015;23:341-347. (in Russ)
2. Razyshchikova NM. Geneticheskiye aspekty bolezni Parkinsona. Molodoy uchenyy. 2017;12:148-151. (in Russ)
3. Zakharov OP, Kutashov VA. Sovremennyye metody lecheniya shizofrenii. Molodoy uchenyy. 2016;5:210-212. (in Russ)
4. Matviyets VS, Kutashov VA. Sovremennyy vzglyad na diagnostiku i differentsial'nuyu diagnostiku gemorragicheskogo insul'ta. Molodoy uchenyy. 2015;19:291-294. (in Russ)
5. Begley D.J. The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. J. Pharm. Pharmacol. 1996;4:136–146.
6. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. Cell. Mol. Neurobiol. 2005;25:5–23
7. Alyautdin RN. Transport lekarstvennykh veshchestv cherez gematoentsefalicheskiy bar'yer: liniya Mazhino ili volshebnyy Sezam? Molekulyarnaya meditsina. 2012;3:3-12. (in Russ)
8. Soni V, Kohli DV, Jain SK. Transferrin coupled liposomes as drug delivery carriers for brain targeting of 5-florouracil. Journal of Drug Targeting. 2005;13(4):245-250.
9. Jhaveri A, Deshpande P, Pattni B, Torchilin V. Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma. Journal of Controlled Release. 2018;277:89-101.
10. Zong T, Mei L, Gao H, et al. Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals. Molecular Pharmaceutics. 2014;11:2346-2357.
11. Qin Y., Chen H, Zhang Q, et al. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals. International Journal of Pharmaceutics. 2011;420:304-312.
12. Luca M.A.De, Lai F, Corrias F, et al. Lactoferrin- and antitransferrin-modified liposomes for brain targeting of the NK3 receptor agonist senktide: prepara.
13. Chen H, Qin Y, Zhang Q, et al. Lactoferrin modified doxorubicin-loaded procationic liposomes for the treatment of gliomas. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011;44:164-173.
14. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd. Tom 2. OFS.1.4.1.0007.15 «Lekarstvennyye formy dlya parenteral'nogo primeneniya». Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)
15. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIV izd. Tom 2. OFS.1.4.2.0006.15 «Nevidimyye mekhanicheskiye vklyucheniya v lekarstvennykh formakh dlya parenteral'nogo primeneniya». Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ТЕОРИИ ЭПИДЕМИЙ

Коновалова А.Д., студ. 3 курса, **Мяндина Т.А.**, студ. 4 курса
Руководитель: **Мошинский А.И.**, доц. кафедры ПАХТ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: anastasiya.konovalova@spcpu.ru

Составлена математическая модель распространения эпидемии некоторой инфекции при известном начальном числе заболевших, рассмотрен эпидемический процесс при различных параметрах, а также выведены формулы для прогнозирования числа людей, невосприимчивых к инфекции.

Ключевые слова: *моделирование, эпидемия, прогнозирование.*

Вопрос распространения инфекций в текущий момент стоит достаточно остро. Сегодняшняя пандемия выявила потребность в прогнозировании распространения инфекции.

Применение математической модели позволит спрогнозировать количество заболевших и выздоровевших в некий момент времени, а также рассчитать потребности в лекарственных препаратах, средствах индивидуальной защиты и медицинских изделиях, что поможет составить план соответствующего производства.

Цель настоящей работы – изучение математической модели теории эпидемий, влияния интенсивности заражения и частоты выздоровления/смерти на ход эпидемии.

Для изучения эпидемического процесса составляем математическую модель, принимая, что имеется группа из N однородно перемешивающихся индивидуумов, в которой в момент времени τ имеется X восприимчивых к болезни индивидуумов, Y источников инфекции и Z невосприимчивых к инфекции индивидуумов (изолированных, умерших, выздоровевших). Можно сказать, что Z определяет число пострадавших, в разной степени, в эпидемии индивидуумов. Таким образом, выполняется в любой момент времени равенство

$$X + Y + Z = N \tag{1}$$

Частота результативных (приводящих к заражению) контактов, присутствующих в системе индивидуумов X и Y равна β. Таким образом среднее число новых случаев заболевания, появившихся в интервале $d\tau$, равно $\beta XYd\tau$ т.е. пропорционально как числу носителей инфекции, так и числу восприимчивых к заболеванию индивидуумов. В то же время за интервал $d\tau$ зараженную группу покидают $\gamma Yd\tau$ индивидуумов, где γ – частота случаев удаления.

Данную ситуацию можно описать как систему двух химических реакций, одна из которых содержит автокаталитическую стадию:

$$X + Y \xrightarrow{\beta} 2Y; \quad Y \xrightarrow{\gamma} Z. \tag{2}$$

Для этой реакции составим кинетические уравнения,

$$\frac{dX}{d\tau} = -\beta XY; \quad \frac{dY}{d\tau} = \beta XY - \gamma Y; \quad \frac{dZ}{d\tau} = \gamma Y, \tag{3}$$

и, в свою очередь, от них, перейдем к системе с безразмерными переменными и параметрами.

$$x = \frac{X}{N}, \quad y = \frac{Y}{N}, \quad z = \frac{Z}{N}, \quad t = N\beta\tau, \quad \rho = \frac{\gamma}{N\beta}, \tag{4}$$

где ρ – параметр подобия, в котором задача приобретет следующий вид:

$$\frac{dx}{dt} = -xy, \quad \frac{dy}{dt} = xy - \rho y, \quad \frac{dz}{dt} = \rho y; \tag{5}$$

$$x(0) = x_0, \; y(0) = y_0, \; z(0) = 0 \tag{6}$$

Закон сохранения (1) [интеграл системы уравнений (5)] в начальный момент времени имеет вид $x_0 + y_0 = 1$.

Получим еще один интеграл системы (5),(6). Для этого разделим первое уравнение (5) на третье, что дает $dx/dz = -x/\rho$. Проинтегрировав полученное уравнение, найдем при учете начальных условий (6)

$$x = x_0 \exp(-z/\rho). \tag{7}$$

Этот интеграл, соотношение (1) и третье уравнение (5) позволяет свести решение всей задачи к единственному дифференциальному уравнению

$$\frac{dz}{dt} = \rho\left[1 - z - x_0 \exp\left(-\frac{z}{\rho}\right)\right], \quad z(0) = 0. \tag{8}$$

На графиках представлены результаты решения основных уравнений.

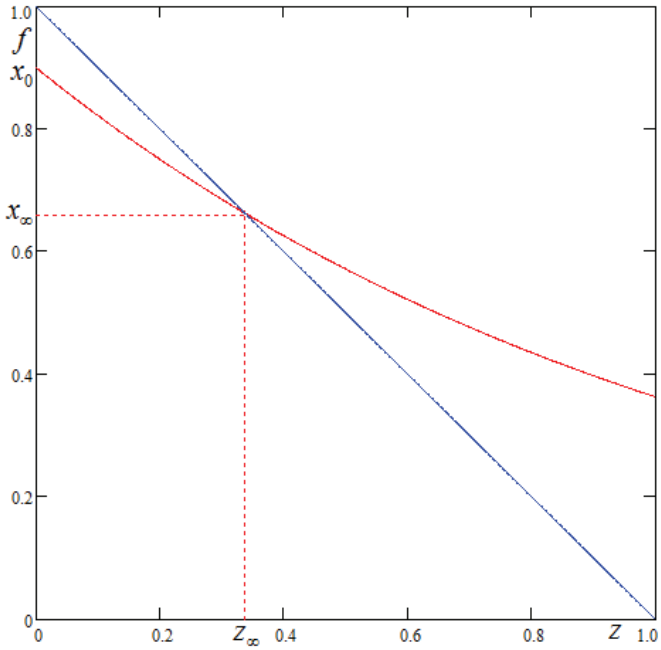


Рисунок 1. Графическое решение уравнения (9)

Интерес представляют параметры последствия эпидемии, т.е. стационарные значения переменных. Положив в системе (5) все производные по времени равными нулю, получим $y_\infty = 0$. Что касается параметров x_∞ и z_∞, то они определяются уравнением (7) и законом сохранения $x_\infty + z_\infty = 1$, т.е. фактически равенством нулю выражения в квадратных скобках уравнения (8). Индекс $_\infty$ помечает стационарные значения соответствующих переменных. Ситуацию иллюстрирует рис. 1, где приведено графическое решение стационарного уравнения

$$1 - z_\infty = x_0 \exp(-z_\infty/\rho), \tag{9}$$

Временную эволюцию системы при выбранных значениях параметра подобия ρ и начального значения x_0 представляет рис. 2 (кривые *1-3*).

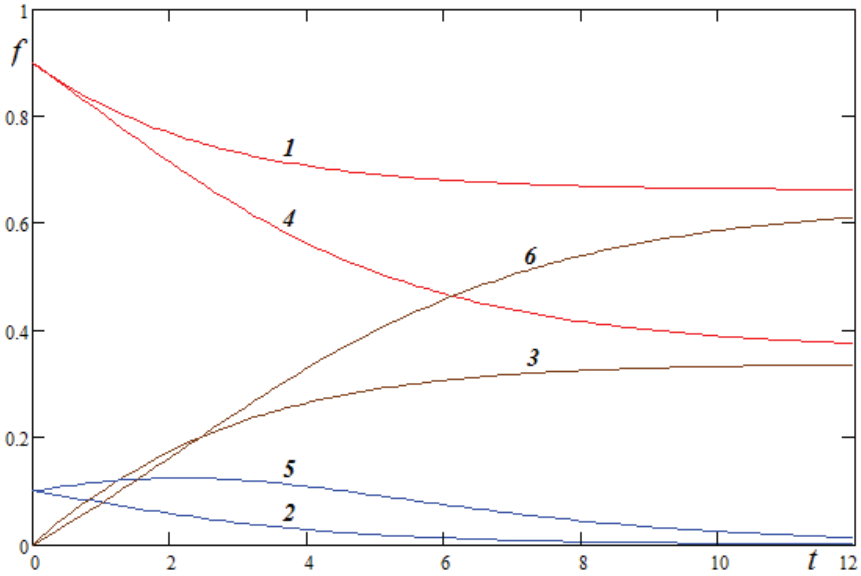


Рисунок 2. Кривые, описывающие эпидемию при x_0 = 0.9. *1* – *f* = *x*, ρ = 1.1; *2* – *f* = *y*, ρ = 1.1; *3* – *f* = z, ρ = 1.1; *4* – *f* = *x*, ρ = 0.7; *5* – *f* = *y*, ρ = 0.7; 6 – *f* = z, ρ = 0.7

Варьируя параметр ρ, относительно x_0, оценим характер протекания эпидемии. При x_0<ρ наступления эпидемии не происходит (графики 1-3).

Используя метод ряда возмущений, найдем решение уравнения $1 - z_\infty = x_0 \exp(-z_\infty/\rho)$ (9) при ρ≤1. Решение уравнения позволит спрогнозировать количество людей, невосприимчивых к заболеванию.

Для ρ > 1 получим выражение:

$$z_\infty = \frac{\rho y_0}{\rho - 1}\left[1 - \frac{y_0(\rho - 1/2)}{(\rho - 1)^2}\right]. \tag{10}$$

Численная проверка показала, в частности, совпадение до двух значащих цифр с точным расчетом при $y_0 = 0.05$ для ρ ≥ 1.6.

А для ρ=1 приходим к двучленному разложению

$$z_\infty = \sqrt{2y_0} + \frac{2y_0}{3}. \tag{11}$$

В ходе проделанной работы была составлена математическая модель развития эпидемии и выведены уравнения, решения которых, позволяют прогнозировать количество людей, невосприимчивых к заболеванию. Была выявлена зависимость течения эпидемии от параметра интенсивности и частоты выздоровления/смерти заболевших, выраженная в безразмерном параметре ρ. Известно, что ρ равное 0, описывает пасивное отношение к пандемии, заканчивающееся заражением всех рассматриваемых индивидуумов, при ρ большем или равным изначальной доле восприимчивых к инфекции, эпидемия не наступает, а если ρ значительно меньше x0, то распространение заболевания интенсивно развивается. Эти знания способны помочь в выявлении наиболее эффективных методов профилактики и борьбы с эпидемиями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейли Н. Математика в медицине и биологии. М.: Мир, 1970.

2. Трубецков ДИ. Введение в синергетику. Хаос и структуры. Изд. 2-е, испр. и доп. М.: Издательство Едиториал УРСС, 2004.

3. Лаврентьев МА, Шабат БВ. Методы теории функций комплексного переменного. М.: Наука, 1973.

4. Лебедев НН. Специальные функции и их приложения. М.; Л.: Физматгиз, 1963.

5. Мошинский АИ. Введение в математическое моделирование химико-технологических и биотехнологических процессов: учебное пособие. СПб.: Изд-во СПХФА, 2018.

6. Коул Дж. Методы возмущений в прикладной математике. М.: Мир, 1972.
7. Найфэ А. Введение в методы возмущений. М.: Мир, 1984.

SUMMARY

MATHEMATICAL MODEL OF EPIDEMIC THEORY

Konovalova A.D., 3rd year student **Myandina T.A.,** 4rd year students
Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A mathematical model of the spread of an epidemic of a certain infection with a known initial number of cases is compiled, the epidemic process is considered with various parameters, and formulas are derived for predicting the number of people immune to infection.

Key words: *modeling, epidemic, forecasting.*

REFERENCES

1. Bailey N. Mathematics in Medicine and Biology. Moscow: Mir, 1970. (in Russ)
2. Trubetskov DI. Introduction to Synergetics. Chaos and structures. Ed. 2nd, rev. and add. Moscow: Publishing house Editorial URSS, 2004.240 p. (in Russ)
3. Lavrent'ev MA, Shabat BV Methods of the theory of functions of a complex variable. Moscow: Nauka, 1973. (in Russ)
4. Lebedev NN Special functions and their applications. Moscow; Leningrad: Fizmatgiz, 1963. (in Russ)
5. Moshinsky AI Introduction to mathematical modeling of chemical-technological and biotechnological processes: a tutorial. Saint Petersburg: Publishing house of SPKhFA, 2018. (in Russ)
6. Cole J. Perturbation methods in applied mathematics. Moscow: Mir, 1972. (in Russ)
7. Nayfe A. Introduction to methods of perturbations. Moscow: Mir, 1984. (in Russ)

РАЗРАБОТКА СОСТАВА СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ 4,4'-(ПРОПАНДИАМИДО)ДИБЕНЗОАТА НАТРИЯ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ

Коцур Ю.М., асп. 3 года обучения
Руководитель: **Флисюк Е.В.**, докт. фарм. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: uliya.kocur@spcpu.ru

Целью настоящей работы являлась разработка состава системы доставки в виде матричных таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия с пролонгированным высвобождением. Для достижения поставленной цели были изучены свойства активного фармацевтического ингредиента, а также вспомогательных веществ. Разработка состава проведена при помощи метода математического моделирования Sediment Delivery Model. Изучено влияние матрицеобразующего полимера на основные характеристики таблеточных смесей, а также на скорость высвобождения действующего вещества из матричной таблетки. В результате проведенной работы был выбран состав системы доставки на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия.

Ключевые слова: *система доставки, пролонгированное высвобождение, матричные таблетки, кинетика высвобождения, тест «Растворение», технологические свойства.*

Системы доставки лекарственных средств (ЛС) имеют большое значение в развитии современной фармацевтической технологии, а также фармакологии. Такие системы обладают рядом преимуществ в сравнении с традиционными лекарственными формами (ЛФ). Такие системы позволяют осуществлять доставку ЛС непосредственно к желаемому месту действия, способствуют предупреждению нежелательного распределения действующего вещества (ДВ) в организме, нивелируют возможные побочные эффекты, а также позволяют осуществлять контроль скорость высвобождения ЛС [1].

Одной из наиболее распространенных пероральных систем доставки ЛС являются матричные таблетки, в которых применяются различные полимеры и их комплексы для создания каркаса, обладающего определенными свойствами.

Наиболее желательной при получении таблеток, в том числе матричных, является технология прямого прессования. Однако для ее осуществления активный фармацевтический ингредиент (АФИ) должен обладать рядом свойств: хорошая прессуемость, удовлетворительная сыпучесть, изодиаметрическая форма кристаллов и т.д. Если АФИ не обладает данными свойствами, осуществление технологии является затруднительным и необходимо оптимизировать композицию таким образом, чтобы вспомогательные вещества (ВВ), входящие в состав, нивелировали неудовлетворительные свойства АФИ.

Целью настоящей работы является разработка состава системы доставки на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия с пролонгированным высвобождением.

Объектом исследования являлась субстанция, синтезированная на кафедре органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, обладающая антистеатозным действием [2].

Также в качестве объектов исследования выступали матрицеобразующие полимеры: гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) Methocel K4M (Dow, Германия); сополимер поливинилацетата и повидона Kollidon SR (BASF, Германия); сополимер полиэтиленгликоля и поливинилового спирта Kollicoat IR (BASF, Германия); сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата Kollicoat MAE 100P (BASF, Германия); сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата Eudragit L100-55 (Evonik Pharma, Германия); натрия альгинат Protanal PH 6160 (DuPont, США).

В качестве наполнителя при разработке состава использовали лактозы моногидрат SuperTab 30GR (DFE Pharma, Германия), а также опудривающий агент магния стеарат фармакопейный (LekkoStyle, Россия).

Для выбора матрицеобразующего полимера, а также для расчета его количества был применен метод математического моделирования Sediment Delivery Model (SeDeM). Суть метода заключается в экспериментальном изучении технологических и физико-химических свойств АФИ и ВВ и оценке пригодности порошкообразного материала для прямого прессования. На основании полученных данных были рассчитаны математические индексы, при помощи которых являлось возможным произвести расчет необходимого количества матрицеообразующего компонента и других ВВ [3].

Для получения полной информации о способности материала к прямому прессованию необходимо было изучить такие параметры как: насыпная плотность без уплотнения, насыпная плотность с уплотнением, внутренняя пористость, индекс Карра, прессуемость, число Хауснера, угол естественного откоса, сыпучесть, потеря в массе при высушивании, гигроскопичность, размер частиц, гомогенность.

Изучение свойств компонентов осуществлялось в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РФ XIV издания (ГФ РФ XIV изд.), а также European Pharmacopoeia 9.0 [4,5].

Определение пригодности порошкообразного материала для прямого прессования производили по определению математических индексов для каждого изученного показателя. Приведение значения изученных свойств к математическим индексам представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры сыпучего материала

Параметр	Предельное значение (v)	Индекс (r)	Перевод значения v в индекс r
Насыпная плотность	0-1	0-10	10v
Насыпная плотность после уплотнения	0-1	0-10	10v
Внутренняя пористость	0-1.2	0-10	10v/1.2
Индекс Карра	0-50	0-10	v/5
Коэффициент прессуемости	0-200	0-10	v/20
Число Хауснера	3-1	0-10	(30-10v)/2
Угол естественного откоса	50-0	0-10	10-(v/5)
Сыпучесть	20-0	0-10	10-(v/2)
Потеря в массе при высушивании	10-0	0-10	10-v
Гигроскопичность	20-0	0-10	10-(v/2)
Частицы размером менее 50 мкм	50-0	0-10	10-(v/5)
Гомогенность	(0-2) $x10^{-2}$	0-10	500v

При значении одного из индексов менее 5 материал считался непригодным для прямого прессования.

После определения наиболее подходящих матрицеобразующих полимеров производили расчет количеств, которые необходимо ввести в состав для придания таблеточной смеси необходимых свойств по формуле 1:

$$CP = 100 - \frac{(RE - R)}{(RE - RP)} \cdot 100, \quad (1)$$

Для полученных таблеточных смесей определяли технологические свойства в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд.

Результаты изучения свойств компонентов представлены в виде приведенных математических индексов в таблице 2.

Таблица 2 – Математические индексы SeDeM для 4,4'-(пропандиаидо)дибензоата натрия и матрицеобразующих полимеров

Параметр	4,4'-(пропандиамидо)-дибензоат натрия	Methocel K4M	Kollidon SR	Kollicoat IR	Kollicoat MAE 100P	Eudragit L100-55	Protanal PH 6160
Насыпная плотность, г/мл	4,89	1,11	2,53	3,20	3,50	3,40	5,60
Насыпная плотность после уплотнения, г/мл	6,51	2,01	3,43	3,80	4,40	3,90	7,70
Внутренняя пористость	5,27	3,36	8,64	0,42	0,58	0,33	1,25

Параметр	4,4'-(пропандиамидо)-дибензоат натрия	Methocel K4M	Kollidon SR	Kollicoat IR	Kollicoat MAE 100P	Eudragit L100-55	Protanal PH 6160
Индекс Карра, %	5,00	8,96	5,25	3,20	4,00	2,33	5,33
Коэффициент прессуемости, Н	4,00	6,80	6,91	5,10	5,45	4,55	5,60
Число Хауснера	8,35	3,97	5,48	9,05	8,75	9,35	8,20
Угол естественного откоса, ^{0}	1,60	0,60	6,04	6,00	6,00	5,60	5,80
Сыпучесть, сек/100 г	0,00	1,75	5,25	6,07	8,96	7,60	10,00
Потеря в массе при высушивании, %	3,98	8,60	3,19	6,12	6,56	6,05	0,36
Гигроскопичность, %	6,60	9,98	2,85	4,90	5,17	4,99	2,50
Частицы размером менее 50 мкм, %	0,80	5,40	8,40	8,06	8,36	8,27	8,48
Гомогенность	2,00	5,50	5,50	5,00	5,00	10	7,50

Из полученных данных видно, что 4,4'-(пропандиамидо)дибензоат натрия не пригоден для технологии прямого прессования, т.к. обладает неудовлетворительной прессуемостью и не обладает сыпучестью, следовательно, в состав необходимо добавлять полимеры, которые удовлетворяют требованиям прессуемости и сыпучести.

ГПМЦ не обладает достаточной сыпучестью. Таким образом, в состав таблеток с ГПМЦ в качестве матрицеобразующего полимера необходимо добавить ВВ, улучшающее сыпучесть, например, лактозу SuperTab 30GR.

Полимеры Kollidon SR, Kollicoat IR, Koliikoat MAE 100P, Eudragit L100-55 и Protanal PH6160 обладают необходимыми показателями прессуемости и сыпучести.

На основании полученных данных производили расчет требуемых количеств вспомогательных веществ по формуле 1.

Из рассчитанных количеств субстанции и вспомогательных веществ получали таблеточные смеси путем прямого смешения. Также в составы таблеток добавляли опудривающий агент стеарат магния в количестве 1% и наполнитель лактозу SuperTab 30GR до получения необходимой массы.

Составы модельных таблеточных смесей с расчетными количествами АФИ и ВВ представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Составы модельных смесей

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

Для полученных смесей проводили оценку физико-химических и технологических свойств. Наиболее значимыми являлись параметры прессуемости и сыпучести, так как для субстанции необходимо было скорректировать именно эти свойства. Определение показателей проводили в соответствии с ГФ РФ XIV изд. [4].

Все полученные смеси обладали удовлетворительными технологическими показателями.

Из полученных смесей путем прямого прессования получали таблетки белого или почти белого цвета, двояковыпуклые, цилиндрической формы, массой 0,360 г, диаметром 10 мм.

Полученные таблетки анализировали на соответствие требованиям прочности на раздавливание, истираемости, однородности массы в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты изучения показателей качества таблеток

Показатель качества	Состав 1	Состав 2	Состав 3	Состав 4	Состав 5	Состав 6
Внешний вид	Белые, круглые, двояко-выпуклые	Белые, круглые, двояко-выпуклые	Белые, круглые, двояко-выпуклые	Белые, круглые, двояко-выпуклые	Белые, круглые, двояко-выпуклые	Белые, круглые, двояко-выпуклые
Диаметр, мм	10,0 ± 0,3	10,0 ± 0,3	10,0 ± 0,3	10,0 ± 0,3	10,0 ± 0,3	10,0 ± 0,3

Показатель качества	Состав 1	Состав 2	Состав 3	Состав 4	Состав 5	Состав 6
Однородность массы, мг	360 ± 3	360 ± 3	360 ± 3	360 ± 3	360 ± 3	360 ± 3
Прочность на раздавливание, Н	44 ± 3	40 ± 2	68 ± 4	68 ± 3	68 ± 3	91 ± 4
Истираемость, %	0,1	0,03	0,03	0,04	0,04	0,02

Все полученные таблетки удовлетворяли требованиям, предъявляемым ГФ РФ XIV изд. [4].

Также для полученных таблеток изучение кинетики высвобождения в соответствии с тестом «Растворение» по требованиям ГФ РФ XIV изд. ОФС 1.4.2.0014.15. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм [4].

В соответствии с необходимой кинетикой высвобождения, соответствующей кинетике нулевого порядка, были установлены следующие требования к тесту «Растворение»: через 2 часа в среду растворение должно перейти не более 25% действующего вещества, через 6 часов – не менее 50 и не более 70% вещества, через 12 часов – не менее 90 % вещества. Требование к высвобождению в среде 0,01М раствора хлористоводородной кислоты уставлено исходя из того, что препарат необходимо доставить в кишечник, место наибольшей абсорбции ДВ. Следовательно, система доставки должна быть устойчива в кислой среде.

В качестве среды растворения использовали: для первых 2 ч – 0,01М раствор кислоты хлористоводородной, для последующих 10 ч – фосфатный буферный раствор с pH 6,8. Количество перешедшего в среду растворения вещества определяли спектрофотометрически на приборе СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия). Результаты изучения представлены на рисунке 1.

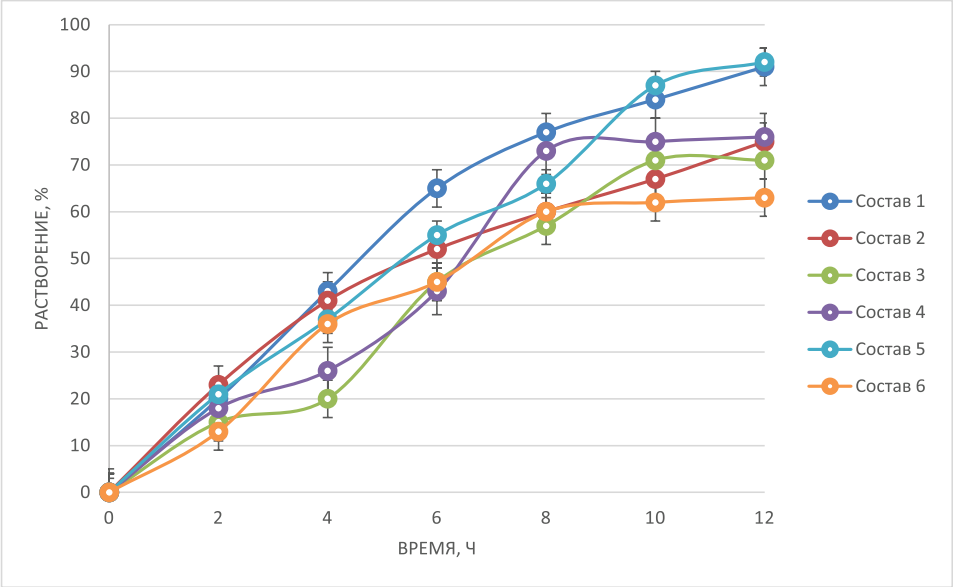


Рисунок 1. Кинетика высвобождения 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия из систем доставки с пролонгированным высвобождением

Как видно из полученных данных, составы 3, 4 и 6 в течение 12 часов высвобождают менее 90% ДВ в среду растворения, что может оказать значительное влияние на биодоступность препарата. Составы 1-2 высвобождают более 25 % вещества в среде 0,01М хлористоводородной кислоты, а значит, не являются устойчивыми к среде желудка.

Таким образом, уставленным требованиям по тесту «Растворение» соответствует состав 5, содержащий Eudragit L100-55 в качестве матрицеобразующего компонента.

В результате проведенной работы, был подобран и рассчитан состав системы доставки на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрии с пролонгированным высвобождением. В качестве матрицеобразующего компонента был выбран сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата Eudragit L100-55, в качестве наполнителя использована лактоза SuperTab 30GR, а в качестве опудривающего – магния стеарат. Установлено, что таблеточная сместь данного состава удовлетворяет всем необходимым требованиям. Таблетки данного состава также обладают необходимыми качественными свойствами, также установлено, что кинетика высвобождения АФИ из данной системы является наиболее оптимальной и приближенной к кинетике нулевого порядка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леонова МВ. Современные лекарственные формы и системы доставки лекарственных средств. Клиническая фармакология и терапия. 2009,18(2);62-6.

2. Радько СВ. Оценка влияния 4,4' – (пропандиамидо)дибензоата натрия на физическую работоспособность мышей к экспериментальным стеатозом печени. Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». 2017: 29-32.

3. Joper M. SeDem Diagram: a new expert system for the formulation of drug in solid form. Expert Systems for Human, Materials and Automation. 2011:18-34. DOI: 10.5772/16540.
4. Государственная Фармакопея РФ XIV издания. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php
5. European Pharmacopoeia 9th edition. Strabourg: Council of Europe, 2016.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF THE COMPOSITION OF THE DELIVERY SYSTEM OF SODIUM 4,4'-(PROPANEDIAMIDO)DIBENZOATE WITH PROLONGED RELEASE

Kotsur Y.M., 3d year postgraduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The aim of this work was development and optimize the composition of the delivery system in the form of matrix tablets based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate with prolonged release. To achieve this goal, the properties of the active pharmaceutical ingredient and excipients were studied. The development of the composition was carried out using the Sediment Delivery Model method of mathematical modeling. The effect of the matrix-forming polymer on the main characteristics of tablet mixtures, as well as on the rate of release of the active substance from the matrix tablet, has been studied. As a result of this work, the composition of the delivery system was selected based on sodium 4,4 '- (propanediamido)dibenzoate.

Key words: *delivery system, prolonged release, matrix tablets, release kinetics, dissolution test, technological properties.*

REFERENCES

1. Leonova MV. Modern dosage forms and drug delivery systems. Clinical pharmacology and therapy. 2009,18(2):62-6. (in Russ)
2. Radko SV. Evaluation of the effect of sodium 4,4'- (propanediamido)dibenzoate on the physical performance of mice with experimental liver steatosis. Collection of materials of the V All-Russian scientific-practical conference with international participation "Innovations in the health of the nation." 2017: 29-32. (in Russ)
3. Joper M. SeDem Diagram: a new expert system for the formulation of drug in solid form. Expert Systems for Human, Materials and Automation. 2011:18-34. DOI: 10.5772 / 16540.
4. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)
5. European Pharmacopoeia 9th edition. Strabourg: Council of Europe, 2016.

РАЗРАБОТКА СОСТАВА РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА С ДОБАВЛЕНИЕМ ЭКСТРАКТА СОЛОДКИ И АЛЛАНТОИНА

Кузнецова М.С., студ. 4 курса
Руководитель: **Пивоварова Н.С.**, к. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: kuznecova.mariya@pharminnotech.com

Представлены данные по экспериментальному выбору состава раневого покрытия для лечения ран и ожогов на основе альгинат-кальциевого гидрогеля с добавлением аллантоина и экстракта корней солодки, способствующих по своим свойствам улучшению и ускорению заживления повреждений.

Ключевые слова: *раневые покрытия, альгинат, аллантоин, солодка, лечение ран, ранозаживляющее действие.*

На данный момент существует большое разнообразие лекарственных препаратов, применяемых для лечения ран и ожогов, такие как мази, гели, губки, аэрозоли. Однако, наиболее перспективными являются раневые покрытия. Их применение позволяет существенно повысить эффективность лечения данных повреждений, поскольку они обеспечивают все необходимые условия для правильного и ускоренного заживления, удобны в использовании и значительно снижают частоту перевязок [1].

Общепринятой классификации раневых покрытий нет, однако их можно разделить по структурным характеристикам, например, гидроколлоидные, коллагеновые, альгинатные, пленочные и т.д. Для эксперимента выбраны альгинатные покрытия и используется альгинат кальция. Он относятся к натуральным гелеобразователям и представляет собой соли альгиновой кислоты, извлекаемой из бурой водоросли. Альгинаты физически безвредны, относительно кислотоустойчивы, обладают антибактериальным действием, что позволяет отказаться от введения консервантов, а также смягчающим и увлажняющим действием при нанесении на кожу [2]. Важно отметить, что применение альгината кальция обусловлено также полезными свойствами ионов кальция. Ионы кальция играют важную роль в заживлении поврежденных тканей – они помогают с образованием нерастворимого белка фибрина, который составляет основу тромба при свертывании крови.

Использование альгината кальция также обусловлено тем, что при использовании раневых покрытий на его основе не происходит повреждений заживающей поверхности при замене старого покрытия на новое: он не присыхает к ране, так как впитывает экссудат, выделяемый ранами и ожогами.

Введение пластификаторов, таких как глицерин, пропиленгликоль, ПЭО-400, позволяет улучшить эластичность покрытия, снизить трещинообразование, риск механических повреждений. В качестве пластификатора целесообразно использовать глицерин – простейший представитель трёхатомных спиртов, который представляет собой бесцветную вязкую жидкость без запаха и сладкую на вкус. Он хорошо растворим в воде в любых пропорциях, из-за чего удобен в использовании.

Аллантоин (2,5-диоксо-4-имидазолидинил) считается перспективным веществом при местном лечении ран и представляет собой бесцветные кристаллы без характерного запаха, легкорастворимые в горячей воде. Аллантоин стимулирует пролиферацию клеток, образование грануляционной ткани и эпителизацию поверхности кожи, регулирует воспалительный ответ в области повреждений и стимулирует синтез внеклеточного матрикса [3].

Глицирризиновая кислота, которая содержится в корнях солодки голой в пределах 6–15%, обладает широким спектром действия: противовоспалительным, антиаллергическим, гепатопротекторным, а также нейротропным [4].

Самыми важным для создания покрытия являются именно ранозаживляющие свойства солодки. Во-первых, она ускоряет процесс заживления ран на 39%. Во-вторых, ее использование повышает количество фибробластов, венул, артериол, жировых клеток, за счет чего происходит более активная регенерация в зоне рубцующейся ткани и заполнения дефекта коллагеновыми тканями [5].

Наиболее эффективная концентрация раствора экстракта солодки в геле для заживления ран определено в исследованиях Зорикова П.С. В ходе работы также замечено сокращение площади раневых дефектов на участке с неподвижной кожей проходило медленнее, чем на участках с подвижной кожей. Это связано со способностью препарата в форме геля более активно сближать края раневого дефекта [6]. Таким образом, одновременное использование гелеобразователя и солодки, по-видимому, повышает эффективность препарата.

Таким образом, сочетание выбранных компонентов должно способствовать заживлению повреждения кожных покровов в более короткие сроки и предотвращать рубцевание тканей.

Целью данной работы является разработка процессуальной схемы и состава раневого покрытия на основе альгината с добавлением экстракта солодки и аллантоина.

В эксперименте используются два вида альгината – в виде порошка (ООО Архангельский водорослевый комбинат, Россия) и хлопьев (ООО Архангельский водорослевый комбинат, Россия) в концентрации равной 2%. Структурирование альгината натрия проводится хлоридом кальция (АО Ленреактив, Россия) в количестве 0,15 г на 100 г раствора. В растворенный альгинат добавляется аллантоин (ООО ТК Аромашка, Швейцария)

Сухой экстракт солодки получали методом ультразвуковой экстракции с помощью ванны ультразвуковой ПСБ-1335-05 измельченных корней солодки голой (АО Красногорсклексредства, Россия) в течение 40 минут с последующим упариванием и сушкой при температуре 40 ± 1°С, 8 часов. Сухой экстракт измельчали в аптечной ступке до равномерного порошка.

Результат показал, что при использовании альгината в виде порошка набухание происходит быстрее в 1,5 раза. Поверхность пленки более ровная, чем при использовании хлопьевидного сырья.

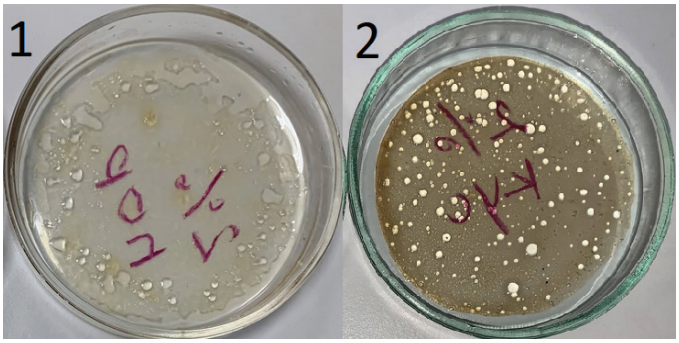


Рисунок 1. Пленки альгината в виде: 1 – порошка; 2 – хлопьями

При введении глицерина в количестве 5% после высушивания наблюдались трещины, поэтому концентрацию увеличили до 7 %, за счет чего пленка стала более пластична, на ней отсутствовали трещины и микротрещины, и при складывании пленки заломы со временем распрямляются. Дальнейшее повышение количества пластификатора нецелесообразно, т. к. значительно увеличивается время сушки плёнок.

При приготовлении сухого экстракта из 20 г сырья получили 3 г сухого экстракта. В эксперименте используется эффективная концентрация 2% [6].

Эффективная концентрация применения аллантоина в составе 0,5-2% от массы препарата. В исследовании Крана О.С. проводили эксперимент с разными концентрациями аллантоина в комбинации с двумя другими веществами – глюкозамином и эфирным маслом лаванды. В итоге наилучшие результаты показал гель, в составе которого 1,5% аллантоина, что свидетельствует о том, что именно такое содержание наиболее эффективно в создании лекарственных форм для лечения ран во II фазу раневого процесса [7].

При разработке процессуальной схемы (рис. 2) отражены все этапы разработки технологии раневого покрытия.

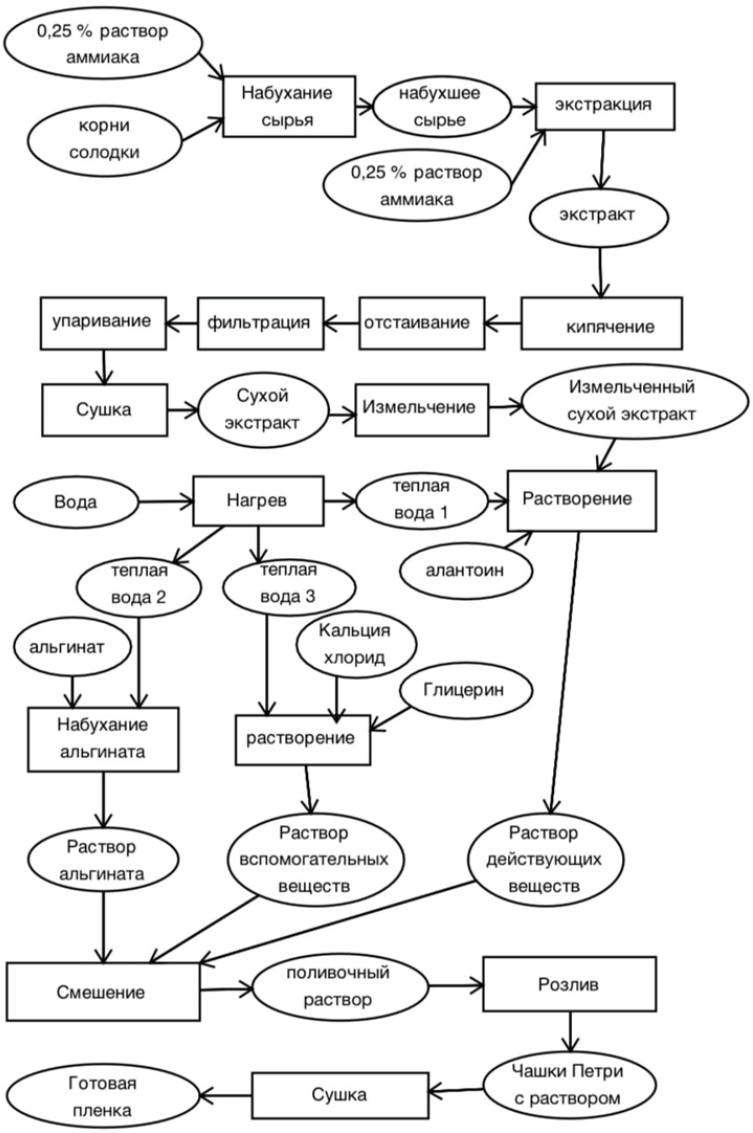


Рисунок 2. Процессуальная схема получения раневого покрытия

Компоненты и их концентрации выбраны с учетом данных, полученных при анализе подобных исследований. Это позволяет прогнозировать наличие у разрабатываемого средства способности ускорения процесса заживления, предотвращения формирования рубцов на поврежденной ткани.

В ходе работы изучен экспериментальный состав раневого покрытия, представленный в таблице 1.

Таблица 1 – Содержание компонентов на 100 г поливочного раствора препарата

Компонент	Содержание, г
Альгинат натрия	2
Хлорид кальция	0,15
Глицерин	7
Аллантоин	0,11
Экстракт солодки	0,14
Вода	До 100

На внешний вид полученные пленки однородные, пластичные, прозрачные, без видимых включений, микротрещины отсутствуют. Присутствует характерный запах солодки.

Таким образом, на первом этапе исследований обоснован выбор компонентов раневого покрытия. Затем выполнены поставленные цели, а именно: предложена подробная процессуальная схема и разработан состав на основе альгината концентрацией 2% по массе поливочного раствора с добавлением экстракта солодки и аллантоина, концентрации которых соответственно равны 2% и 1.5%, способствующих по своим свойствам улучшению и ускорению заживления повреждений.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение показателей качества разрабатываемого средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев ДЮ, Парамонов БА, Мухтарова АМ. Современные раневые покрытия. Часть I. Вестник хирургии имени И.И. Грекова. 2009;168(3):98-102.
2. Анурова МН, Бахрушина ЕО, Демина НБ. Обзор современных гелеобразователей в технологии лекарственных форм. Химико-фармацевтический журнал. Folium Publishing Company; 2015 Oct 2;49(9):39–46. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-9-39-46
3. Федосов ПА, Николаевский ВА, Бузлама АВ, Малахов ИП. К вопросу о ранозаживляющих свойствах геля, содержащего хитозан, таурин и аллантоин. V научно-практическая конференция «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине». 2017 Mar 17: 228-231.
4. Гранкина ВП, Савченко ТИ, Чанкина ОВ, и др. Характеристика микроэлементного состава солодки уральской Glycyrriza Uralensis Fisch. (Сем. Fabaceae). Сибирский экологический журнал. Сибирское отделение РАН; 2009;16(4):635-639.
5. Кулешов СМ, Кулешов РС. Ранозаживляющее действие биологически активных препаратов органического происхождения. Научный журнал КубГАУ. 2007; 26(2):330-338.
6. Зориков ПС, Короткова ИП. Ранозаживляющая активность геля солодки. Фармация: Научно-практический журнал. 2006;1:43-45.
7. Кран ОС, Зупанець ІА, Башура ОГ. Вивчення біологічної активності гелю для лікування ран у ІІ фазі ранового процесу. Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2012;5:450-457.

SUMMARY

COMPOSITION DEVELOPMENT OF THE WOUND COVERING BASED ON ALGINATE WITH ADDED LICORICE EXTRACT AND ALLANTOIN

Kuznecova M.S., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The data on experimental selection of the composition of the wound coating for treatment of wounds and burns based on alginate-calcium hydrogel with addition of allantoin and extract of lucorice roots, contributing to improved and hastened recovery due to their healing properties.

Key words: *wound dressings, alginate, allantoin, licorice, wound treatment, wound healing effect.*

REFERENCES

1. Andreyev DYU, Paramonov BA, Mukhtarova AM. Sovremennyye ranevyye pokrytiya. Chast' I. Vestnik khirurgii imeni I.I. Grekova. 2009;168(3):98-102. (in Russ)
2. Anurova MN, Bakhrushina YEO, Demina NB. Obzor sovremennykh geleobrazovateley v tekhnologii lekarstvennykh form. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. Folium Publishing Company; 2015 Oct 2;49(9):39–46. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-9-39-46. (in Russ)
3. Fedosov PA, Nikolayevskiy VA, Buzlama AV, Malakhov IP. K voprosu o ranozazhivlyayushchikh svoystvakh gelya, soderzhashchego khitozan, taurin i allantoin. V nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Sovremennyye aspekty ispol'zovaniya rastitel'nogo syr'ya i syr'ya prirodnogo proiskhozhdeniya v meditsine». 2017 Mar 17:228-231. (in Russ)
4. Grankina VP, Savchenko TI, Chankina OV, et al. Kharakteristika mikroelementnogo sostava solodki ural'skoy Glycyrriza Uralensis Fisch. (Sem. Fabaceae). Sibirskiy ekologicheskiy zhurnal. Sibirskoye otdeleniye RAN. 2009;16(4):635-639. (in Russ)
5. Kuleshov SM, Kuleshov RS. Ranozazhivlyayushcheye deystviye biologicheski aktivnykh preparatov organicheskogo proiskhozhdeniya. Nauchnyy zhurnal KubGAU. 2007; 26(2):330-338. (in Russ)
6. Zorikov PS, Korotkova IP. Ranozazhivlyayushchaya aktivnost' gelya solodki. Farmatsiya: Nauchno-prakticheskiy zhurnal. 2006;1:43-45. (in Russ)
7. Kran OS, Zupanets' IA, Bashura OG. Vivchennya bíologíchnoí aktivností gelyu dlya líkuvannya ran u ÍÍ fazí ranovogo protsesu. Problemi yekologíchnoí ta medichnoí genetiki í klíníchnoí ímunologíí. 2012;5:450-457. (in Ukr)

РИСК-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОДХОД К РАСШИРЕНИЮ ПРОДУКТОВОГО ПОРТФЕЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПАНИИ

Лобанова Е.Н., студ. 4 курса
Руководитель: **Басевич А.В.**, к. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: lobanova.elena@pharminnotech.com

Обоснован выбор перечня лекарственных препаратов, подлежащих трансферу на существующее фармацевтическое предприятие в рамках расширения производства, и описана методика расчета допустимых пределов воздействия на

здоровье с целью определения рисков при производстве различных лекарственных средств на одном участке при разработке валидации очистки.

Ключевые слова: *валидация, валидация очистки, анализ рисков, риск-ориентированный подход.*

В настоящее время фармацевтическая промышленность в России активно развивается. В целях импортозамещения и удовлетворения нужд населения в доступных и качественных лекарственных средствах, фирмы-производители расширяют свой продуктовый портфель за счет лекарственных препаратов (ЛП) с истекшим или подходящим к концу сроком патентной защиты. Внедрение новых, не производимых ранее на предприятии, препаратов на существующее производство неизбежно затрагивает вопросы валидации и квалификации, в том числе валидацию очистки.

Валидация очистки – важнейший компонент эффективной системы обеспечения качества и соответствия GMP на любом предприятии по производству лекарственных средств. Эта тема стала одной из наиболее развивающихся и обсуждаемых в фармацевтической отрасли в 2018–2019 годах. Такое внимание к вопросу связано и с тем, что в настоящий момент отрасль находится в ситуации перехода к валидации, основанной на оценке рисков и научных данных.

Из актуальности данной работы следует её цель: разработка методики расширения продуктового портфеля фармацевтической компании с учетом риск-ориентированного подхода к валидации очистки. Для этого необходимо выполнить ряд задач: проанализировать статистику заболеваемости населения и текущую ситуацию на рынке лекарственных средств с целью обосновать выбор вновь внедряемых на производство препаратов, отразить результаты выбора препаратов в виде таблицы, определить методику расчета допустимых пределов воздействия на здоровье (HBEL) с учетом требований нормативной документации и сделать заключение по работе.

Для того, чтобы принять решение о выпуске нового препарата, сперва необходимо проанализировать спрос на него. Спрос отражает потребность населения в лекарственных препаратах определенной категории с точки зрения заболеваемости и коммерческого успеха конкретных препаратов.

Статистика заболеваемости и смертности населения в динамике позволяет проследить текущие тенденции и выявить актуальные проблемы в области здравоохранения. Согласно данным статистического сборника «Здравоохранение России» Федеральной службы государственной статистики, основной причиной смерти населения, в том числе трудоспособного, являются болезни системы кровообращения. При этом количество умерших от всех причин с 2005 до 2018 года сократилось на 20,6%. Однако больше людей стало умирать от злокачественных заболеваний, что связано как с улучшением методов их диагностики (то есть ранее статистика не могла учитывать не диагностированные случаи), так и с дороговизной и сложностью их лечения. Пока не существует стопроцентно эффективных методов и препаратов лечения онкологии. Их разработка является задачей всего человечества [1].

Незначительно возросла смертность от болезней органов пищеварения, что может быть связано с ухудшением качества продуктов и нездоровым образом жизни людей, пренебрежением культуры питания. Значительно снизилась смертность от туберкулеза (всех форм) – на 73,3%. Это связано со значительными успехами в разработке эффективных ЛП для лечения туберкулеза и с вакцинацией населения.

Помимо статистики смертности важно рассмотреть заболеваемость населения. Согласно данным Росстата, динамика заболеваемости растет в течение последних 8-10 лет. Стоит отметить, что при росте заболеваемости, смертность населения падает. При этом некоторые заболевания начинают встречаться реже, например, некоторые инфекционные и паразитарные болезни, болезни глаза и его придаточного аппарата, болезни уха и сосцевидного отростка, болезни кожи и подкожной клетчатки. Это связано с тем, что при современном уровне здравоохранения и фармацевтических продуктов предотвращение и лечение этих болезней не предоставляет особой сложности.

Однако ввиду ухудшения экологии, качества продуктов, а также пищевого изобилия, значительно растет количество болезней эндокринной системы, нарушения обмена веществ, расстройства питания, болезней органов пищеварения. Серьезной проблемой является увеличение количества больных сахарным диабетом. В настоящее время для лечения этого заболевания уделяется большое внимание разработке препаратов и медицинских изделий. На территории России активно налаживается производство инсулина для удовлетворения нужд больного диабетом населения.

Также растет количество заболеваний болезнями системы кровообращения, однако статистика смертности от этих заболеваний падает, из чего можно сделать вывод об их своевременном и эффективном выявлении и лечении.

Самой серьезной проблемой остается увеличение количества новообразований у населения (в том числе ввиду их своевременного и эффективного выявления, что является положительным фактором возрастающей динамики). Как видно из статистики смертности, количество летальных исходов от новообразований также растет. Поэтому одной из главных задач всех фармацевтических компаний является разработка инновационных препаратов от рака. В России производители пользуются окончанием срока патентной защиты оригинальных препаратов и начинают их производство уже в качестве дженериков. Государство предпринимает попытки поддержки онкобольных, и в ходе реализации национального проекта «Здравоохранение» закупает онкопрепараты у фармацевтических компаний напрямую.

Также два раза в год – осенью и весной – население массово болеет ОРВИ, что влияет на спрос на фармацевтическом рынке, главным образом, в коммерческом сегменте.

Серьезной проблемой в настоящее время является распространение вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в России. По данным Объединённой программы Организации объединенных наций (ООН) по ВИЧ/СПИД (UNAIDS), с учётом этих показателей Россия занимает третье место в мире по распространённости ВИЧ-инфекции после ЮАР и Нигерии на 2019 год. Это требует принятия государством мер по предотвращению распространения ВИЧ и эффективного лечения уже заболевших граждан (что также является мерой предупреждения болезни, поскольку человек, принимающий терапию, не способен заразить другого человека).

Таким образом, статистика заболеваемости и смертности населения помогает выявить наиболее важные проблемы здравоохранения и предугадать спрос на различные группы препаратов, как в коммерческом сегменте, так и в госпитальном, в том числе сегмент госзакупок, чем может руководствоваться предприятие, расширяющее свой портфель препаратов.

Также необходимо проанализировать ситуацию на рынке – изучить объемы продаж лекарственных препаратов и топовые позиции. Стоит упомянуть, что фармацевтический рынок состоит из госпитального и коммерческого сегмента. В свою очередь, наличие преференций для отечественных производителей при государственных закупках делает производство препаратов, закупаемых за счет бюджетных средств, привлекательным для фармацевтических компаний, поскольку они могут рассчитывать на стопроцентную реализацию своего продукта в больших объемах, а соответственно, получение большой прибыли.

В данной работе рассматривается расширение портфеля за счет твердых лекарственных форм (ТЛФ) ввиду их популярности и универсальности. Согласно данным маркетингового агентства DSM Group в 2019 году в топ-30 среди ТЛФ в сегменте госпитальных заупкок и в рамках льготного лекарственного обеспечения в денежном объеме лидируют среди дженериков следующие международные непатентованные наименования (МНН): абиратерон (цитостатик), клозапин (нейролептик), эверолимус (иммунодепрессант), этравирин (антиретровирусный, патент заканчивается в 2021), капецитабин (противоопухолевый, антиметаболит), пиразинамид (противотуберкулезный), спиронолактон (диуретик). Стоит отметить, что в 2020 году у Novartis заканчивается срок патента на эверолимус. Его включение в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) с 2020 года – шанс успеть расширить рынок и единолично поставлять препарат до выхода дженериков.

В розничном сегменте в 2019 году в топ-30 среди ТЛФ в денежном объеме лидируют среди дженериков следующие МНН: спиронолактон (диуретик), нимесулид (нестероидное противовоспалительное средство (НПВС)), небиволол (бета1-адреноблокатор селективный от артериальной гипертензии), дротаверин (спазмолитик), азитромицин (антибиотик группы макролидов – азалид), тримебутин (спазмолитик), амоксициллин (антибиотик группы пенициллинов широкого спектра действия, разрушающийся пенициллиназой), доксициклин (антибиотик группы тетрациклина). Также были рассмотрены топовые позиции препаратов в рамках анатомо-терапевтическо-химической классификации (АТХ) по группам самых распространенных заболеваний [2].

Суммируя данные о заболеваемости и данные маркетинговых исследований, можно составить перечень препаратов, рекомендуемых к производству. Перечень выбранных лекарственных препаратов с их характеристиками представлен в виде таблицы.

Таблица – Перечень выбранных лекарственных препаратов

Торговое наименование ЛП	МНН	Дозировка	Лекарственная форма	Краткое описание технологии
Абиратерон НВ	Абиратерон	250 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Азалептин	Клозапин	100 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Амбробене	Амброксол	30 мг	Таблетки	Прямое прессование
Амлодипин	Амлодипин	10 мг (13,86 мг)	Таблетки	Сухое гранулирование
Афинитор	Эверолимус	5 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Гутталакс	Натрия пикосульфат	5 мг (5,187 мг)	Таблетки	Сухое гранулирование
Драмина	Дименгидринат	50 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Капецитабин	Капецитабин	500 мг	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	Влажное гранулирование
Капотен	Каптоприл	25 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Кларитин	Лоратадин	10 мг	Таблетки	Прямое прессование
Небилет	Небиволол	5 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Найз	Нимесулид	100 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Но-шпа	Дротаверин	40 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Спиронолактон	Спиронолактон	25 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Тримедат	Тримебутин	200 мг	Таблетки	Влажное гранулирование
Юнидокс Солютаб	Доксициклин	100 мг	Таблетки диспергируемые	Прямое прессование

На этом этапе следует оценить риски, сопровождающиеся расширением производства. Для этого необходимо обратиться к нормативному документу Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) «Руководство по установлению допустимых пределов воздействия на здоровье (HBEL) с целью определения рисков при производстве различных лекарственных средств на одном участке». Данный документ вступил в силу в 2015 году, и EMA, безусловно, было лидером в разработке риск-ориентированных принципов валидации очистки для предотвращения перекрестного загрязнения на общих производственных объектах. Такой подход к оценке риска перекрестной контаминации базируется на оценке токсикологических свойств активных фармацевтических субстанций (АФС).

Предлагаемая в этом документе процедура для определения пределов воздействия остаточного активного вещества на основе здоровья основана на методе определения, так называемого, допустимого дневного воздействия (PDE). PDE

представляет собой дозу АФС, которая вряд ли вызовет побочный эффект, при условии, если человек подвергается воздействию этой дозы или ниже этой дозы каждый день в течение всей жизни [3].

Определение PDE включает идентификацию опасностей путем анализа всех соответствующих данных, идентификацию «критических эффектов», определение дозы, не приводящей к развитию нежелательного эффекта (NOAEL), и использование нескольких поправочных коэффициентов для учета различных неопределенностей.

$$PDE = \frac{NOAEL \cdot \text{Вес}}{F1 \cdot F2 \cdot F3 \cdot F4 \cdot F5} \quad (1)$$

где: NOAEL – доза, не приводящая к развитию нежелательного эффекта (используются данные изучения на животных или клинические данные на людях для выявления из опасного влияния), мг/кг/день;

Вес – вес тела человека (стандартная масса тела 50 кг);

F1, F2, F3, F4, F5 – корректирующие коэффициенты:

F1 – фактор (значение от 2 до 12) оценивающий экстраполяцию между видами;

F2 – фактор, оценивающий вариабельность между видами, равен 10;

F3 – фактор, оценивающий повторную токсическую дозу в течении короткого промежутка времени (до 4 недель), равен 10;

F4 – фактор, (значение от 1 до 10) применяющийся в случае экстремальной токсичности;

F5 – переменный коэффициент, который может быть применим, если уровень отсутствия эффекта (LOEL) не установлен, может принимать значение от 1 до 10.

HBEL должны быть установлены для всех лекарственных средств. Токсикологические или фармакологические данные, на которые опирается расчет HBEL, требуют периодической переоценки на протяжении всего жизненного цикла продукта. HBEL следует использовать в процессе управления рисками для качества, чтобы определить, какие меры контроля необходимо внедрить, и оценить, являются ли существующие организационные и технические меры контроля адекватными или их нужно изменить. Процесс управления рисками для качества должен осуществляться перспективно в случае внедрения нового продукта, чтобы определить, какие меры контроля требуются. Ожидается, что для продуктов, которые представляют более высокий потенциальный вред для пациентов, потребуются более сложные организационные и технические меры контроля [4].

Для того, чтобы применить данные HBEL на практике в процессе валидации очистки, следует обратиться к Техническому отчету Ассоциации парентеральных препаратов (PDA) № 29 для активных веществ: «Что следует учитывать при валидации очистки». В этом документе подробно описана методика расчета показателей, необходимых для оценки рисков при валидации очистки и дальнейшей разработки аналитических методик и методики очистки [5].

На основании PDE для оценки рисков перекрестной контаминации рассчитывают допустимый уровень остатка (ARL). ARL представляет собой приемлемый уровень (т.е. концентрация) целевого остатка в продукте, производимом впоследствии.

$$ARL = \frac{ADE}{LDD} \quad (2)$$

где: ARL – приемлемый уровень остатка в следующем лекарственном препарате;

ADE – допустимое дневное воздействие остатка (синоним PDE);

LDD – наибольшая суточная доза следующего лекарственного препарата, производимого на том же оборудовании.

Есть и другие способы расчета ARL: на основе активной дозы препарата или с применением смертельной (летальной) дозы для 50% исследуемых животных, с учетом способа применения (LD50). Последний способ не рекомендуется Европейским агентством по лекарственным средствам в качестве адекватной отправной точки для определения HBEL.

После определения ARL можно рассчитать максимально допустимый перенос (MAC или MACO). MAC – это общее количество целевого остатка, допустимое в серии следующего производимого продукта. Он рассчитывается путем умножения ARL на минимальный размер серии следующего продукта.

$$MAC = ARL \cdot MBS \quad (3)$$

где: MAC – максимально допустимый перенос;

ARL – приемлемый уровень остатка в следующем лекарственном препарате;

MBS – минимальный размер серии следующего продукта.

Поскольку MAC – это общее количество, разрешенное в следующем произведенном продукте, это также общее количество, разрешенное на поверхностях оборудования (то есть разделенное между очищенным оборудованием и следующим произведенным продуктом).

Как только MAC определен, можно рассчитать предел площади поверхности (SAL) путем деления MAC на площадь поверхности оборудования, имеющей непосредственный контакт с продуктом. Этот показатель применяется для дальнейшего определения предела остаточного загрязнения с учетом метода отбора проб.

$$SAL = \frac{MAC}{SSA} \quad (4)$$

где: SAL – предел площади поверхности;

MAC – максимально допустимый перенос;

SSA – площадь поверхности оборудования, имеющая непосредственный контакт с продуктом.

Получение предела остаточного загрязнения необходимо с целью доказательства эффективности проведенной очистки, поскольку при отборе проб аналитиком с поверхности оборудования методом смыва 10х10 см (площадь смыва 100 см2), найденное им количество загрязнений на 1 см2 не должно превышать вычисленного значения предела остаточных загрязнений.

$$\text{Предел на смыв} = SAL \cdot \text{Площадь смыва} \quad (5)$$

где: SAL – предел площади поверхности;

Площадь смыва – 100 см^2.

Для оригинальных препаратов пределы воздействия на здоровье должны определяться лицом, имеющим соответствующие знания и опыт в токсикологии/фармакологии, ознакомленным с фармацевтическими препаратами, а также имеющим опыт определения пределов воздействия на здоровье, таких как предел воздействия (OEL) или допустимая суточная (дневная) доза (PDE). Данные, необходимые для оценки риска перекрестной контаминации, базирующийся на токсикологических свойствах действующих веществ препаратов-дженериков, можно найти в отчетах о клинических исследованиях и фармакологических испытаниях на сайте Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), которые они обязаны предоставлять.

В настоящий момент всё больше регулирующих органов начинает ссылаться на HBEL, в том числе Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ).

В данной работе был разработан методический подход по расширению продуктового портфеля фармацевтической компании с учетом риск-ориентированного подхода к валидации очистки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Здравоохранение в России. 2019: Стат.сб. Росстат. М., 2019. Доступно по: https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Zdravoohran-2019.pdf [Accessed 19 Fb, 2021]

2. DSM Group: маркетинговые исследования фармацевтического рынка. Доступно по: https://dsm.ru/ [Accessed 19 Fb, 2021]

3. EMA/CHMP/CVMP/SWP/169430/2012 Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medical products in shared facilities. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-setting-health-based-exposure-limits-use-risk-identification-manufacture-different_en.pdf [Accessed 19 Fb, 2021]

4. EMA/CHMP/CVMP/SWP/169430/2012 Questions and answers on implementation of risk-based prevention of cross-contamination in production and 'Guideline on setting health-based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities'. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/questions-answers-implementation-risk-based-prevention-cross-contamination-production-guideline_en.pdf [Accessed 19 Fb, 2021]

5. Parenteral Drug Association. Points to Consider for Cleaning Validation, 2012. Technical Report No 29.

SUMMARY

RISK-BASED APPROACH TO EXPANDING THE PRODUCT PORTFOLIO OF A PHARMACEUTICAL COMPANY

Lobanova E.N., 4rd year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The choice and explanation of choice of the list of drugs to be transferred to an existing pharmaceutical company as part of the expansion of production. The description of a method for calculating the health based exposure limits in order to determine the risks of manufactured in the same equipment drugs for developing a cleaning validation.

Key words: *validation, cleaning validation, risk analysis, risk-based.*

REFERENCES

1. Zdravoohranenie v Rossii. 2019: Stat.sb./Rosstat. Moscow, 2019. Available at: https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Zdravoohran-2019.pdf [Accessed 19 Fb, 2021]

2. DSM Group: marketingovye issledovaniya farmacevticheskogo rynka. Available at: https://dsm.ru/ [Accessed 19 Fb, 2021]

3. EMA/CHMP/CVMP/SWP/169430/2012 Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medical products in shared facilities. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-setting-health-based-exposure-limits-use-risk-identification-manufacture-different_en.pdf [Accessed 19 Fb, 2021]

4. EMA/CHMP/CVMP/SWP/169430/2012 Questions and answers on implementation of risk-based prevention of cross-contamination in production and 'Guideline on setting health-based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities'. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/questions-answers-implementation-risk-based-prevention-cross-contamination-production-guideline_en.pdf [Accessed 19 Fb, 2021]

5. Parenteral Drug Association. Points to Consider for Cleaning Validation, 2012. Technical Report No 29.

АНАЛИЗ ВЕРОЯТНОСТИ ПОЯВЛЕНИЯ ОТКЛОНЕНИЙ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КРИТИЧЕСКИХ СТАДИЙ ПРОИЗВОДСТВА ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Мельник М.В., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Марченко А.Л.**, канд.фарм.н.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул., проф. Попова, д.14, Российская Федерация
E-mail: Maryana.Melnik@pharminnotech.com

Выявление наиболее значимых этапов производства твердых лекарственных форм, и оценка интеграции риск-ориентированного подхода в систему качества на ведущих фармацевтических предприятиях.

Ключевые слова: *твердые лекарственные формы, риски, качество, критические стадии.*

Управление рисками – процесс идентификации и анализа рисков, с последующим принятием решений по корректирующим и предупреждающим действиям, направленным на минимизацию рисковых событий, снижение вероятности возникновения неблагоприятного результата, минимизацию отрицательных последствий и возможных потерь [1, 2].

Управление рисками требуется в тех случаях, когда появляется потребность в принятии сложных решений. Оценивать риски необходимо в различных ситуациях, например, на стадиях разработки продукции, при изучении целесообразности внесения изменений, при расследовании отклонений, для организации рабочего пространства или при принятии решения о возможности совмещения схемы производства разных препаратов и т.п. По сути, там, где есть проблема выбора из нескольких вариантов, и там, где нет четких, однозначных, нормативных требований. Технология управления рисками необходима для принятия решений, не имеющих четкого норматива, т.е. в ситуации, где есть неопределенность и неуверенность [3].

Отсутствие процесса управления рисками на фармацевтических предприятиях считается проблемой. В настоящее время она является достаточно значимой и актуальной, из-за нестабильной экономической ситуации в стране и мире, а также в условиях конкуренции, возникновение потерь вследствие наступления рисковых ситуаций просто недопустимо.

Риск-менеджмент – это совокупность всех видов работ, связанных с планированием, реализацией, контролем и улучшением деятельности по управлению риском. Управление рисками для качества и подходы, основанные на оценке рисков, могут использоваться для выполнения разных задач.

На сегодняшний день отечественные фармацевтические производители пришли к пониманию того, что риск-менеджмент является неотъемлемой частью всего бизнеса в целом, независимо от размера компании и от ее оборотов.

Обеспечение качества на фармацевтическом предприятии невозможно без использования управления рисками для качества, данное утверждение подтверждается требованиями GMP. Одним из путей совершенствования системы менеджмента качества (СМК) является внедрение риск-ориентированного подхода. Принятие новой версии ГОСТ Р ИСО 9001-2015 увеличило скорость развития системы управления рисками, т.к. в нормативе оно выделяется значимым элементом СМК и риск-ориентированное мышление преобразуется в базу СМК.

Риск-ориентированное мышление – достаточно новое понятие, которое трактуется как необходимость качественного и количественного рассмотрения потенциальных рисков в процессе управления СМК. Новые требования стандарта обязуют предприятия проводить анализ организационного окружения.

Вместе с тем, организация может применять более расширенный подход к риск-менеджменту, чем это требуется в международном стандарте ГОСТ Р ИСО 9001-2015 в соответствии с конкретной ситуацией, использовать многие другие руководящие документы, содержащие указания по риск-менеджменту [4].

В рамках данной работы на первом этапе была составлена анкета, которая позволила бы установить наиболее значимые этапы производства твердых лекарственных форм, а также оценить, как происходит процесс интегрирования риск-ориентированного подхода в систему качества на ведущих фармацевтических предприятиях [5].

Анкетирование проводилось среди специалистов фармацевтических предприятий, имеющих в своем продуктовом портфеле лекарственные препарата в виде наиболее распространенных твердых лекарственных форм: таблетки, капсулы.

В анкете представлены общие вопросы для респондентов, которые позволяют оценить основное направление работы фармпредприятия, частоту применения риск-ориентированного подхода респондентом в своей работе. В качестве основной информации участникам опроса необходимо было указать для каждой стадии технологии твердых лекарственных форм вероятность появления отклонения в баллах от 1 до 10 (1 балл – низкая вероятность, 10 баллов – очень высокая вероятность), связанного с перечисленными факторами (оборудование, сырье, материалы, персонал, методы/технологии, внешние факторы). А также отметить значимость указанных факторов для каждой стадии от 1 до 5 баллов (1 – практически не имеет значения, 5 – высокое значение).

Для обеспечения широкого охвата при анализе возможностей риск-ориентированного подхода данные анкеты были предложены представителям разных отделов: отдел контроля качества, отдел обеспечения качества, производственный отдел и отдел разработки.

На втором этапе работы был проведен анализ полученных данных.

Исходя из результатов анкетирования сотрудников отдела обеспечения качества разных фармацевтических компаний были отмечены общие моменты.

Наиболее критичными процессами производства являются грануляция или смешение и таблетирование или капсулирование. На данных стадиях риск появления отклонений самый высокий (8-10 баллов). При этом основными влияющими факторами выделено оборудование, сырье (действующее вещество и вспомогательные вещества) и технология.

На стадии капсулирования риск появления отклонений также возможен при неправильном расчете соотношения дозировки (количества смеси) и объема капсулы. Также необходимо учитывать оборудование и его возможности. Капсульные машины различных типов дают различные пути решения возникающих отклонений.

На стадии нанесения покрытия очень важны материалы (вспомогательные вещества смеси для покрытия, состав покрытия) и персонал. Так как он регулирует скорость данного процесса, подбирает температуру и обязан внимательно следить за внешним видом продукта постоянно.

На стадии упаковки персонал также играет большую роль, так как именно он настраивает номер серии и всю прочую информацию, наносимые на упаковку. Это помимо настройки скорости упаковки, температуры блистерования и т.д.

А на основании данных, полученных из опроса, заполняемых сотрудниками производства, были отмечены следующие моменты:

Выявление отклонений наиболее вероятно на стадиях грануляции, таблетирования, нанесение покрытия, капсулирования и упаковки.

На стадии грануляции основными влияющими факторами отмечены методы и технологии. Так как от них напрямую зависит качество готового продукта, а также фармакокинетические и фармакодинамические свойства.

На стадии таблетирования и капсулирования оборудование играет значимую роль. От подбора его зависят пути решения появляющихся отклонений.

На стадии упаковки важно оборудование и материалы, перепутывание которых должно быть предотвращено непосредственно персоналом, который является также основным влияющим фактором.

Анкетирование в разных отделах фармацевтической компании позволило составить более точную матрицу результатов на основе практического и теоретического опыта сотрудников.

Таким образом, разработана анкета для экспертов – специалистов фармацевтических предприятий, которая позволила установить наиболее значимые этапы производства твердых лекарственных форм, а также оценить, как происходит процесс интегрирования риск-ориентированного подхода в систему качества на ведущих фармацевтических предприятиях.

Анализ анкет показал, что в настоящее время в ведущих предприятиях страны активно ведется внедрение и закрепление риск-ориентированного подхода. Это способствует переходу системы качества на новый уровень. Следующий этап работы будет посвящен изучению риск ориентированного подхода с точки зрения использования оборудования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Правила надлежащей производственной практики ЕС, Раздел 1 GMP EU (1).

2. Quality Risk Management ICH Q9. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005.

3. А. Хамид Моллах, Майк Лонг, Гарольд С. Бэйсмен. Управление рисками в фармацевтическом производстве. 1-е изд.: пер. с англ. М.: Группа компаний ВИАЛЕК, 2014.

4. Ивашина ММ, Нацыпаева ЕА, Попова ЛФ. Риск-ориентированный подход как направление совершенствования системы менеджмента качества промышленных предприятий. Экономический журнал. 2018: 26-31.

5. Мельник МВ. Основные критические точки в технологии твердых лекарственных форм. Молодая фармация. Сборник. 2020: 570.

SUMMARY

ANALYSIS OF THE PROBABILITY OF THE APPEARANCE OF DEFECTS DURING THE CRITICAL STAGES OF PRODUCTION OF SOLID MEDICINAL FORMS

Melnik M.V., Master of the 2st year of study
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Identification of the most significant stages in the production of solid dosage forms, and assessment of the integration of a risk-based approach into the quality system at leading pharmaceutical companies.

Key words: *solid dosage forms, risks, quality, critical stages.*

REFERENCES

1. EU Good Manufacturing Practice Rules, Section 1 of GMP EU (1). (in Russ)

2. Quality Risk Management ICH Q9. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005.

3. Hamid Mollah A, Long M, Baseman. HS. Risk management in pharmaceutical production. 1st ed.: trans. from English. Moscow: VIALEK Group of Companies, 2014. (in Russ)

4. Ivashina MM, Natsypaeva EA, Popova LF. Risk-oriented approach as a direction of improving the quality management system of industrial enterprises. Economic Journal. 2018:26-31. (in Russ)

5. Melnik MV. The main critical points in the technology of solid dosage forms. Young Pharmacy. 2020:570. (in Russ)

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОДИНАМИКИ СУШИЛКИ КИПЯЩЕГО СЛОЯ С ИНЕРТНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

Мозговой И.Р., студ. 3 курса, **Фридман Н.А.**, магистрант 2 года
Руководитель: **Маркова А.В.,** к.т.н., доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: igor.mozgovoj@spcpu.ru

Для сушилки кипящего слоя с инертными носителями рассчитаны рабочие скорости ожижающего агента в зависимости от размера инертных тел. Целью настоящей работы является исследование гидродинамических характеристик аппарата кипящего слоя с инертными носителями для сушки левофлоксацина. Для различных уносимых фракций высушиваемого материала определено отношение максимального диаметра конусной части к диаметру цилиндрической части.

Ключевые слова: *сушка с инертными носителями, сушилка кипящего слоя, критическая скорость, скорость уноса.*

При сушке дисперсных материалов с высоким содержанием влаги образуются комки, порой в сушильных шкафах агломераты могут достигать больших размеров. При сушке в условиях активного гидродинамического режима (кипящий слой) образование агломератов может происходить в дозирующем устройстве, в местах локального сжатия материала происходит его уплотнение и в сушильную камеру поступает уже образовавшийся агломерат. Удаление поверхностной влаги приводит к упрочнению этого агломерата. Соударение комков друг с другом и со стенками аппарата может приводить либо к разрушению агломерата, либо к его упрочнению. Удаление влаги из крупных комков требует много времени, попадая в готовый продукт, они могут оказаться не досушенными. Кроме того, требуется дополнительная операция – измельчение.

В качестве примера фармацевтической субстанции с высоким содержанием влаги, которая требует дальнейшей сушки, можно привести левофлоксацин. После фильтрования от маточного раствора он содержит до 30% этилового спирта.

Одним из способов получения высушенного продукта без комков является сушка в кипящем слое с инертными носителями [1]. В качестве инертного слоя может применяться стеклянные шарики, гранулы глинозема, фракционированный кварц, песок, гранулы фторопласта и некоторые другие материалы [2]. При соударении с инертными частицами происходит разрушение агломератов.

Материалы и методы

Исследование гидродинамических характеристик однородного (с постоянной порозностью) псевдоожиженного слоя проводилось теоретическими методами, используя формулы Тодеса.

Критическая скорость $w_{кр}$ определялась из критерия $\mathrm{Re}_{кр}$, рассчитываемого по формуле:

$$\mathrm{Re}_{кр} = \frac{Ar}{1400 + 5{,}22\sqrt{Ar}}. \quad (1)$$

Скорость уноса $w_{ун}$ определялась из критерия $\mathrm{Re}_{у}$, рассчитываемого по формуле:

$$\mathrm{Re}_{у} = \frac{Ar}{18 + 0{,}575\sqrt{Ar}}. \quad (2)$$

Зависимость критерия Рейнольдса от порозности псевдоожиженного слоя:

$$\mathrm{Re} = \frac{Ar\ \varepsilon^{4,75}}{18 + 0{,}61\sqrt{Ar\ \varepsilon^{4,75}}}. \quad (3)$$

Расчеты проводились для инертного носителя и для различных фракций высушиваемого материала.

При выборе инертного материала учитывались требования, предъявляемые в фармацевтической промышленности. Материал должен обладать прочностью к ударным и сдвиговым усилиям во избежание попадания сколов инертного тела в готовый продукт. Подходящими материалами являются кварцевое стекло (SiO_2) и фторопласт – 4 (политетрафторэтилен). Плотность обоих инертных тел одинакова и равна 2200 кг/м^3.

Сушка происходит в замкнутом цикле. При сушке удаляется этанол. Сушильным агентом является азот. Средняя температура парогазовой смеси в сушилке равна 58,7°С. Среднее содержание паров этанола в сушилке 0,0377 кг паров/кг азота. Физические свойства парогазовой смеси (ожижающего агента) рассчитывались для данной температуры и состава.

Плотность высушенного материала равна 1200 кг/м^3. Физические свойства парогазовой смеси (ожижающего агента) те же самые.

При выборе конструкции сушилки предполагалось, что сушилка состоит из цилиндрической части, в которой происходит дробление агломератов инертными носителями и расширяющейся к верху конической части, в которой происходит досушивание частиц материала. Высушенные частицы выносятся из аппарата, причем крупная фракция собирается в циклоне и является готовым продуктом, мелкая фракция уносится в рукавный фильтр. Мелкая фракция может возвращаться в производственный цикл и использоваться в качестве затравки в процессе кристаллизации.

В таблице 1 представлены результаты расчета по формулам (1) – (3). При увеличении размера инертных частиц и порозности слоя фиктивная скорость парогазовой смеси увеличивается. При заданной производительности увеличение скорости приводит к уменьшению цилиндрической части аппарата. Можно ожидать, что с увеличением порозности и, соответственно, скорости потока сила соударения частиц увеличивается, и разрушение агломератов будет происходить более интенсивно. Однако при высоких скоростях ожиающего агента происходит вынос частиц высушиваемого материала из цилиндрической части сушилки.

Таблица 1 – Зависимость скорости ожижающего агента от порозности слоя для инертного носителя

Диаметр инертного носителя, мм	Критическая скорость, м/с	Фиктивная скорость при порозности, м/с			Скорость уноса, м/с
		0,5	0,6	0,7	
6	1,99	3,37	5,28	7,68	18,11
8	2,35	4,09	6,15	8,92	21,0
10	2,67	4,45	7,15	10,01	23,5
12	2,94	4,9	7,6	10,9	25,7
14	3,19	5,3	8,23	11,9	27,8

В таблице 2 представлены рассчитанные размеры уносимых частиц при рабочих скоростях, представленных в таблице 1. При больших скоростях, соответствующих большей порозности и большему диаметру инертных частиц, из слоя будут выноситься агломераты до 5 мм.

Таблица 2 – Зависимость диаметра частиц высушиваемого материала, уносимых из зоны с инертными носителями

Диаметр носителя, мм	Диаметр уносимых частиц материала, при порозности, мм		
	0,5	0,6	0,7
6	0,648	1,173	2,150
8	0,786	1,490	2,815
10	0,920	1,800	3,479
12	1,052	2,115	4,146
14	1,183	2,430	4,813

Считая, что из цилиндрической части аппарата не должны удаляться частицы материала более определенного размера (например, 2 мм) порозность слоя не должна превышать 0,6, а диаметр инертных частиц 12 мм. Вынесенные из цилиндрической части частицы материала попадают в коническую часть сушилки, где происходит их досушивание. Высушенный материал, имеющий более низкую плотность, уносятся в циклон.

В таблице 3 представлены скорости уноса различных фракций высушенного материала. Задавая максимальный размер выносимой фракции, можно определить диаметр широкой части конуса.

Таблица 3 – Зависимость скорости уноса для отдельных фракций высушиваемого материала

Диаметр фракции, мкм	100	200	300	400	500
Скорость уноса, м/с	0,283	0,782	1,513	2,160	2,66

Отношение максимального $D_{\max}$ диаметра конусной части к диаметру цилиндрической части $D_ц$ можно рассчитать по уравнению:

$$\delta = \frac{D_{\max}}{D_ц} = \sqrt{\frac{w_ц}{w_{ун}}}, \quad (4)$$

где $w_ц$ – рабочая скорость парогазовой смеси в цилиндрической части аппарата, $w_{ун}$ – скорость уноса частиц максимально допускаемого размера.

На рисунке показаны результаты расчета по уравнению (4) для порозности слоя инертных частиц, равной 0,6. Скорость уноса бралась из таблицы 3.

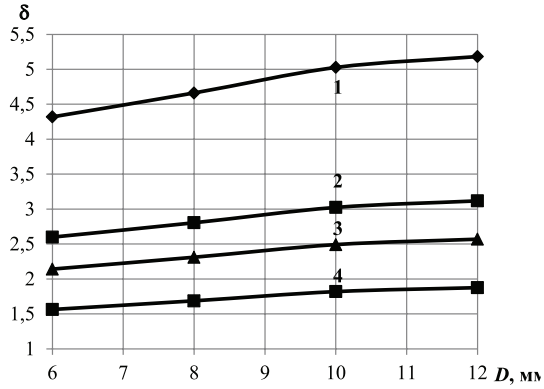


Рисунок 1. Зависимость величины от размера инертных частиц для максимальной уносимой фракции: 1 – 100 мкм, 2 – 200 мкм, 3 – 300 мкм, 4 – 400 мкм

С увеличением размера инертных частиц величина δ увеличивается хотя и не очень сильно, а с уменьшением размера выносимой фракции δ увеличивается значительно. Большие значения δ свидетельствуют о том, что цилиндроконический аппарат можно заменить на конический, при этом из аппарата будет выноситься только мелкая фракция, а основной высушенный продукт можно забирать из верхней части конуса.

На основании проведенных расчетов показана принципиальная возможность сушки материалов с высокой влажностью, образующих комки, в сушилках кипящего слоя с инертным носителем. Установлено, что в аппарате цилиндроконической формы может происходить разрушение агломератов в цилиндрической части и досушивание субстанции в конической части. Рассчитанные значения рабочих скоростей парогазовой смеси и соотношения геометрических размеров конусной части, позволяют использовать полученные результаты для выбора подходящего размера инертных тел и конфигурации сушилки для конкретного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муштаев ВИ, Ульянов ВМ. Сушка дисперсных материалов. М.: Химия, 1988.
2. Нестеров АВ. Сушка. Санкт Петербург (Процессы и аппараты химической технологии). 2020.
3. Воробьева ЮВ. Разработка экспериментальной установки для исследования процесса сушки во взвешенном состоянии на инертных телах. Тр. молод. ученых Тамб. гос. техн. ун-та. 2007;20:21–25.

SUMMARY

STUDY OF THE HYDRODYNAMICS OF A FLUIDIZED-BED DRIER WITH INERT SUPPORT

Mozgovoy I.P., 3th year student, **Fridman N.A.,** 2nd year master's student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

For a fluidized-bed dryer with inert support the operating speeds of the liquefying agent depending on the size of inert bodies are calculated. For different carried away fractions of the dried material, the ratio of the maximum diameter of the cone part to the diameter of the cylindrical part is determined.

Key words: *drying with inert support, fluidized-bed dryer, critical rate, removal rate.*

REFERENCES

1. Mushtaev VI, Ul'janov VM. Sushka dispersnyh materialov. Moscow: «Himija», 1988. (in Russ)
2. Nesterov AV. Sushka. Sankt Peterburg (Processy i apparaty himicheskoj tehnologii). 2020. (in Russ)
3. Vorob'eva YV. Razrabotka eksperimental'noj ustanovki dlya issledovaniya processa sushki vo vzveshennom sostoyanii na inertnyh telah. Tr. molod. uchenyh Tamb. gos. tekhn. un-ta. 2007;20:21–25. (in Russ)

МОДЕЛИРОВАНИЕ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА МЕТИЛОВОГО СПИРТА

Муллаева В.Н., магистрант 1 года
Руководитель: **Сорокин В.В.,** канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: mullaeva.valeriya@pharminnotech.com

Рассматривается процесс получения метилового спирта из синтез-газа и его оптимизация с помощью модели процесса в программе Aspen Plus. Проведено моделирование химико-технологической схемы процесса и оптимизация процесса с помощью рециркуляции газа.

Ключевые слова: *моделирование, оптимизация, метиловый спирт, химико-технологическая схема, синтез-газ, рециркуляция.*

Метанол (CH3OH, метиловый спирт) представляет собой жидкость с запахом, хорошо смешивающуюся с водой. Мировое производство метанола постоянно растет, в виду того, что он является необходимым компонентом для производства различных активных фармацевтических субстанций, используется при производстве дезинфицирующих средств.

Целью данной работы явилось моделирование процесса получения метилового спирта с мольной долей 95% из синтез-газа и оптимизация процесса на основе полученной модели.

Объектом исследования служил процесс получения метилового спирта из синтеза газа. В основе получения метанола лежат следующие реакции:

$CO + 2H_2 \leftrightarrow CH_3OH + 90{,}73$ кДж (1)

$CO_2 + 3H_2 \leftrightarrow CH_3OH + H_2O - 49{,}53$ кДж (2)

$CO_2 + H_2O \leftrightarrow CO + H_2O - 41{,}2$ кДж (3)

Кривая зависимости количества образовавшегося метанола от температуры не линейна и проходит через экстремум при всех составах газа, причем максимальный выход метанола наблюдается при 255–270 °C.

Давление, применяемое в промышленном синтезе, составляет 4-30 МПа; при превышении данного давления ускоряются побочные реакции и, кроме того, увеличиваются затраты на компрессию газа, что ухудшает экономические показатели процесса.

Состав газовой смеси существенно влияет на степень превращения сырья. Поэтому в промышленных условиях принято работать с некоторым избытком водорода.

CO : CO2 : H2 = 50:20:500 кмоль/час [1]

Методом исследование являлось компьютерное моделирование процесса. Для моделирования был выбран продукт Aspen Plus 11, выпущенный американской фирмой Aspen Tech Inc., используемый для моделирования статических и динамических режимов химико-технологических процессов и систем. Продукт имеет возможность решать проблемы и задачи разной степени сложности непосредственно во время технологического процесса.

Aspen Plus предоставляет широкий спектр инструментов для разработки и оптимизации моделей процессов, включая набор физико-химических свойств, способность обрабатывать твердые, жидкие и газовые процессы, процессы с участием электролитов. В программе имеется большой объем данных по физико-химическим свойствам веществ, моделям оборудования [2].

В рамках моделирования программное обеспечение Aspen Plus предлагает три модели процесса ректификации, необходимого для получения чистого метилового спирта с мольной долей 95%, различающихся математическим описанием и предоставляющих различный набор характеристик процесса. Моделирование осуществляли различными способами для получения полной информации о процессе, сравнивали конечные результаты мольных долей метанола в конечном продукте при моделировании каждым из способов.

Модель «DSTWU» рассчитана на процесс однократной перегонки двух продуктов. В этом случае расчеты выполняются с использованием методов Гиллиленда, Винна и Андервуда для расчета стадий и флегмового числа. Такой метод предполагает постоянный молярный избыток и постоянную относительную летучесть. Для указанного извлечения продукта (как легкого, так и тяжелого) в модели «DSTWU» сначала оценивается минимальное количество ступеней и минимальное флегмовое число, а затем вычисляется либо требуемое флегмовое число, либо требуемое количество теоретических стадий. Во время этих расчетов Aspen Plus также оценит оптимальное расположение ступени подачи и работу конденсатора и ребойлера. Данный метод позволяет получить **общее** представление о процессе и использовать его результаты в качестве входных данных для более детального моделирования.

Рассчитав общие параметры процесса и колонны, возможно, перейти к дизайну процесса с помощью других моделей.

Модель «Distl» также предназначена для процесса дистилляции с однократной подачей и двумя продуктами. Однако в этом методе рассчитываются составы продуктов на основе подхода Эдмистера. Это сокращенная модель оценки многокомпонентной перегонки, используемая для разделения входящего потока на два потока получаемых продуктов. При расчете процесса по данному методу необходимо указать: количество теоретических ступеней; флегмовое число; со-

держание дистиллята в питающей жидкости. Также модель «Distl» оценивает работу конденсатора и ребойлера. Расчеты производятся на предположении о наличии постоянного молярного избытка и постоянной относительной летучести. Таким образом, для модели «Dist1» требуется больше входных параметров, чем для модели «DSTWU», которые должны быть известны пользователю.

Еще одной моделью установки общей дистилляции является модель «RadFrac». Эта модель для перегонки включает в себя гораздо более подробные расчеты по процессу, чем первые два метода, и может использоваться для моделирования абсорбции, оттонки, экстрактивной перегонки и азеотропной перегонки твердых веществ, жидкостей и газов. Модель применима для неидеальных жидких растворов или процессов с продолжающейся химической реакцией. Метод «RadFrac» представляет возможность для дизайна нескольких потоков подачи и продукта (включая циркулирующие потоки), и обеспечивает высокую точность расчетов, что дает возможность использовать его для исследований в форме проектных спецификаций, анализа чувствительности или оптимизации [3].

Химико-технологическая схема процесса представлена на рисунке 1.

Газы поступают в компрессор 1 при 50°С и давлении 1 бар, где сжимаются до давления 40 бар и температуры 627°С, после чего охлаждаются в охладителе 1 до 270°С. Далее вещества поступают в реактор («блок реактор»), где при температуре 270°С происходит их смешение и химическое взаимодействие.

Затем образующиеся компоненты, проходя через клапан-редуктор, который позволяет снизить давление в смеси до 10 бар, а следовательно, и ее температуру до 254°С на выходе, поступают в охладитель, где смесь охлаждается до 50°С. Доля газа в смеси после этой операции составляет 0,46.

Пара-жидкостная смесь (молярная доля пара составила 0,464, жидкости – 0,536) направляется в сепаратор 1, где разделяется на газовую фазу, которая отводится, и жидкую, при этом мольная доля метанола в получившейся смеси составляет 0,485. Это так называемый «метанол-сырец».

В дальнейшем для получения чистого метанола смесь направляют на ректификацию. Результаты моделирования процесса ректификации по методу «DSTWU» представлены в таблице 1.

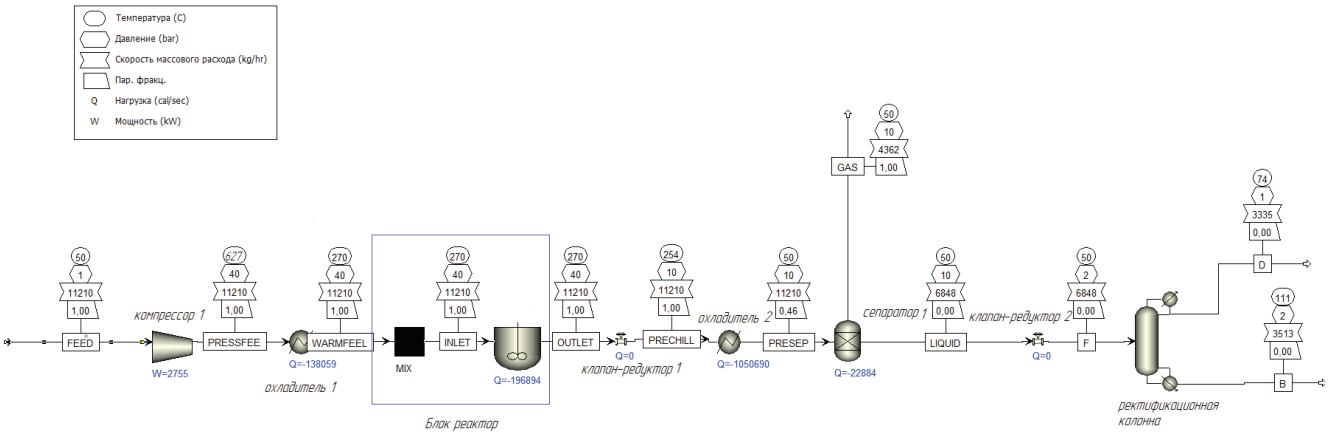


Рисунок 1. Химико-технологическая схема производства метанола

Таблица 1 – Результаты моделирования процесса ректификации смеси метанол/вода с применением модели «DSTWU»

Показатель	Результат	Ед. измерения
Минимальное флегмовое число	0,603202	
Текущее флегмовое число	1,5	
Минимальное число тарелок	4,392501	
Текущее число ступеней	6,66642	
Тарелка питания	5,129214	
Текущее число ступеней свыше питания	4,129214	
Требуемый нагрев ребойлера	740469,8	cal/sec
Требуемое охлаждение конденсатора	663881,8	cal/sec
Температура потока дистиллята	74,44461	°С
Температура куб. остатка	110,7237	°С
Содержание дистиллята в потоке питания	0,361984	

Результаты расчетов мольной доли метанола в смеси метанол/вода с применением трех различных методов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты расчета мольной доли метанола в смеси метанол/вода, с применением методов «DSTWU», «Distl», «RadFrac»

Вещество	Мольная доля компонента в смеси		
	Входящий поток	Кубовый остаток	Дистиллят
«DSTWU»			
CH_3OH	0,346649	0,027166	**0,909754**
H_2O	0,653351	0,972834	0,090246
«Distl»			
CH_3OH	0,346649	0,003412	**0,689885**
H_2O	0,653351	0,996588	0,310115
«RadFrac»			
CH_3OH	0,346649	0,019044	**0,929057**
H_2O	0,653351	0,980956	0,070943

Воспользуемся методом «RadFrac», описывающим процесс наиболее полно, для оптимизации данного процесса.

Так как полученная нами мольная доля метанола не равна 0,95, а количество отводимые из сепаратора 1 газов составляет примерно треть от поступивших, то возможно провести оптимизацию процесса путем рециркуляции газов, отводимых из сепаратора 1. Схема химико-технологического процесса получения метанола из синтез-газа с рециркуляцией отводимых из сепаратора газов представлена на рисунке 2.

Предложено отводить газы из сепаратора 1 с давлением 10 бар и температурой 50 °С в компрессор 2, где их сжимают до 40 бар, вследствие чего достигается повышение температуры смеси до 253°С.

Затем газовая смесь нагревается до температуры 270°С в нагревателе, после чего подаётся в сепаратор 2, где происходит отделение водорода от оставшихся газов.

Водород-газ подается в реактор на синтез, а продувочные и танковые газы передают на сжигание в трубчатую печь.

В дальнейшем процесс протекает так же, как и в случае без рециркуляции. Конечным этапом процесса является проведение моделирования ректификации метанола методом «RadFrac».

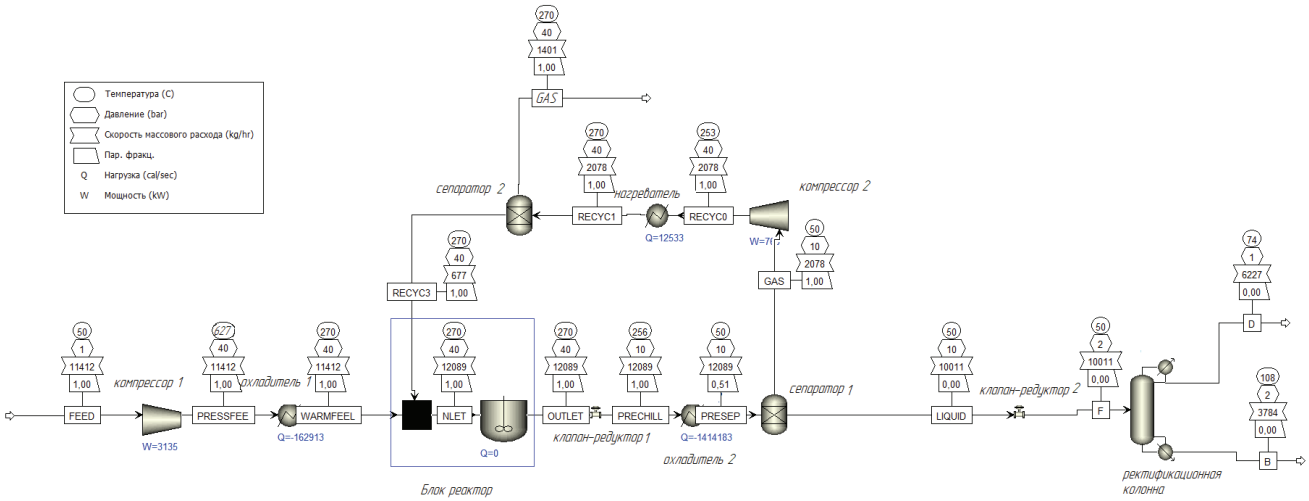


Рисунок 2. Химико-технологическая схема производства метанола с рециркуляцией газа водорода

Расчет мольной доли метанола в смеси метанол/вода в системе с рециркуляцией газа-водорода с применением метода «RadFrac» показал, что ее величина составила 0,959. Таким образом, использование схемы с рециркуляцией позволило повысить содержание метанола на выходе.

В результате исследовательской работы проведено моделирование химико-технологической схемы процесса получения метанола из синтез-газа используя различные математические модели расчета ректификации. Расчетная мольная доля метанола в смеси метанол/вода при использовании наиболее точного метода моделирования «RadFrac» составила 0,929.

С целью увеличения содержания метанола в смеси была предложена оптимизация процесса посредством рециркуляции газа-водорода, мольная доля метанола составила 0,959, что выше, по сравнению со стандартной схемой.

Также, вследствие снижения температуры синтеза при низком давлении процесс осуществляется в условиях, близких к равновесию, что позволит увеличить производительность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гимаева АР, Хасанов ИИ. Методы получения синтез-газа для производства метанола. НефтеГазоХимия. 2018;(1):14-19.

2. Haydary J. Chemical process design and simulation: Aspen Plus and Aspen Hysys applications. John Wiley & Sons, Inc. 2019.
3. Al-Malah KIM. Aspen Plus®. John Wiley & Sons, Inc.. 2016 Oct 17.

SUMMARY

MODELING OF THE CHEMICAL AND PROCESSING SCHEME AND OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION PROCESS OF METHYL ALCOHOL

Mullaeva V.N., Master's student of 1 year
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The process of obtaining methyl alcohol from synthesis gas and its optimization using a process model in the Aspen Plus program are considered. The modeling of the chemical technological scheme of the process and the optimization of the process using gas recirculation have been carried out.

Key words: *modeling, optimization, methyl alcohol, chemical-technological scheme, synthesis gas, recirculation.*

REFERENCES

1. Gimaeva AR, Khasanov II. Methods for producing synthesis gas for methanol production. Oil & Gas Chemistry. 2018;(1):14-19. (in Russ)
2. Haydary J. Chemical process design and simulation: Aspen Plus and Aspen Hysys applications. John Wiley & Sons, Inc. 2019.
3. Al-Malah KIM. Aspen Plus®. John Wiley & Sons, Inc.. 2016 Oct 17.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ВОДНО-СПИРТОВОЙ СМЕСИ НА ПРОЦЕСС ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ

Нестерова Д.И., студ. 3 курса, **Чеботова П.А.**, студ. 3 курса
Руководитель: **Васильева П.А.**, асп. 1 года обучения
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: darya.nesterova@spcpu.ru

Исследовано влияние объемного содержания этилового спирта, используемого в качестве экстрагента при извлечении биологически активных веществ из растительного сырья методом перколяции, на физико-химические характеристики получаемого экстракта методами капиллярной вискозиметрии, спектрофотометрии и тензиометрии.

Ключевые слова: *экстракция, перколяция, флавоноиды, растительное сырье, биологически активные вещества (БАВ), софора японская.*

Разнообразную биологическую активность и значение для медицинского применения плодов софоры японской определяет наличие в химическом составе данного лекарственного растительного сырья (ЛРС) различных биологически активных веществ (БАВ), в том числе комплекса фенольных соединений. Представителями последних являются флавоноиды, которые широко применяются в медицине благодаря своим антиоксидантным, противовоспалительным, капилляропротекторным и многим другим свойствам, в связи с которыми флавоноиды и ЛРС, в котором они содержатся, представляют обоснованный исследовательский интерес со стороны разработчиков лекарственных средств [2].

Объектами исследования служили водно-спиртовые растворы различной концентрации и экстракты софоры японской ТУ 10.89-066-14721358-2017 на их основе, полученные методом перколяции.

Были приготовлены водно-спиртовые растворы с объемным содержанием этилового спирта 0%, 24%, 48%, 72%, 96%. Для каждого из растворов было определено поверхностное натяжение.

Методика определения поверхностного натяжения растворов:

Исследования проводили на тензиометре Дю-Нуи по методу отрыва кольца [3].

Далее в работе приготовленные водно-спиртовые растворы были использованы в качестве экстрагентов при извлечении БАВ из плодов софоры японской методом перколяции.

Сырье измельчали до размера частиц 1-3 мм, взвешивали на лабораторных весах.

Отношение сырья к экстрагенту составило 1:4 соответственно. Количество необходимого экстрагента рассчитывали по формуле:

$$V_{\text{растворителя}} = V_{\text{извлечения}} + (m_{\text{сырья}} * \text{К}),$$

где $V_{\text{извлечения}}$ – объем необходимого извлечения;
$m_{\text{сырья}}$ – масса сырья;
К – коэффициент водопоглощения – 2.

Навеску заливали равным количеством экстрагента. Оставляли укупоренным в течение часа. Далее загружали в перколятор, на дне которого была установлена марля. Выше перколятора помещали делительную воронку, в нее заливали оставшееся количество рассчитанного экстрагента. Подачу экстрагента устанавливали таким образом, чтобы скорость подачи была равна скорости выхода экстракта.

Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента».

Поверхностное натяжение отфильтрованных растворов экстрактов определяли по ранее описанной методике.

Содержание экстрагируемых биологически активных веществ определяли на спектрофотометре СФ 2000 при длине волны 200-400 нм с использованием кювет с толщиной слоя 10 мм. Пик кривой наблюдался при длине волны 260±2 нм. В качестве раствора сравнения использовались соответствующие растворители (водно-спиртовые растворы различных концентраций).

Вязкость растворов экстрактов определяли методом капиллярной вискозиметрии [4].

По результатам измерений построены графики зависимости поверхностного натяжения растворов от концентрации спирта для водно-спиртовых растворов и растворов экстрактов (рис. 1).

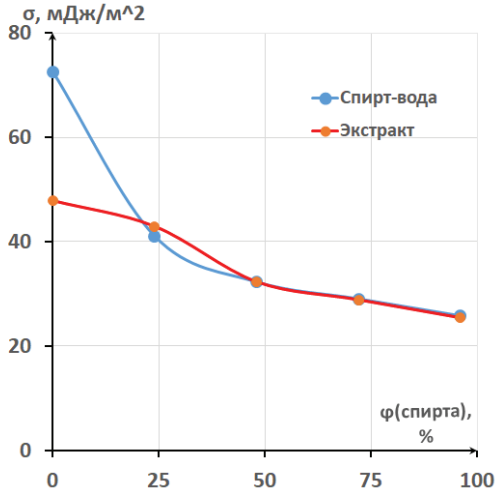


Рисунок 1. Зависимость поверхностного натяжения растворов от концентрации спирта для водно-спиртовых растворов и растворов экстрактов

Из рис. 1 видно, что с ростом концентрации этилового спирта в растворе поверхностное натяжение уменьшается в соответствии с дифильной природой спирта. Молекулы спирта концентрируются на границе раздела фаз и ориентируются так, чтобы уменьшить разность полярностей фаз, а, следовательно, и поверхностное натяжение. Этиловый спирт относится к низкомолекулярным поверхностно-активным веществам (ПАВ).

По результатам измерений получен спектр экстракта софоры японской при разных экстрагентах (рис. 2).

Спектрофотометрическим методом подтверждено наличие суммы флавоноидов в экстрактах, что согласуется с результатами работы [1]. Из литературных данных известно, что спектр поглощения большинства флавоноидов характеризуется наличием двух основных максимумов (полос) поглощения [5, 6]. Один из них расположен в районе 320-385 нм, а второй наблюдается при длине волны 240-280 нм.

При увеличении содержания спирта в экстрагенте снижается содержание извлекаемых флавоноидов (это требует дальнейшего исследования).

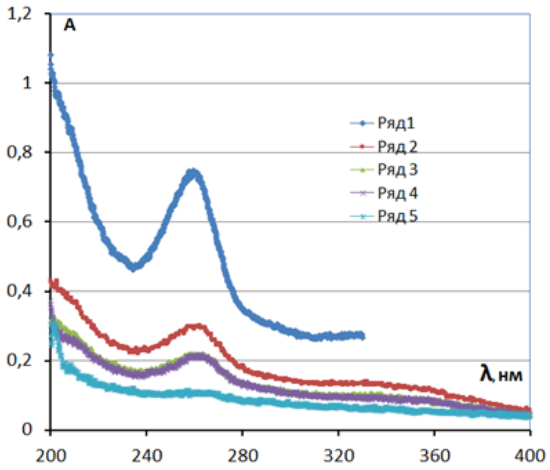


Рисунок 2. Спектр экстракта софоры японской при разных экстрагентах (ряд 1 – вода, ряд 2 – концентрация спирта 24%, ряд 3 – концентрация спирта 48%, ряд 4 – концентрация спирта 72%, ряд 5 – концентрация спирта 96%)

Результаты измерения вязкости экстрактов представлены на рисунке 3.

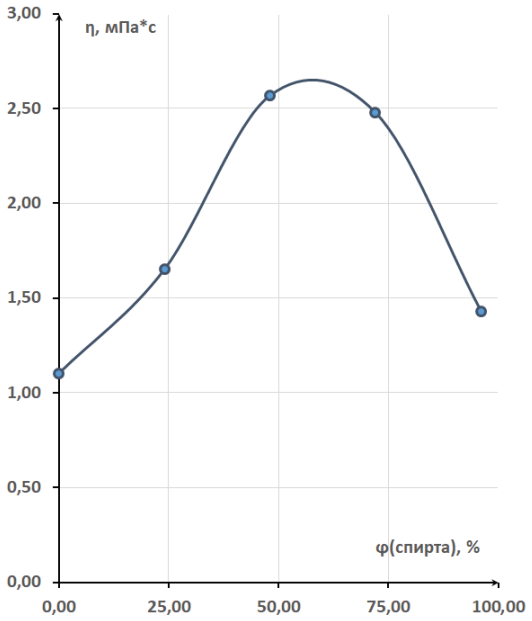


Рисунок 3. Зависимость вязкости экстрактов от концентрации спирта

Вязкость экстрактов сначала возрастает по мере увеличения концентрации спирта, а затем снижается. Пик наблюдается при концентрации спирта приблизительно 60%. При увеличении вязкости извлечение из растительного сырья уменьшается, поэтому рекомендуется использовать менее вязкие экстрагенты.

Изучение влияния состава водно-спиртовой смеси на процесс экстракции БАВ из плодов софоры японской позволило:

1. Установить, что степень извлечения БАВ зависит от соотношения воды и этилового спирта в экстрагенте;
2. Подтвердить наличие в экстракте флавоноидов;
3. Показать немонотонное изменение вязкости, связанное с процессами структурирования в экстракте;
4. Установить, что в процессе экстракции водой из растительного сырья извлекаются природные ПАВ, что необходимо учитывать при использовании ПАВ для активации процесса экстракции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева ВЮ, Калинкина ГИ. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной Alchemilla Vulgaris L.S.LХимия растительного сырья. 2000;1:85-88.
2. Ковалева ЛГ, Сампиев АМ. Исследование фенольных соединений плодов софоры японской. Современные проблемы науки и образования. 2013;6. Доступно по: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=10..(дата обращения: 09.03.2021).
3. ГОСТ 20216-74. Латексы. Методы определения поверхностного натяжения (с Изменением № 1).
4. ОФС.1.2.1.0015.15 Вязкость. Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0038-07.
5. Markham KR. Techniques of Flavonoid Identification. London: Academic Press, 1982.
6. Markham KR, Marby TJ. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonfnce spectroscopy of flavonoids. The flavonoids. New-York, 1975:45-77.

SUMMARY

INFLUENCE OF THE COMPOSITION OF WATER-ALCOHOLIC MIXTURE ON THE EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM FRUIT OF SOPHORA JAPANESE

Nesterova D.I., 3rd year student, **Chebotova P.A.**, 3rd year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The effect of the volumetric content of ethyl alcohol, used as an extractant in the extraction of biologically active substances from plant raw materials by the percolation method, on the physicochemical characteristics of the obtained extract by capillary viscometry, spectrophotometry and tensiometry, has been investigated.

Key words: *extraction, percolation, flavonoids, plant raw materials, biologically active substances (BAS), Japanese sophora.*

REFERENCES

1. Andreeva VU, Kalinkina GI. Razrabotka metodiki kolichestvennogo opredeleniya flavonoidov v manzhetke obyknovennoj Alchemilla Vulgaris L.S.L. Himiya rastitel'nogo syr'ya. 2000;1:85-88. (in Russ)
2. Kovaleva LG, Sampiev AM. Issledovanie fenol'nyh soedinenij plodov sofory yaponskoj. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2013:6. (in Russ)
3. GOST 20216-74. Lateksy. Metody opredeleniya poverhnostnogo natyazheniya (s Izmeneniem № 1). (in Russ)
4. OFS.1.2.1.0015.15 Vyazkost'. – Vzamen GF XII, ch.1, OFS 42-0038-07. (in Russ)
5. Markham KR. Techniques of Flavonoid Identification. London: Academic Press, 1982.
6. Markham KR, Marby TJ. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonfnce spectroscopy of flavonoids. The flavonoids. New-York, 1975:45-77.

ПРОЕКТИРОВАНИЕ УЧАСТКА С BFS С УЧЕТОМ СОВРЕМЕННЫХ ТРЕБОВАНИЙ

Немков С.А., магистрант 1 года обучения, **Созинова Д.В.**, студ. 4 курса
Руководитель: **Басевич А.В.**, канд. фарм. наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: nemkov.sergej@pharminnotech.com

Рассмотрены современные требования к проектированию производства стерильных лекарственных препаратов для парентерального введения. При этом были определены критические элементы, которыми в данном случае являются подведение технологических сред. В связи с этим рассмотрены особенности производства препаратов по технологии BFS (Blow-Fill-Seal).

Ключевые слова: *система «выдувания – наполнения – герметизации» (BFS), требования GMP, контаминация, чистые помещения, технологические среды, проектирование.*

Целью данной статьи является рассмотрение современных требований для проектирования участка с BFS. Данная цель позволяет сформулировать задачи:

- Осуществить обзор нормативной документации;
- Рассмотреть требования к технологическим средам и системам их подачи;
- Изучить требования к чистым помещениям для BFS;
- Предложить дизайн чистого помещения.

Надлежащее функционирование производства лекарственных препаратов напрямую зависит от корректности его проектирования, подбора оборудования и введения в эксплуатацию. Для производства, включающего в себя чистые помещения с расположением крупногабаритного оборудования, которым является система BFS, стадия проектирования является наиболее критической. Это связано с высокими экономическими рисками, а также рисками для качества. По словам представителя компании CordenPharma, наблюдается активная разработка асептических наполнительных установок в направлении работы в «автоматически роботизированном» режиме для осуществления защиты продукта от контаминации, а также защиты оператора и окружающей среды в случае производства сильнодействующих лекарственных препаратов [4]. Кроме того, рынок парентеральных лекарств должен достичь ошеломляющей оценки в 802 млрд. долл. США к концу прогнозного периода (2019-2029 гг.). Для сравнения, мировой рынок парентеральных лекарственных средств в 2019 г. оценивается в 451 млрд. долл. США [5]. В связи с этим анализ современных требований к проектированию является актуальной задачей исследования.

Обзор требований нормативной документации

Наиболее общие понятия по проектированию помещений и расположению или подбору оборудования изложены в решении от 3 ноября 2016 года N 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Исходя из чего введению производственного помещения в эксплуатацию должны предшествовать стадии проектирования, постройки, оснащения так, чтобы по итогу оно соответствовало проводимым операциям. Необходимо учитывать также и особенности эксплуатации чистых помещений: очистку, создание и поддержание микроклиматических условий, снижение риска ошибок при работе с оборудованием или полупродуктом. Кроме того, должны быть приняты меры, предотвращающие вход в помещения лиц, не имеющих права доступа в них [1]. Трубопроводы, осветительные приборы, вентиляционные установки и другие системы обслуживания должны быть спроектированы и расположены таким образом, чтобы не было углублений, затрудняющих их очистку. По возможности доступ к ним для обслуживания должен осуществляться извне производственных зон [1]. Данное требование имеет прямое отношение к проектированию чистых помещений с установкой BFS, так как подведение технологических сред является одной из важных задач на данном этапе. В противном случае расположение установки,

её подключение и в дальнейшем квалификация могут быть затруднены, что также чревато высокими экономическими рисками. Иными словами, проектирование помещений на фармацевтическом предприятии производится с целью снижения рисков при его эксплуатации.

Требования к технологическим средам

При функционировании системы BFS задействован целый ряд технологических сред. В таблице 1 представлен перечень основных технологических сред, их пути использования и особенности производства.

Таблица 1 – Основные технологические среды

Технологическая среда	Использование	Особенности
Вода очищенная и Вода для инъекций	Для функционирования охлаждающей системы: создается поток холодной воды, достаточной для пресс-формы, экструдера и гидравлической системы [2], а также для осуществления мойки (CIP)	Производится непосредственно на предприятии, соответствует ФС.2.2.0019.18 и ФС.2.2.0020.18
Сухой сжатый воздух	Для приведения в действие клапанов, а также служит источником фильтрованного стерильного воздуха, который подается на контуры выдува для формирования флаконов или ампул [2]	Производится непосредственно на предприятии в соответствии с регламентом
Вакуум	Используется вместе с контуром выдува для формирования флакона или ампулы внутри пресс-формы	Производится непосредственно на предприятии в соответствии с регламентом
Пар	Для стерилизации (SIP)	Производится непосредственно на предприятии из Воды очищенной в соответствии с регламентом

Требования к системам подачи технологических сред

По требованиям GMP, части производственного оборудования, соприкасающиеся с продукцией, не должны вступать с ней в реакцию, выделять или абсорбировать вещества в такой степени, чтобы это могло влиять на качество продукции и создавать, таким образом, какую-либо опасность. По требованиям GEP оборудование должно легко мыться, поверхности должны быть гладкими, материал должен быть инертен по отношению к продукту, иметь минимальное количество швов и соединений.

Согласно требованиям GMP и GEP, внутренние поверхности должны быть выполнены из нержавеющей стали AISI 316 L. Внутренний и внешний слой трубопровода должны быть покрыты изоляцией. Внешняя обкладка должна быть выполнена из нержавеющей стали AISI 304. Усиление может быть выполнено из нержавеющей стали AISI 304. Двигатель нагнетания в систему выдува должен поддерживать давление не менее 5 бар. Данное давление необходимо для выдува флаконов в пресс-формах. Система подготовки воздуха должна быть оснащена фильтрами F5->F7->F9->>HEPA->ULPA с целью получения стерильного воздуха, поддерживать условия, характерного для класса чистоты A ISO-100. В системе транспорта стерильного воздуха должно быть предусмотрено наличие системы контроля взвешенных частиц, а также системы манометров с обратной связью в санитарном исполнении для измерения разницы давления до и после фильтров. Материал в виде гранул полимера должен свободно двигаться относительно стенок бункера без истирания, а также подвергаться мойке, поэтому материал бункера и загрузочной воронки с полимером должен иметь шероховатость не более Ra≤1,2 мкм. Пневмотранспортная система должна быть выполнена в виде герметичного трубопровода с нагнетающим вентилятором, обеспечивающим необходимое давление для транспорта гранул полимера.

Для валидации системы безразборной стерилизации SIP необходимо учесть наличие системы термометров для создания температурной карты с целью обнаружения и контроля эффективности процесса в наиболее критических элементах: элементы арматуры трубопроводов, емкости больших объемов, элементы изменения диаметра трубопроводов, места углублений.

Дизайн чистого помещения

Согласно требованиям GMP ЕАЭС, устройство для «выдувания – наполнения – герметизации», используемое в асептическом производстве и имеющее зону класса A с эффективным потоком воздуха, может быть установлено, по крайней мере, в зоне класса C при условии использования одежды, применяемой в зонах классов A и (или) B [1]. Кроме того требования GMP рекомендуют обратить внимание на ряд факторов, среди которых пространство чистого помещения, которое является производственной средой для размещенного там оборудования. Однако, в силу экономических, технических и эксплуатационных факторов технологическое ядро во многих случаях окружают зоны с меньшим классом чистоты. Это позволяет уменьшить до минимума размер зоны с высоким классом чистоты. Потоки персонала и материалов между чистыми зонами повышают риск переноса загрязнений, поэтому следует уделить особое внимание детализации планировки и организации потоков персонала и материалов. С целью снижения текущих расходов возможно максимальное, но при этом разумное, снижение площади чистого помещения. На рисунке 1 представлена схема распределения помещений и зон соответствующих классов чистоты.

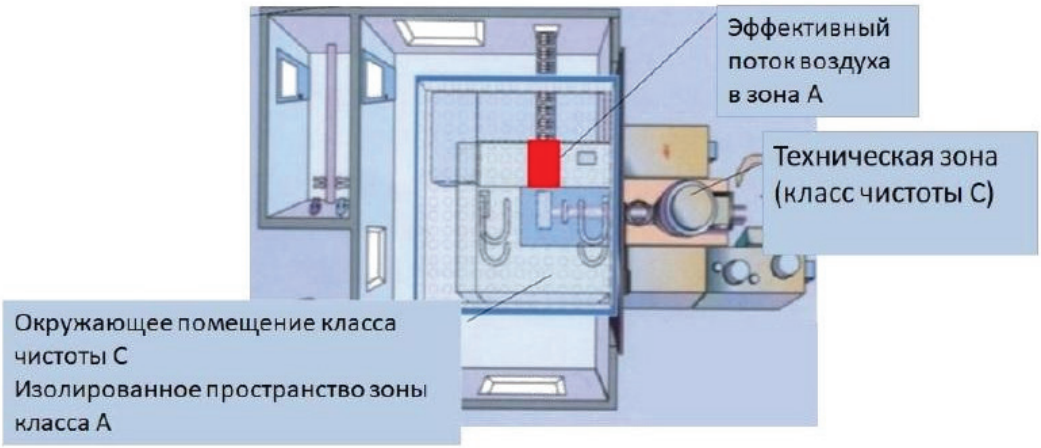


Рисунок 1. Расположение зон установки BFS

Таким образом, эргономика чистого помещения может быть разделена с вынесением систем подготовки технологических сред, а также хранения гранулята полимера в более низкий класс чистоты. На рисунке 2 представлено предложенное размещение установки в рамках чистого помещения системы BFS «сквозь стену».

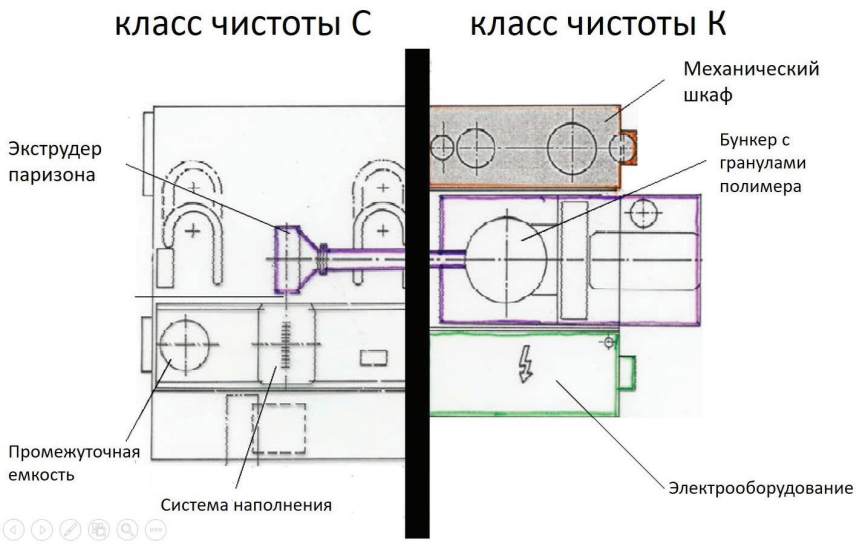


Рисунок 2. Размещение установки в рамках чистого помещения системы BFS «сквозь стену»

Рассмотрены современные требования к производству лекарственных препаратов для парентерального введения, а также основополагающие принципы GMP в части проектирования участка с системой BFS, не только базового оснащения, но и вспомогательных систем, определены критические элементы проектирования. В связи с этим, определены необходимые для производства технологические среды и то, как подводить их к оборудованию, учитывая экономические и производственные риски.

ЛИТЕРАТУРА

1. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 №77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза»

2. «Фармацевтическая отрасль». 2018 ноябрь ;6(71) «Оборудование для упаковки: технология «выдув –наполнение – запайка» (Blow / Fill / Seal – BFS)»

3. Презентация Qualification and Validation of a BFS-Installation including CIP/SIP Presented by Christoph Bohn and Stefan Kiesel

4. Blow Fill Seal Technology Market. Forecasts from 2019 to 2024 Knowledge Sourcing Intelligence LLP, 2019. Доступно по: https://www.researchandmarkets.com/reports/4858258/.

5. Patricia Van Arnum. Market View: Parenteral Drugs. DCAT Editorial Director. DCAT Value Chain Insights, 2019. Available at: https://www.dcatvci.org/6175-inside-the-market-for-parenteral-drugs

6. ГОСТ Р ИСО 14644-1-2017 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды

SUMMARY

MODERN APPROACHES FOR THE FORMATION OF URS FOR THE BFS FILLING MACHINES

Nemkov S.A., 1 year master student
Sozinova D.V., 4th year student
St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The modern requirements for the design of the production of sterile drugs for parenteral administration have been considered. At the same time, critical elements were identified, which in this case are the connection of the process media. Therefore, the features of the BFS (Blow-Fill-Seal) drugs production have been considered.

Key words: *system "blow-fill-seal" (BFS), GMP requirements, contamination, clean rooms, process media, engineering.*

REFERENCES

1. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated 03.11.2016 No. 77 "On approval of the Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union"
2. "Pharmaceutical industry". 2018 November ;6(71) "Equipment for packaging: technology" blow-fill-seal "(Blow / Fill / Seal – BFS)"
3. Presentation Qualification and Validation of a BFS-Installation including CIP/SIP Presented by Christoph Bohn and Stefan Kiesel
4. Blow Fill Seal Technology Market. Forecasts from 2019 to 2024 Knowledge Sourcing Intelligence LLP, 2019. Доступно по: https://www.researchandmarkets.com/reports/4858258/.
5. Patricia Van Arnum. Market View: Parenteral Drugs. DCAT Editorial Director. DCAT Value Chain Insights, 2019. Available at: https://www.dcatvci.org/6175-inside-the-market-for-parenteral-drugs
6. GOST R ISO 14644-1-2017 Clean rooms and connected with them controlled environments

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕЛОКСИКАМА

Ногаева У.В., асп. 1 года обучения,
Попов О.Р., магистрант 1 года обучения, **Кованcков В.Е.**, студ. 1 курса
Руководитель: **Флисюк Е.В.,** докт. фарм. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: uljana.nogaeva@pharminnotech.com

Проведён анализ активной фармацевтической субстанции мелоксикам по показателям: описание, pH водной вытяжки, растворимость, а также дана оценка таким технологическим свойствам, как сыпучесть, угол естественного откоса и насыпной объём. Полученные данные необходимы для разработки состава и технологии новых лекарственных препаратов на основе мелоксикама.

Ключевые слова: *мелоксикам, растворимость, сыпучесть, нестероидные противовоспалительные средства, анализ порошков.*

Свойства исходных фармацевтических субстанций (АФС) во многом определяют технологию получения лекарственных препаратов (ЛП) на их основе, влияют на необходимость использования определённых вспомогательных веществ, а также на выбор конкретного оборудования и технологических режимов. В рамках представляемой работы оценивались физико-химические и технологические свойства мелоксикама, представляющего собой нестероидное противовоспалительное средство.

Согласно данным, опубликованным в Государственном реестре лекарственных средств (ГРЛС) на 09.03.2021, на российском фармацевтическом рынке насчитывается 57 препаратов, содержащих данную АФС (табл. 1) [1].

Таблица 1 – Данные о количестве и форме выпуска препаратов на основе мелоксикама

Лекарственная форма (ЛФ)	Количество наименований	Доля от общего числа	Доля ЛФ по агрегатному состонию
таблетки	30	52,64%	Твердые – 54,39%
таблетки, диспергируемые в полости рта	1	1,75%	
раствор для в/м применения	18	31,58%	Жидкие – 33,33%
суспензия для приёма внутрь	1	1,75%	

Лекарственная форма (ЛФ)	Количество наименований	Доля от общего числа	Доля ЛФ по агрегатному состонию
гель	2	3,51%	Мягкие – 12,28% (среди них наружные – 7,02%)
крем для наружного применения	2	3,51%	
суппозитории ректальные	3	5,26%	

Представленные данные показывают, что больше половины ЛП с мелоксикамом представлено в форме таблеток, в то время как доля мягких лекарственных форм для наружного применения суммарно составляет около 7 %.

Согласно клиническим рекомендациям топическое применение НПВС является эффективной симптоматической терапией остеоартроза. Нами планируется создание комбинированного наружного средства, содержащего мелоксикам. В связи с этим, представляется актуальным подробное изучение его свойств.

Цель работы заключается в оценке физико-химических (описание, pH водной вытяжки, растворимость) и технологических (сыпучесть, угол естественного откоса и насыпной объём) свойств мелоксикама.

Объектом исследования стала активная фармацевтическая субстанция – мелоксикам, структурная формула которого представлена на рисунке 1.

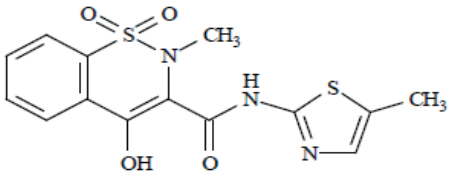


Рисунок 1. Структурная формула мелоксикама [2]

При проведении исследования использовали методики, предложенные в Государственной Фармакопее 14 издания, а также Руководства по эксплуатации соответствующих приборов.

Для отвешивания АФС и реактивов использовали весы аналитические SartoriusCE 224-C, дозирование жидкостей проводили с помощью дозатора механического (фирма «BIOHIT OYJ», Финляндия). Размер частиц после растворения мелоксикама оценивали с помощью цифрового микроскопа 40х-1600х. Измерение водородного показателя проводили на pH-метре Аквилон 410, оценку сыпучести и насыпной плотности осуществляли соответственно на тестере сыпучести гранулированного материала ERWEKAGT и на тестере насыпной плотности ERWEKASVM 221.

1. Оценка физико-химических свойств мелоксикама

Мелоксикам представляет собой светло-жёлтый порошок, который практически не растворим в воде, pH водной вытяжки составила 4,56.

Исследование растворимости проводилось согласно методике, указанной в ОФС 1.2.1.0005.15 «Растворимость» для веществ с неизвестной растворимостью [3].

Было установлено, что образец мелоксикама легко растворим в диметилформамиде (ДМФА), диметилсульфоксиде (ДМСО) и в 10% растворе триэтаноламина (ТЭА). В таких веществах, как полиэтиленгликоль (ПЭГ) 400, пропиленгликоль, твин 20, твин 80, деканол, оливковое масло и олеиновая кислота мелоксикам практически нерастворим и образует суспензии с разным размером и количеством частиц.

Внешний вид полученных составов представлен на рисунке 2.

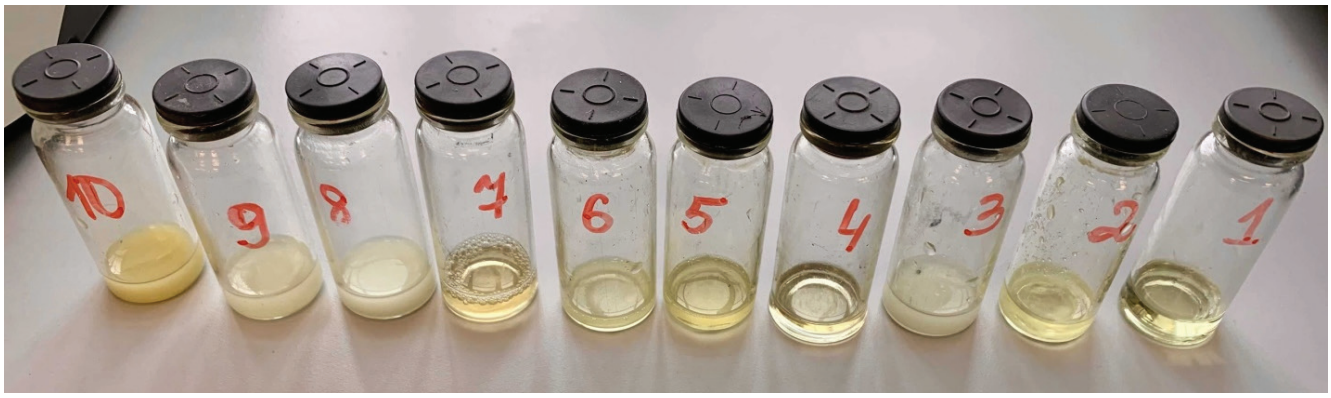
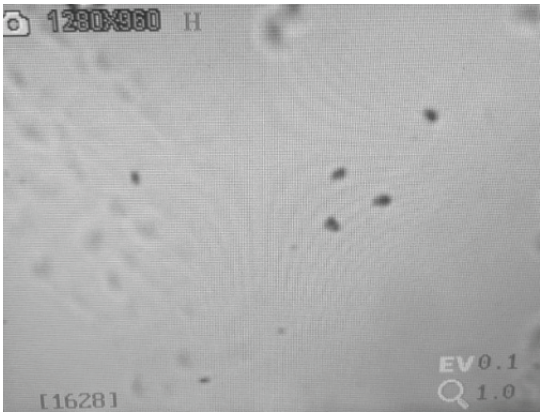
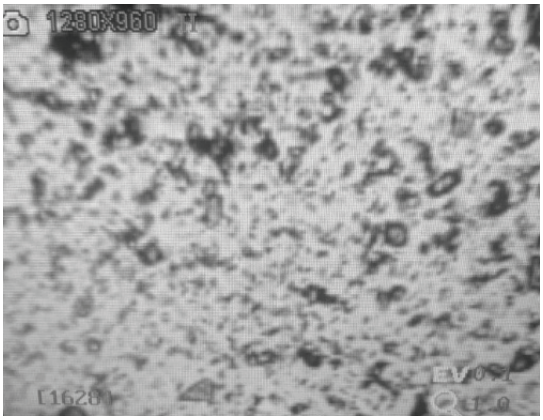
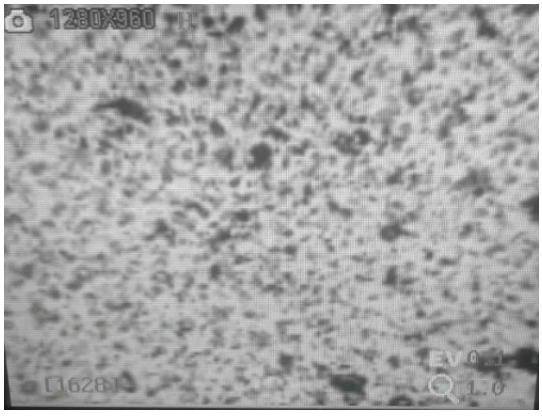


Рисунок 2. Внешний вид испытуемых образцов
(нумерация флаконов соответствует номеру растворителя, указанному в табл. 2)

В таблице 2 представлены результаты микроскопии суспензий, содержащих мелоксикам в концентрации 1%.

Таблица 2 – Характеристика суспензий мелоксикама, полученных при использовании разных растворителей

№	Название растворителя	Размер частиц	Фото микроскопии на 10-кратном увеличении
1	Диметилсульфоксид	истинный раствор	
2	ПЭГ 400	0,01 – 0,02 мм	
3	Пропиленгликоль	0,01 – 0,04 мм	
4	Диметилформамид	истинный раствор	
5	Твин 80	0,02 мм	
6	Твин 20	0,005 – 0,01 мм	

№	Название растворителя	Размер частиц	Фото микроскопии на 10-кратном увеличении
7	10% раствор ТЭА	истинный раствор	
8	Деканол	0,02 – 0,07 мм	
9	Олеиновая кислота	0,02 – 0,06 мм	
10	Оливковое масло	0,02 – 0,05 мм	

Данные микроскопии свидетельствуют о том, что наиболее тонкие суспензии образуются при растворении мелоксикама в ПЭГ 400, твин 80 и твин 20.

2. Оценка технологических свойств

Сыпучесть определяется как время, в течение которого определённая масса вещества проходит через отверстие определённого размера [4]. Эта характеристика важна для технологического процесса. Для мелоксикама 3 раза была проведена оценка сыпучести, которая, при отсутствии перемешивания составила 0,0 с/100 г., при включении мешалки на первой скорости было получено среднее значение трёх измерений – 61,57 с/100 г. Данный результат характеризует сыпучесть субстанции как неудовлетворительную и свидетельствует о необходимости использования дополнительного перемешивания.

Определение насыпного объёма. В сухой цилиндр была помещена навеска мелоксикама (m_0= 30,0), при этом первоначальный объём V_0составил 64 см3. После проведения испытания в виде трёх циклов из 1250 соскоков цилиндра, объём мелоксикама стал постоянным и составил 35 см3. Полученные результаты отражены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты оценки насыпного объёма АФС мелоксикам

Масса навески	m_0	30,0
Насыпной объём	до уплотнения V_0	64 мл
	после уплотнения V_{1250}	35 мл
Способность порошка к уплотнению	разность объёмов V_0–V_{1250}	19 мл
Насыпная плотность	до уплотнения m/V_0	0,47 г/мл
	после уплотнения m/V_{1250}	0,86 г/мл
Коэффициент прессуемости	$100\ (V_0\text{-}V_1)/V_0$	29,69%

Данные о сыпучести мелоксикама позволяют определить, каким видом потока будет характеризоваться движение вещества. При подборе оборудования, связанного с перемещением или перемешиванием мелоксикама, возникает необходимость предусмотреть аппараты автоматизации и механизации процессов транспортировки и переработки мелоксикама.

Оценка физико-химических свойств показала, что мелоксикам – это окрашенная субстанция светло-жёлтого цвета, кислотность водной вытяжки которой составляет 4,56. Мелоксикам легко растворим в ДМФА, однако использование этого растворителя ограничено ввиду токсического действия на кожу. Наиболее важной при планировании состава наружных форм с мелоксикамом является его растворимость в ДМСО и 10% растворе ТЭА.

Полученные данные о сыпучести мелоксикама свидетельствуют о его неудовлетворительных технологических свойствах и необходимости подбора оборудования с перемешивающими устройствами и/или дополнительного введения вспомогательных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по :http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=%D0%9C%D0%B5%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D0%BC&m=mnn[Дата обращения – 09.03.2021]

2. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 3. ФС.2.1.0025.15 «Мелоксикам». Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

3. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость». Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

4. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков». Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

SUMMARY

RESEARCH OF PHYSICO-CHEMICAL AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF MELOXICAM

Nogaeva U.V., 1st year postgraduate student, **Popov O.R.**, 1st year master student, **Kovanskov V.E.**, 1st year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The analysis of the active pharmaceutical substance meloxicam was carried out according to the following indicators: description, pH of the water extract, solubility, and also an assessment of such technological properties as flowability, angle of repose and bulk volume was given. Findings are necessary for the development of the composition and technology of new drugs based on meloxicam.

Key words: *meloxicam, solubility, flowability, Nonsteroidal anti-inflammatory drug, analysis of powders.*

REFERENCES

1. State Register of Medicines. Available at :http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=%D0%9C%D0%B5%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D0%BC&m=mnn [Accessed 09 March, 2021]. (in Russ)

2. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 3. PM.2.1.0025.15 «Meloxicam». Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)

3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 1. GPM.1.2.1.0005.15 «Solubility». Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)

4. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 2. GPM.1.4.2.0016.15 «Extent of powder flowability». Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЕЧНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ КОНДЕНСАЦИИ ПАРА ИЗ ПАРОГАЗОВОЙ СМЕСИ ПРИ СУШКЕ В ЗАМКНУТОМ ЦИКЛЕ ТЕПЛОНОСИТЕЛЯ

Подивилова Е.А., **Савви К.И.**, студ. 3 курса, **Фридман Н.А.**, магистрант 2 курса
Руководитель: **Маркова А.В.**, к.т.н., доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: ekaterina.podivilova@spcpu.ru

Для процесса сушки в замкнутом цикле азота рассчитаны удельный расход азота и удельный расход теплоты в зависимости от конечной температуры конденсации паров этанола и паров изопропанола. Установлено, что удельный расход азота монотонно убывает с уменьшением температуры. При некотором (оптимальном) значении конечной температуры наблюдается минимум удельного расхода теплоты. Для оптимального режима построена диаграмма состояния парогазовой смеси в замкнутом цикле.

Ключевые слова: *сушка от органической жидкости, сушка в замкнутом цикле, парциальный конденсатор, энергозатраты на сушку*

В производстве левофлоксацина сушка полупродукта происходит от изопропилового спирта, а конечной субстанции – от этанола. Вакуумная сушка в неподвижном плотном слое протекает в течение многих часов. Кроме этого, материал высушивается неравномерно: на практике процесс периодически останавливают, производится перемешивание материала, а полки меняют местами. Сушилки кипящего слоя, работающие в замкнутом цикле инертного газа [1], являются альтернативой полочным сушилкам (сушильным шкафам), работающим под вакуумом. В кипящем слое время сушки сокращается до нескольких минут [2]. Стремление к «быстрой» сушке приводит к необходимости выбора оптимальных режимных параметров процесса, протекающего в активном гидродинамическом режиме в замкнутом цикле инертного газа. Одним из таких параметров является температура конечной конденсации парогазовой смеси, поступающей далее в калорифер.

При организации сушки в замкнутом цикле азота необходимо удалять испарённую влагу из отработанной парогазовой смеси, которая направляется обратно в калорифер. Это происходит в парциальном конденсаторе. Парциальная конденсация протекает при 100% относительной влажности парогазовой смеси и понижающейся температуре. Доля удаляемых при конденсации паров зависит от конечной температуры парогазовой смеси. При понижении конечной температуры уменьшается паросодержание парогазовой смеси. От паросодержания зависит удельный расход азота в цикле. Удельный расход парогазовой смеси пропорционален энергозатратам на перемещение газа.

С другой стороны, от конечной температуры конденсации зависят количество теплоты, передаваемой в калорифере, и, следовательно, затраты тепловой энергии.

Таким образом, конечная температура конденсации является крайне важным параметром, определяющим суммарные энергозатраты на конвективную сушку в замкнутом цикле.

Целью настоящей работы является определение оптимальной конечной температуры конденсации пара из парогазовой смеси, соответствующей минимальному расходу тепловой энергии.

Расчет проводился для двух парогазовых смесей: для азота, содержащего пары этанола и азота, содержащего пары изопропанола. Рассчитывались удельный расход азота, а также удельный расход теплоты для нагрева каждой из этих смесей. Расчеты проводились по следующей методике: задавалась температура конденсации, и по уравнению Антуана определялось давление насыщенных паров для этанола и изопропанола:

$$p_{нас} = \exp\left(A - \frac{B}{C+t}\right) \tag{1}$$

Здесь A, B, C – соответствующие коэффициенты [3], t – температура. Далее определялось паросодержание $x_{нас}$ поступающей в калорифер смеси:

$$x_{нас} = \frac{M_п}{M_г}\frac{p_{нас}}{\Pi - p_{нвс}} \tag{2}$$

В уравнении $M_п$ – мольная масса пара, $M_г$ = 28 кг/кмоль – мольная масса инертного газа – азота. Следует заметить, что после парциального конденсатора парогазовая смесь является насыщенной.

Температура нагрева каждой из парогазовых смесей в калорифере принималась равной t_1 = 70°С, что ниже допустимой температуры нагрева и полупродукта, и субстанции. Энтальпии парогазовой смеси до и после калорифера рассчитывались по формуле:

$$I_i = r_0 x_{нас} + (c_г + c_п x_{нас})t_i \tag{3}$$

где r_0 – теплота образования пара при 0°С, $c_г$, $c_п$ – теплоемкость газа и пара при средней температуре. Индекс i = 0, 1. «0» соответствует начальной температуре смеси, «1» – конечной температуре после калорифера. Физические свойства веществ определялись из [3].

Температура t_2 на выходе из сушилки принималась равной на 30К выше температуры мокрого термометра. Температура мокрого термометра $t_{мт}$ парогазовой смеси для теоретической сушилки определялась путем решения системы уравнений (1) – (3) при известном I_1. Здесь искомой величиной являлась температура мокрого термометра. Эта температура рассчитывалась при помощи функции root из пакета Matcad. Далее при известной температуре парогазовой смеси рассчитывалось паросодержание x_2 на выходе из сушилки. Затем определялись удельные расходы азота по формуле: $l = 1/(x_2 - x_0)$ и теплоты по формуле: $q = (I_1 - I_0)/(x_2 - x_0)$. Заметим, что для теоретической сушилки количество теплоты, затраченной на нагрев парогазовой смеси, равно количеству теплоты, выделяющейся при парциальной конденсации.

Результаты расчета удельного расхода азота l и удельного расхода теплоты q в среде Matcad представлены на рисунках 1 и 2.

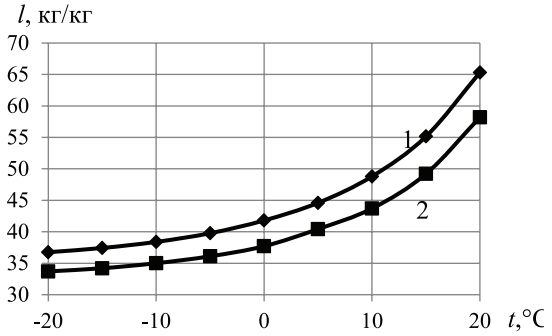


Рисунок 1. Зависимость удельного расхода парогазовой смеси от конечной температуры конденсации для паров: 1 – этанола, 2 – изопропанола

Проанализировав зависимость из рисунка 1, можно сделать вывод, что с увеличением конечной температуры конденсации удельный расход парогазовой смеси увеличивается. В области отрицательных температур увеличение происходит медленнее, в области более высоких температур наблюдается более резкий рост. При сушке чистым азотом удельный расход должен быть минимальным, однако для замкнутого цикла такой вариант нереализуем.

Отметим, что при сушке от изопропанола удельный расход парогазовой смеси меньше, чем от этанола. Это связано с теплофизическими свойствами органических паров.

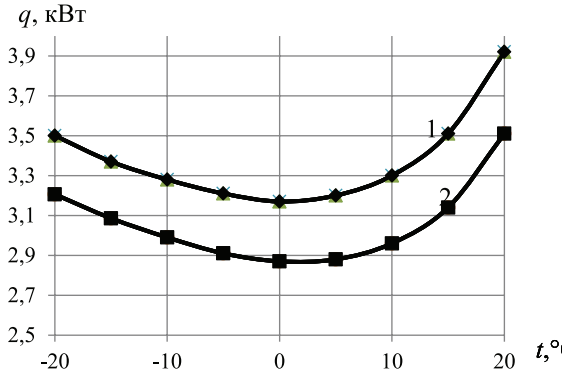


Рисунок 2. Зависимость удельного расхода теплоты q от конечной температуры конденсации для паров: 1 – этанола, 2 – изопропанола

Анализируя характер кривых 1 и 2 на рисунке 2, можно заметить, что до определённого предела температуры наблюдается кажущийся парадокс: меньшим температурам соответствует меньшая теплота на нагрев парогазовой смеси. Этот факт можно объяснить следующим образом. При более высоких конечных температурах конденсации содержание пара в азоте увеличивается. Пары органических жидкостей обладают более высокой энтальпией, чем азот. При уменьшении паросодержания (понижении температуры конденсации) энтальпия паров не имеет существенного значения, и удельный расход теплоты увеличивается.

Наличие минимума на кривых 1 и 2 рис. 2 означает, что существует температура, при которой удельная теплота нагрева принимает минимальное значение. Эта температура и является оптимальной (t_{opt}). Для смеси азота с этанолом t_{opt} = 0°С (кривая 1), для смеси азота с изопропанолом t_{opt} = 2,5°С (кривая 2). Заметим, что при сушке от этанола количество теплоты несколько больше, чем при сушке от изопропанола, что также связано с теплофизическими свойствами органических паров.

На рисунке 3 представлена построенная в среде Matcad диаграмма циклического процесса сушки фармацевтической субстанции от этанола при оптимальной конечной температуре конденсации. Кривая насыщения показана жирной линией. Диаграмма построена в координатах температура – паросодержание. Точка 0 соответствует оптимальной конечной температуре конденсации. Отрезок 0-1 соответствует нагреву парогазовой смеси в калорифере. Отрезок 1-2 – состоянию парогазовой смеси в сушилке. Отрезок 2-3 – частичному охлаждению смеси в пылеулавливающей аппаратуре

и доохлаждению её до температуры росы в парциальном конденсаторе. Линия 3-0 проходит по линии насыщения и соответствует парциальной конденсации паров этанола в парциальном конденсаторе.

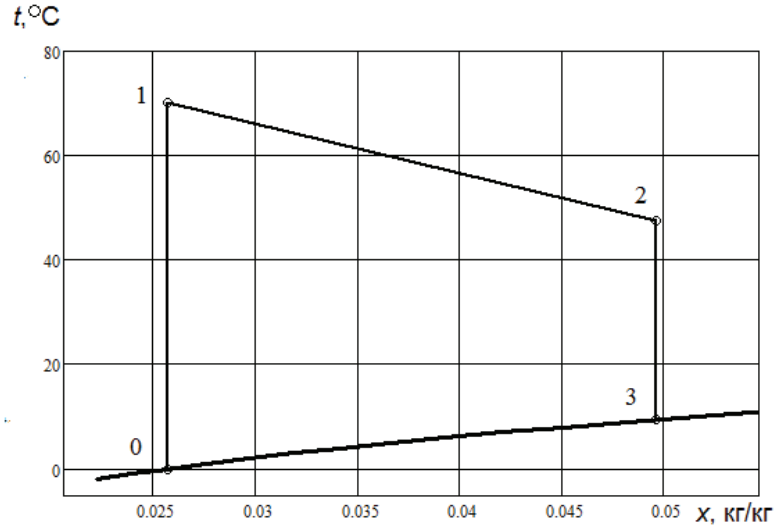


Рисунок 3. Диаграмма состояния парогазовой смеси (азота и этанола) в замкнутом сушильном цикле при оптимальной конечной температуре конденсации

Используя построенную диаграмму, можно определить важные для сушки параметры в любой точке цикла.

На основе проведенных расчетов установлена оптимальная конечная температура при конденсации паров для изопропанола и для этанола из смеси с азотом. Найденная оптимальная температура соответствует минимальным затратам тепловой энергии на нагрев парогазовой смеси при сушке в замкнутом цикле азота. Для оптимальной температуры построена диаграмма состояния парогазовой смеси этанола в азоте для циклического процесса сушки. Результаты работы могут быть полезны при проектировании установок данного типа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муштаев ВИ, Ульянов ВМ. Сушка дисперсных материалов. Москва: Химия, 1988.
2. Нестеров АВ. Сушка [Интернет]. Санкт Петербург, 2020. Доступно по: http://processes-apparates.ru/files/Nest_20.04.07.pdf [Доступ 09 март, 2021].
3. Рид Р, Праусниц Дж, Шервуд Т. Свойства газов и жидкостей. Ленинград: Химия, 1982.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE FINAL CONDENSATION TEMPERATURE OF STEAM FROM A STEAM-GAS MIXTURE DURING DRYING IN A CLOSED CYCLE OF A COOLANT

Podivilova E.A., **Savvi K.I.**, 3rd year students, **Fridman N.A.**, 2nd year undergraduate
Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

For the drying process in a closed nitrogen cycle, the specific nitrogen consumption and the specific heat consumption are calculated depending on the final condensation temperature of ethanol vapors and isopropanol vapors. It was found that the specific nitrogen consumption decreases monotonically with decreasing temperature. At a certain (optimal) value of the final temperature, a minimum of the specific heat consumption is observed. For the optimal mode, a diagram of the state of the steam-gas mixture in a closed cycle is constructed.

Key words: *drying from organic liquid, drying in a closed cycle, partial condenser, energy consumption for drying.*

REFERENCES

1. Mushtayev VI, Ul'yanov VM. Drying of dispersed materials. Moscow: Chemistry, 1988 (in Russ)
2. Nesterov AV. Drying [Internet]. Saint Petersburg, 2020. Available at: http://processes-apparates.ru/files/Nest_20.04.07.pdf. [Accessed 09 March 2021]. (in Russ).
3. Reed R, Prausnitz J, Sherwood T. Properties of gases and liquids. Leningrad: Chemistry, 1982 (in Russ).

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОЭМУЛЬСИЙИ НАНОЭМУЛЬСИЙ ДЛЯ МЕСТНОЙ И ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Попов О.Р., магистрант 1 года обучения, **Ногаева У.В.**, асп. 1 года обучения
Руководитель: **Шиков А.Н.**, докт. фарм. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: popov.oleg@pharminnotech.com

Микроэмульсии и наноэмульсии представляют собой стабильные коллоидные дисперсии, состоящие из масла, воды, поверхностно-активного вещества и вспомогательного поверхностно-активного вещества. На данный момент проведено большое количество исследований, подтверждающих возможность использования этих композиций в качестве средств для местной и трансдермальной доставки лекарственных веществ. В представленном обзоре дана общая характеристика микро- и наноэмульсий, описаны их основные достоинства и недостатки, охарактеризованы способы получения таких систем, а также приведены исследования, доказывающие целесообразность применения этих композиций для местной и трансдермальной доставки некоторых лекарственных веществ.

Ключевые слова: *микроэмульсия, наносистема, наноэмульсия, трансдермальная доставка, местная доставка, лекарственное средство.*

Кожа покрывает всё тело человека, она представляет собой многослойный барьер между организмом и внешней средой [1,2]. Благодаря своему строению и составу, кожа защищает человека от воздействия механических, физических, химических и биологических факторов. Роговой слой эпидермиса, являющийся главным компонентом физического барьера, за счёт структуры клеточного рогового конверта регулирует проницаемость и влажность кожного покрова, а также трансэпидермальную потерю воды.

Соединения, которые успешно диффундируют через роговой слой, обычно являются относительно небольшими (примерно до 500 Да), липофильными (logP 1-3) и водорастворимыми. Однако многие потенциально полезные терапевтические соединения не отвечают заданным свойствам [3].

Так, установлено, что около 40% новых активных фармацевтических субстанций (АФС) мало растворяются в воде [4]. Это вызывает трудности при разработке новых лекарственных средств для местного и трансдермального применения. Однако исследования показали, что использование ряда микро- и наносистем, в особенности микро- и наноэмульсий, позволяет получить систему доставки с высокой биодоступностью при малых концентрациях действующих веществ, а также возможностью их контролируемого высвобождения. Таким образом, представляется актуальным рассмотреть системы, позволяющие решить проблему невозможности эффективного использования ряда лекарственных веществ путем местной и трансдермальной доставки.

Целью данного обзора является представление общей характеристики микро- и наноэмульсий, их преимуществ, способов получения данных композиций, а также обоснование возможности применения данных систем для местной и трансдермальной доставки различных классов лекарственных веществ.

1. Наноэмульсии и микроэмульсии

1.1. Общая характеристика микро- и наноэмульсий

Микроэмульсии – это прозрачные, монофазные, оптически изотропные и термодинамически стабильные коллоидные дисперсии, состоящие из масла, воды, поверхностно-активного вещества (ПАВ) и иногдавспомогательного ПАВ с размерами капель вдиапазоне 10-100 нм [5].

Наноэмульсии – прозрачные, монофазные, оптически изотропные и кинетически стабильные коллоидныедисперсии, состоящие из масла, воды, ПАВ и вспомогательного ПАВ с размерами капель менее 100 нм.

Под приставкой «микро-» обычно понимают значения соответствующие 10^{-6}, в то время как приставка «нано-» обозначает 10^{-9}. Согласно определению, наноэмульсии должны содержать частицы меньшего размера, чем в микроэмульсии. Иногда на практике бывает наоборот: частицы в микроэмульсии меньше, чем в наноэмульсии [6]. Сравнительная характеристика рассматриваемых систем представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнение свойств макроэмульсий, микроэмульсий и наноэмульсий [5]

Показатель	Макроэмульсия	Микроэмульсия	Наноэмульсия
Физическое описание	Грубая дисперсия	Коллоидная дисперсия	Коллоидная дисперсия
Размер капель	>500 нм	<100 нм	<100 нм
Термодинамическая стабильность	Нестабильна	Стабильна	Нестабильна
Отношение ПАВ к маслу	Низкое	Высокое	Умеренное
Внешний вид	Мутная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость

1.2. Преимущества и недостатки микро- и наноэмульсий

Микроэмульсии и наноэмульсии обладают рядом характеристик, благодаря которым они могут использоваться для доставки лекарственных веществ. Однако их сложная природа вносит некоторые ограничения по применению. Таблица 2 отражает наиболее важные преимущества и недостатки микро- и наноэмульсий.

Таблица 2 – Преимущества и недостатки микроэмульсий и наноэмульсий [7]

Преимущества	Недостатки
• Введение лекарственной субстанции в жидкой форме; • Высокая биодоступность и стабильность благодаря небольшим размерам капель; • Растворяют и доставляют, как гидрофильные, так и липофильные лекарственные вещества; • Образуются спонтанно	• Не подходят для веществ нерастворимых в гидрофильной и липофильной фазах; • В состав входят поверхностно-активные вещества; • Чувствительны к изменениям температуры

1.3. Методы получения микро- и наноэмульсий

Выбор правильного способа получения имеет большое значение для формирования и дальнейшей стабильности микро- и наноэмульсий. Такие системы могут быть получены как высокоэнергетическими методами в случае наноэмульсий, высоко- и низкоэнергетическими в случае микроэмульсий [8].

Под высокоэнергетическимиметодами подразумевается использование механических устройств: микрофлюидизатора, гомогенизатора высокого давления или ультразвуковой установки, которые генерируют усилия, способные образовывать очень мелкие капли масла [9].

Низкоэнергетические методы связаны со сложными межфазными гидродинамическими явлениями и зависят от свойств и состава системы. Такие методы включают в себя спонтанную эмульгацию, метод фазовой инверсии и метод удаления растворителя [10].

1.3.1. Высокоэнергетические методы получения эмульсионных систем

Гомогенизация под высоким давлением широко используется для получения наноэмульсий. Этот метод использует такие силы, как гидравлический сдвиг, интенсивная турбулентность и кавитация. При гомогенизации для получения наноэмульсии смесь масляной и водной фаз, включая поверхностно-активные вещества и вспомогательные поверхностно-активные вещества, пропускают через небольшое отверстие гомогенизатора под высоким давлением от 500 до 5000 фунтов на квадратный дюйм.

Микрофлюидизация использует объемный насос высокого давления, работающий при давлении, до 20000 фунтов на квадратный дюйм. Под действием насоса капли макроэмульсии состоящей из масла, воды и смеси ПАВ, проходят через микроканалы после чего сталкиваются с высокой скоростью, в результате образуются нано- и микроэмульсии с малым размером капель.

Метод ультразвукового эмульгирования подразумевает использование излучателя ультразвуковых волн, которые посредством кавитационных сил разрушают макроэмульсию. Варьируя параметры, при данном методе возможно получать микро- и наноэмульсии с заданными параметрами [11].

1.3.2. Низкоэнергетические методы получения эмульсионных систем

Метод фазовой инверсии использует смесь масла, воды и неионогенных ПАВ при комнатной температуре. Полиэтоксилированное ПАВ становится липофильным, вследствие дегидратации, и солюбилизуется в маслянистой фазе. Это приводит к инверсии фазы и замене эмульсии типа масло в воде на эмульсию типа вода в масле, последующее резкое изменение температуры предотвращает коалесценцию и происходит образование стабильных микроэмульсий [10].

При методе с удалением растворителя масляную фазу растворяют в смешивающихся с водой органических растворителях, таких как ацетон, этанол. После чего органическую фазу приливают в водную фазу, содержащую поверхностно-активное вещество, в результате чего образуется микроэмульсия. Далее органический растворитель удаляется из полученой микроэмульсии[11].

Метод спонтанной эмульгации является наиболее привлекательным для получения нано- и микроэмульсий в лабораторных условиях. Эмульсии данным методом получают путем постепенного добавления воды при постоянной температуре и непрерывном перемешивании в смесь масла и поверхностных веществ, в результате чего происходит образование микроэмульсии[11].

2. Целесообразность использования микро- и наноэмульсий для трансдермальной и местной доставки лекарств

2.1. Противовоспалительные препараты

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) представляют группу разнородных соединений со сходными биологическими возможностями: все НПВП, за счёт ингибирования циклооксигеназы 2 типа и следующего за этим блока синтеза простагландинов, уменьшают или устраняют покраснение, отёк, повышенную температуру и боль, вызванные различными воспалительными стимулами [12].

Наружное применение НПВП рекомендуется при лечении ряда заболеваний, например, при терапии остеоартроза, с целью преодоления системных побочных эффектов, в том числе ульцерогенного действия [13].

Использование микроэмульсии приводило к восьмикратному повышению содержания препарата в плазме крови по сравнению с уровнем, полученным в результате применения макроэмульсии Вольтарен эмульгель.

Фармакокинетические исследования на крысах показали, что локальное нанесение микроэмульсии с диклофенаком способствовало более длительному сохранению концентрации АФС в плазме крови, чем в случае подкожного введения диклофенака. Наблюдался постоянный уровень АФС 0,7–0,9 мкг/мл в течение не менее 8 ч, в то время как подкожное введение приводило к пиковому уровню в плазме 0,94 мкг/мл через 1 ч после введения. Представленные данные свидетельствуют о сопоставимой биодоступности микроэмульсионной и подкожной форм диклофенака. Однако продолжительность сохранения концентрации выше в случае нанесения микроэмульсии.

Фармакокинетические профили диклофенака после местного применения в виде микроэмульсии и в макроэмульсии Вольтарен эмульгель по сравнению с подкожной инъекцией препарата представлены на рисунке 1 [14].

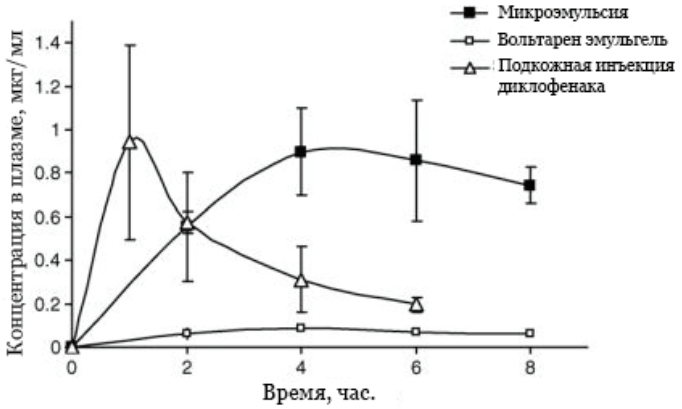


Рисунок 1. Фармакокинетические профили диклофенака после трансдермального введения микроэмульсии, нанесения лекарственной эмульсии эмульгеля по сравнению с подкожным введением препарата для крыс

2.2. Местные анестетики

Учёные из Университета имени Бен-Гуриона (Израиль) А. Синтов и Л. Шапиро проводили исследования по накоплению лидокакина в слоях кожи крыс после применения микроэмульсии в течение 10, 30 и 60 минут. Были полученные данные, согласно которым микроэмульсионный состав способствовал повышению концентрации лидокаина в эпидермисе и дерме крыс по сравнении с кремом ЭМЛА® уже спустя 30 минут после нанесения. Накопление лидокаина в эпидермисе и дерме крыс после нанесения составов показано на рисунке 2 [15].

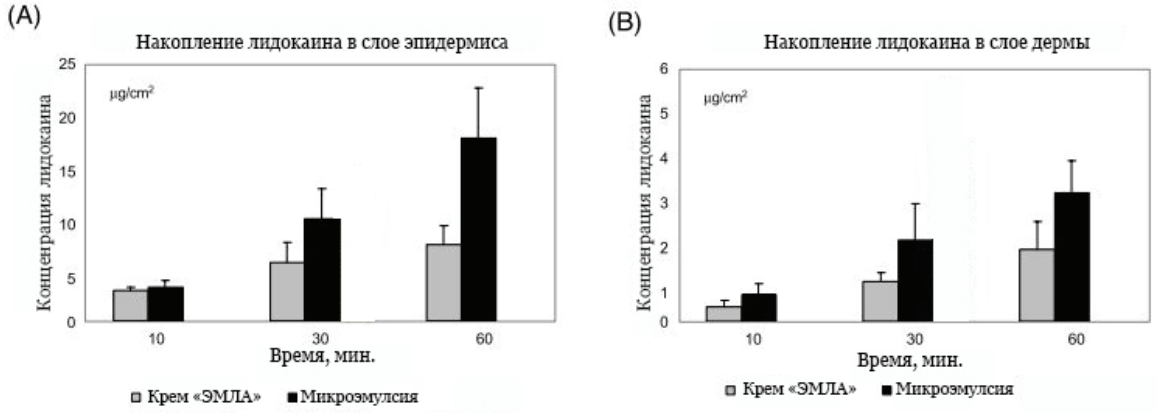


Рисунок 2. Распределение и накопление лидокаина в коже крыс после нанесения жидкой микроэмульсии и крема ЭМЛА

Проведённый обзор литературы свидетельствует о перспективах использования таких наносистем, как микроэмульсии и наноэмульсии. Рассмотренные композиции обладают рядом свойств, позволяющих использовать их в качестве средств местной и трансдермальной доставки как липофильных, так и гидрофильных лекарственных веществ.

На сегодняшний день существует ряд способов получения подобных систем, поэтому можно выбрать наиболее подходящий для их производства, как в лабораторном, так и в промышленном масштабах. Ряд исследований подтверждает усиление проникновения и биодоступности ряда лекарственных веществ с точки зрения местной и трансдермальной доставки при введении их в виде микроэмульсий в сравнении с представленными на рынке лекарственными средствами, содержащими такие же вещества.

Таким образом обобщенные в рамках этой работы результаты исследований, могут помочь исследователям в разработке новых фармацевтических препаратов для трансдермальной и местной доставки на основе микро- и наноэмульсий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feingold KR, Schmuth M, Elias PM. TheRegulationofPermeabilityBarrierHomeostasis. JournalofInvestigativeDermatology [Internet]. Elsevier BV. 2007 Jul;127(7):1574–6. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700774

2. Li J, Xu W, Liang Y, Wang H. The application of skin metabolomics in the context of transdermal drug delivery. Pharmacological Reports [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2017 Apr;69(2):252–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.10.011.

3. Roberts M, Mohammed Y, Pastore M, et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. Journal of Controlled Release [Internet]. Elsevier BV. 2017 Feb;247:86–105. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.022.

4. He C-X, He Z-G, Gao J-Q. Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. Expert Opinionon Drug Delivery [Internet]. Informa Healthcare; 2010 Mar 4;7(4):445–60. Available at: http://dx.doi.org/10.1517/17425241003596337

5. Nastiti C, Ponto T, Abd E, Grice J, Benson H, Roberts M. Topical Nanoand Microemulsions for Skin Delivery. Pharmaceutics [Internet]. MDPI AG. 2017 Sep 21;9(4):37. Available at: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics9040037

6. Mc Clements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, andsimilarities. SoftMatter [Internet]. Royal Societyof Chemistry (RSC). 2012;8(6):1719–29. Available at: http://dx.doi.org/10.1039/c2sm06903b

7. Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, Wettig SD. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications fo rmulti-drug delivery. International Journal of Pharmaceutics [Internet]. Elsevier BV. 2017 Jun;526(1-2):425–42. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.00

8. Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. Journal of Physics: Condensed Matter [Internet]. IOP Publishing; 2006 Sep 29;18(41):R635–R666. Available at: http://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/r01

9. Piorkowski DT, McClements DJ. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. Food Hydrocolloids [Internet]. Elsevier BV. 2014 Dec;42:5–41. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.009

10. Jasmina H, Džana O, Alisa E, Edina V, Ognjenka R. Preparation of nanoemulsions by high-energy and lowenergy emulsification methods. Cmbebih 2017 [Internet]. Springer Singapore; 2017;317–22. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-4166-2_48.

11. Date AA, Desai N, Dixit R, Nagarsenker M. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. Nanomedicine [Internet]. Future Medicine Ltd; 2010 Dec;5(10):1595–616. Available at: http://dx.doi.org/10.2217/nnm.10.126

12. Jahnavi K, PavaniReddy P, Vasudha B, Narender B. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: an over view. Journal of drug delivery and the rapeutics [Internet]. Society of Pharmaceutical Tecnocrats. 2019 Feb 15;9(1-s):442–8. Available at: http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v9i1-s.2287

13. Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J, Lane ME. Applicationof Microemulsionsin Dermaland Transdermal Drug Delivery. Skin Pharmacology and Physiology [Internet]. S. Karger AG. 2008;21(5):246–59. Available at: http://dx.doi.org/10.1159/000140228

14. Sintov AC, Botner S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. International Journal of Pharmaceutics [Internet]. Elsevier BV. 2006 Mar;311(1-2):55–62. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.019

15. Sintov AC, Shapiro L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. Journal of Controlled Release [Internet]. Elsevier BV; 2004 Mar;95(2):173–83. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.11.

SUMMARY

POSSIBILITIES OF APPLICATION OF MICROEMULSIONS AND NANOEMULSIONS FOR LOCAL AND TRANSDERMAL DRUG DELIVERY

Popov O.R., 1st year master student, **Nogaeva U.V.**, 1st year postgraduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Microemulsions and nanoemulsions are stable colloidal dispersions consisting of oil, water, surfactant and auxiliary surfactant. At the moment, a large number of studies have been conducted confirming the possibility of using these compositions as means for local and transdermal drug delivery through the skin. This review provides a general description of microemulsions and nanoemulsions and describes their key advantages and disadvantages, describes how to obtain them, and presents studies proving the feasibility of using these compositions for local and transdermal delivery of certain drugs.

Key words: *microemulsion, nanosystem, nanoemulsion, transdermal delivery, local delivery, drug.*

REFERENCES

1. Feingold KR, Schmuth M, Elias PM. TheRegulationofPermeabilityBarrierHomeostasis. JournalofInvestigativeDermatology [Internet]. Elsevier BV. 2007 Jul;127(7):1574–6. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700774

2. Li J, Xu W, Liang Y, Wang H. The application of skin metabolomics in the context of transdermal drug delivery. Pharmacological Reports [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2017 Apr;69(2):252–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.10.011.

3. Roberts M, Mohammed Y, Pastore M, et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. Journal of Controlled Release [Internet]. Elsevier BV. 2017 Feb;247:86–105. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.022.

4. He C-X, He Z-G, Gao J-Q. Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. Expert Opinionon Drug Delivery [Internet]. Informa Healthcare; 2010 Mar 4;7(4):445–60. Available at: http://dx.doi.org/10.1517/17425241003596337

5. Nastiti C, Ponto T, Abd E, Grice J, Benson H, Roberts M. Topical Nanoand Microemulsions for Skin Delivery. Pharmaceutics [Internet]. MDPI AG. 2017 Sep 21;9(4):37. Available at: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics9040037

6. Mc Clements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, andsimilarities. SoftMatter [Internet]. Royal Societyof Chemistry (RSC). 2012;8(6):1719–29. Available at: http://dx.doi.org/10.1039/c2sm06903b

7. Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, Wettig SD. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications fo rmulti-drug delivery. International Journal of Pharmaceutics [Internet]. Elsevier BV. 2017 Jun;526(1-2):425–42. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.00

8. Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. Journal of Physics: Condensed Matter [Internet]. IOP Publishing; 2006 Sep 29;18(41):R635–R666. Available at: http://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/r01

9. Piorkowski DT, McClements DJ. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. Food Hydrocolloids [Internet]. Elsevier BV. 2014 Dec;42:5–41. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.009

10. Jasmina H, Džana O, Alisa E, Edina V, Ognjenka R. Preparation of nanoemulsions by high-energy and lowenergy emulsification methods. Cmbebih 2017 [Internet]. Springer Singapore; 2017;317–22. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-4166-2_48.

11. Date AA, Desai N, Dixit R, Nagarsenker M. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. Nanomedicine [Internet]. Future Medicine Ltd; 2010 Dec;5(10):1595–616. Available at: http://dx.doi.org/10.2217/nnm.10.126

12. Jahnavi K, PavaniReddy P, Vasudha B, Narender B. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: an over view. Journal of drug delivery and the rapeutics [Internet]. Society of Pharmaceutical Tecnocrats. 2019 Feb 15;9(1-s):442–8. Available at: http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v9i1-s.2287

13. Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J, Lane ME. Applicationof Microemulsionsin Dermaland Transdermal Drug Delivery. Skin Pharmacology and Physiology [Internet]. S. Karger AG. 2008;21(5):246–59. Available at: http://dx.doi.org/10.1159/000140228

14. Sintov AC, Botner S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. International Journal of Pharmaceutics [Internet]. Elsevier BV. 2006 Mar;311(1-2):55–62. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.019

15. Sintov AC, Shapiro L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. Journal of Controlled Release [Internet]. Elsevier BV; 2004 Mar;95(2):173–83. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.11.

ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИИ НАКОПЛЕНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА И БИОМАССЫ В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ ЖЕНЬШЕНЯ АМЕРИКАНСКОГО

Потычинская У.В., студ. 2 курса, **Бугаев А.С.**, студ. 3 курса
Руководитель: **Орехова И.А.**, канд.биол.наук, доц., **Пивоварова Н.С.**, канд.фарм.наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: ulyana.potychinskaya@spcpu.ru

Собраны литературные данные о культуре ткани женьшеня американского, получены количественные значения накопления белка и биомассы в процессе роста.

Ключевые слова: *культура ткани, женьшень американский, белоксинтезирующая способность.*

В настоящее время признано, что фитопрепараты обладают рядом преимуществ по сравнению с химическими лекарствами. Увеличивающаяся популярность лекарственных средств растительного происхождения связана с многочисленными новыми исследованиями, подтверждающими их высокую эффективность, а также, в большинстве случаев, безопасность.

Общеизвестными лекарственными растениями, обладающими полезными свойствами, являются растения из рода Panax (женьшень). В данной работе был исследован один из самых уникальных представителей данного рода, а именно, женьшень американский *(Panax quinquefolius)*. Известно, что данный сорт обладает множеством полезных лекарственных свойств. Так доказано, что женьшень американский, в отличие от женьшеня китайского, способствует регуляции температуры тела [1], также он способствует улучшению когнитивных функций мозга [2], общего состояния иммунной системы; женьшень может понижать уровень сахара и холестерина в крови, обладает стимулирующими свойствами (показано, что женьшень помогает бороться с усталостью и повышает физическую выносливость). На протяжении многих лет его использовали при простудах, а также для улучшения пищеварения и повышения аппетита; применяли при бородавках, ангинах, артритах и других заболеваниях.

Женьшень содержит два важнейших соединения – гинсенозиды и гинтонин, которые вместе обеспечивают полезные для здоровья свойства данного растения.[3]

Важно отметить связь между метаболизмом основных (к которым относятся белки), и вторичных метаболитов: как правило, предшественники вторичных метаболитов образуются в процессах первичного обмена (Рис.1). В связи с этим, важной задачей было также определение общей белоксинтезирующей способности культуры женьшеня, которая напрямую влияет на все стороны обмена веществ.

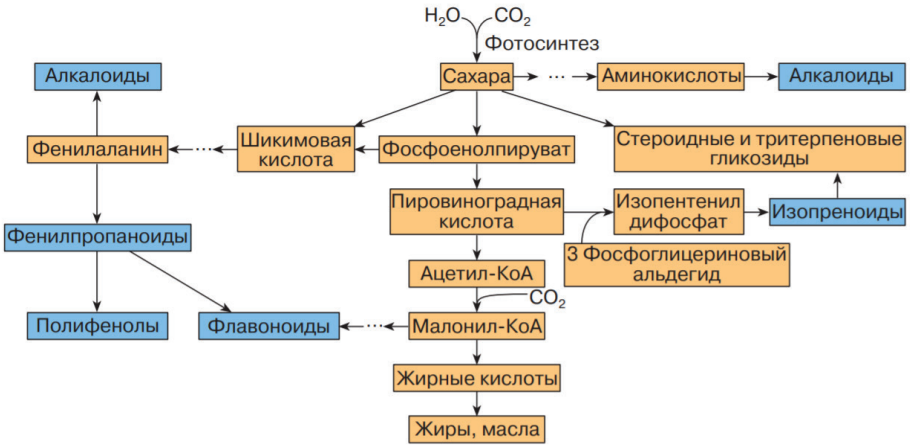


Рисунок 1. Схема путей биосинтеза основных классов вторичных метаболитов из продуктов первичного обмена (названия классов вторичных метаболитов выделены голубым цветом)

При изучении данной темы важной составляющей стал подбор необходимых для проведения исследования, а также подходящих под наши задачи, методик, с помощью которых можно определить содержание белка и накопление биомассы.

Среди всех методов определения общей белоксинтезирующей способности одним из самых чувствительных и доступных является метод определения белка по Лоури, основанный на комбинации биуретового метода и метода Фолина. Данная комбинация двух методов дает чувствительность, превышающую в 100 раз оба метода по отдельности.

Актуальность работы определена возрастающим в последнее время интересом к препаратам на растительной основе, обладающими рядом доказанных уникальных полезных для здоровья свойств.

Целью работы являлось изучение динамики накопления белка и биомассы.

В соответствии с поставленными задачами исследования проводилось: поиск литературных данных о характеристике вида женьшеня американского, его различных свойствах и применении; изучение методов определения общей белоксинтезирующей способности культуры растений.

Объектом исследования являлась культура клеток женьшеня американского *(Panax quinquefolius)*. Штамм выращивали на стандартной агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга [1], при температуре 27±1°С, относительной влажности воздуха 70% в темноте, с циклом культивирования 28 суток.

Препарат получали гомогенизацией навески растительной культуры (*Panax quinquefolius)* в охлажденной ступке с добавлением охлажденного 0,1 М калий-фосфатного буфера с pH 7,4 в соотношении 1:1. Для определения содержания белка использовали супернатант, который получали центрифугированием в течение 40 минут при температуре +4°С на 17 500 оборотов/мин. (30 130 g) в центрифуге Eppendorf 5430R. Полученный супернатант использовали для определения концентрации белка.

Общее содержание белка определяли методом Лоури. Метод основан на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорномолибдено-вольфрамового реактива (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов, интенсивность окраски которых определяют по оптической плотности при длине волны 750 нм. Реактив Фолина взаимодействует с остатками ароматических аминокислот белка, главным образом тирозина, а также триптофана и фенилаланина и, в меньшей степени, цистеина. Развитие окраски достигает максимума через 20–30 мин при комнатной температуре, в дальнейшем идет уменьшение ее интенсивности. Степень окрашивания зависит от природы белка. Поскольку различные виды белков могут давать цветные реакции различной интенсивности, испытуемый белок должен соответствовать стандартному образцу.

Ход определения: Полученный супернатант разводили в 10 раз (0,1 мл задачи на 0,9 мл воды) и в 50 раз (0,02 мл задачи на 0,98 мл воды). Перед началом готовили реактив С путем добавления к 25 мл реактива А (2 % раствора углекислого натрия в 0,1 М едком натрии) реактива В, который получили путем соединения в пробирке равных объемов (по 1 мл) растворов 2 % виннокислого натрия и 1 % сернокислой меди. Далее к 1 мл каждой из разбавленных задач добавили 5 мл реактива С. Параллельно поставили контрольную пробу: 1 мл воды, 5 мл реактива С. Через 10 минут в каждую пробирку добавили 0,5 мл реактива Фолина, тщательно перемешали и оставили при комнатной температуре на 30 минут. После этого измерили оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 750 нм в кювете на 5мм. Количественную концентрацию содержания белка определяли по калибровочному графику, для чего готовили водные растворы бычьего

сывороточного альбумина с известной концентрацией, которые определяли по описанной методике и получали значения экстинкции, соответствующие конкретным концентрациям. По калибровочной кривой рассчитывали содержание белка и выражали в мкг/мл.

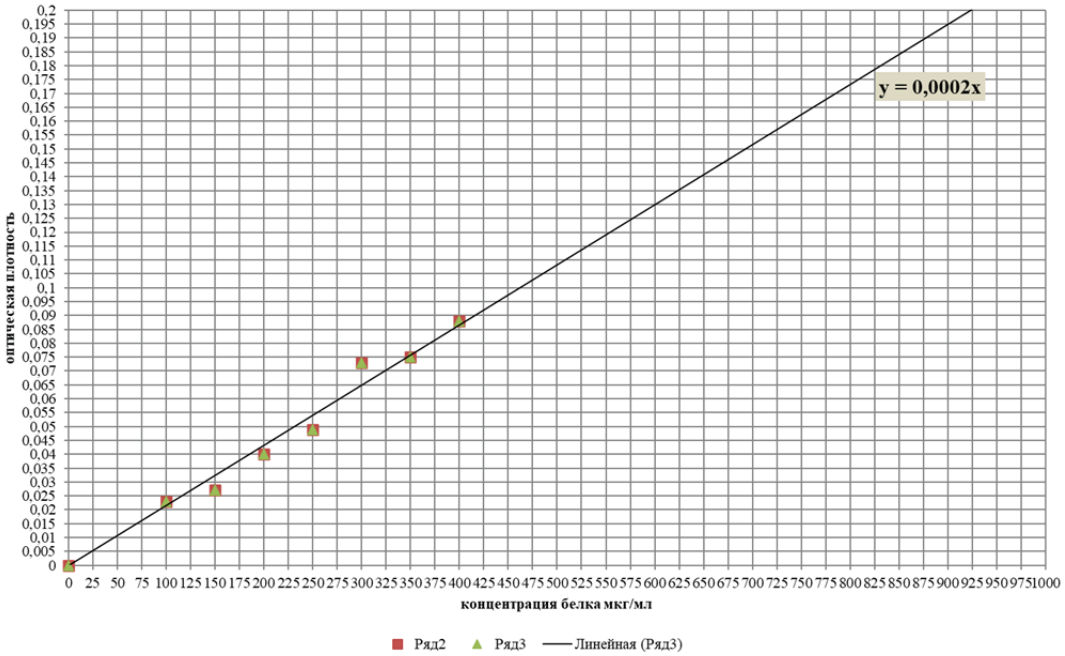


Рисунок 2. Калибровочный график зависимости концентрации белка альбумина от оптической плотности раствора

Исследования культуры клеток женьшеня американского *(Panax quinquefolius)* проводились в рамках нескольких пассажей. Внешний вид каллусной культуры женьшеня на разных сроках культивирования представлен на рис. 3.

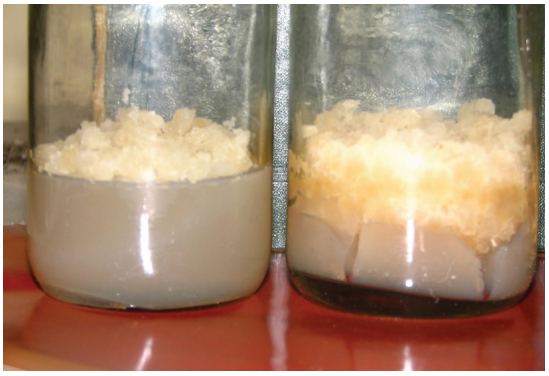


Рисунок 3. Фотография культуры клеток женьшеня американского разного возраста на питательной среде

На протяжении всего времени роста проводились измерения накопления сырой массы и массы сухих веществ, на основании полученных данных были построены графики динамики роста культуры женьшеня (рис. 4). Кривая роста характеризовалась наличием лаг-фазы на 1-2-е сутки; фазы линейного роста – 3-6 сутки; фазы замедленного роста – 7-20 сутки и стационарной фазы – 20-30 сутки. Как показано на графике (рис. 4), наибольший прирост биомассы достигался на 20 сутки от момента пересадки, в тоже время максимальная скорость роста культуры клеток наблюдалась на 11-15 сутки.

Таблица 1 – Динамика показателей роста культуры клеток женьшеня американского

Время	Сырая масса	Прирост биомассы	Индекс роста	Скорость роста	Сухая масса
сутки	г/100 мл среды	г/100 мл среды	отн. Ед.	г/сут	г/100 мл среды
0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,31
3	6,0	2,5	0,7	0,8	0,38
6	10,4	4,4	2,0	1,2	0,80
8	17,3	11,3	3,9	1,7	0,90
11	24,0	18,0	5,9	1,9	1,00
15	29,3	23,3	7,4	1,7	1,10
20	33,4	27,4	8,5	1,5	1,15
30	33,2	27,2	8,5	1,0	1,15

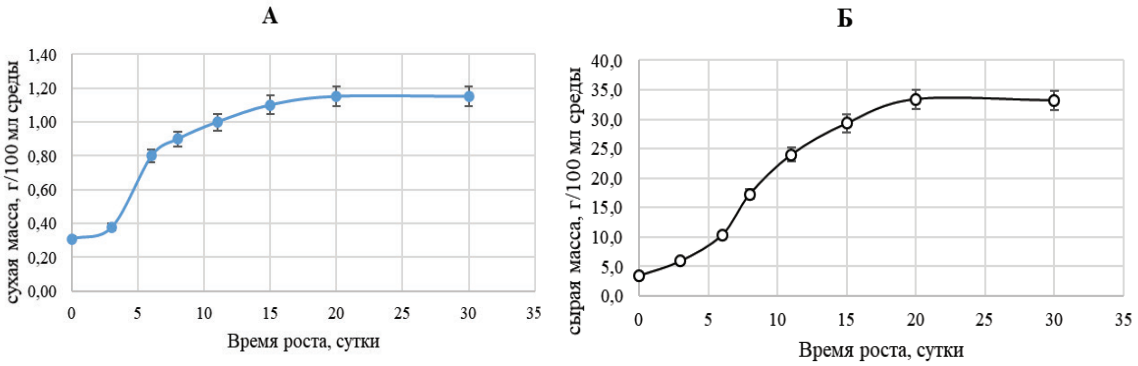


Рисунок 4. Динамика накопления А – сухих веществ; Б – сырой массы

Определение количественного содержания белка в культуре ткани *Panax quinquefolius* производилось на 7, 14, 19 и 30 сутки от момента пересадки. Анализ полученных данных показал, что с 10 по 19 сутки происходит увеличение концентрации белка, что подтверждает наиболее выраженную общую белоксинтезирующую способность культуры клеток в указанный период. Экспериментальные данные свидетельствуют об активном синтезе метаболитов основного обмена веществ, что является необходимым условием обеспечения ростовых процессов. Период с 19 по 30 сутки характеризовался снижением скорости роста ткани при незначительном снижении содержания белка вследствие перехода культуры ткани в стадию старения. Таким образом, установлена положительная корреляция между содержанием общего белка и накоплением биомассы культуры ткани *Panax quinquefolius*

Таблица 2 – Результаты количественного определения содержания белка в культуре ткани женьшеня американского методом Лоури в зависимости от возраста культуры

Возраст	7 суток		14 суток		19 суток		30 суток	
Разведение	В 10 раз	В 50 раз	В 10 раз	В 50 раз	В 10 раз	В 50 раз	В 10 раз	В 50 раз
Содержание белка в мкг/мл	512,5	107,5	580	120	657,5	135	602,5	140

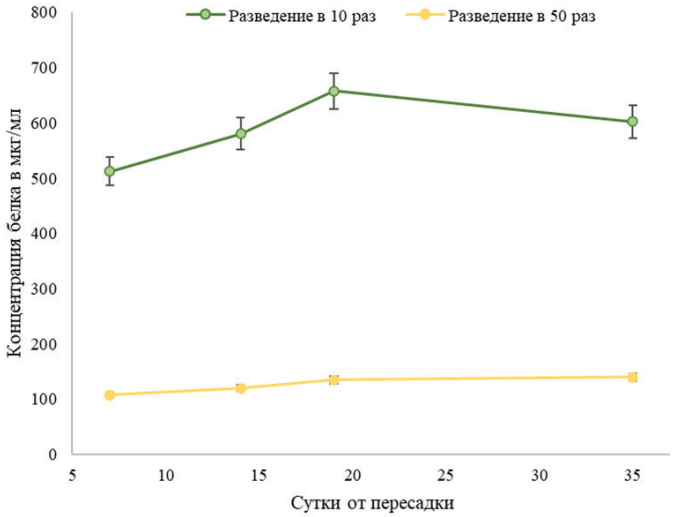


Рисунок 5. Динамика изменения содержания белка (в мкг) на 1 мл гомогената при различном разведении

Изучены литературные данные о характеристике вида женьшеня американского, а также материалы об антиоксидантной системе растений. Получены экспериментальные данные о содержании общего белка в культуре женьшеня американского в зависимости от его возраста. Выявлена положительная корреляция белоксинтетической способности и скорости роста клеток культуры ткани *Panax quinquefolius*. В дальнейшем планируется изучение характеристик антиоксидантной системы, количественная оценка параметров основного и вторичного метаболизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Park E-Y, Kim M-H, Kim E-H, Lee E-K, Park I-S, Yang D-C, et al. Efficacy Comparison of Korean Ginseng and American Ginseng on Body Temperature and Metabolic Parameters. The American Journal of Chinese Medicine [Internet]. World Scientific Pub Co Pte Lt. 2014 Jan;42(01):173–87. Available at: http://dx.doi.org/10.1142/s0192415x14500128 DOI: 10.1142/S0192415X14500128

2. Geng J, Dong J, Ni H, Wu T, Jiang K, Wang G. Ginseng for cognition. Geng J, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd. 2009 Apr 15. Available at: http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd007769 DOI: 10.1002/14651858.CD007769.pub2

3. Im D, Nah S. Yin and Yang of ginseng pharmacology: ginsenosides vs gintonin. Acta Pharmacologica Sinica [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2013 Oct 14;34(11):1367–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/aps.2013.100 DOI: 10.1038/aps.2013.100

SUMMARY

CORRELATION EVALUATION BETWEEN THE ACCUMULATION OF TOTAL PROTEIN AND BIOMASS IN THE CELLS OF THE AMERICAN GINSENG TISSUE CULTURE

Potychinskaya U., 2th year student, **Bugaev A.**, 3th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A review of the literature data on American ginseng tissue culture is carried out, and quantitative values of protein and biomass accumulation during growth were obtained.

Key words: *tissue culture, American ginseng, biomass accumulation, protein synthesis system.*

REFERENCES

1. Park E-Y, Kim M-H, Kim E-H, Lee E-K, Park I-S, Yang D-C, et al. Efficacy Comparison of Korean Ginseng and American Ginseng on Body Temperature and Metabolic Parameters. The American Journal of Chinese Medicine [Internet]. World Scientific Pub Co Pte Lt. 2014 Jan;42(01):173–87. Available at: http://dx.doi.org/10.1142/s0192415x14500128 DOI: 10.1142/S0192415X14500128

2. Geng J, Dong J, Ni H, Wu T, Jiang K, Wang G. Ginseng for cognition. Geng J, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd. 2009 Apr 15. Available at: http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd007769 DOI: 10.1002/14651858.CD007769.pub2

3. Im D, Nah S. Yin and Yang of ginseng pharmacology: ginsenosides vs gintonin. Acta Pharmacologica Sinica [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2013 Oct 14;34(11):1367–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/aps.2013.100 DOI: 10.1038/aps.2013.100

ДЕНДРИМЕРЫ КАК АКТИВНЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ И СИСТЕМЫ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Радичкина Д.А., студ. 4 курса
Руководитель: **Загорулько Е.Ю.**, канд. фарм. наук, старший преподаватель
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: radichkina.darya@pharminnotech.com

Проведен анализ научной литературы с целью выявления основных свойств дендримеров, а также возможностей их применения в составе лекарственных средств. Описаны перспективы использования дендримеров как антибактериальных и противовирусных агентов, существующие лекарственные препараты и особенности их применения в области направленного транспорта лекарственных препаратов.

Ключевые слова: *наночастицы, дендримеры, системы доставки, активная фармацевтическая субстанция, вспомогательные вещества, антимикробные свойства.*

Дендримеры – это наноразмерные молекулы, в которых атом или группа атомов окружены симметричными ветвями, известными как дендроны. Такое строение определяет их физические и химические свойства. Уникальные характеристики дендримеров, в том числе правильная сферическая структура и высокая совместимость с биологическими системами обуславливают широкий спектр их применения, который захватывает и области медицины и фармацевтической технологии. На основе дендримеров уже создано несколько лекарственных препаратов, и в настоящее время проводятся исследования по созданию молекул с заданными свойствами, которые могут обладать как собственной фармакологической активностью, так и выполнять функции систем направленного транспорта. Именно поэтому представляет интерес рассмотреть особенности этих молекул. ***Целью работы*** является характеристика строения и свойств дендримеров, методов их синтеза, а также применения в медицине и фармации [1].

Фрагмент дендримера состоит из центрального атома ядра, повторяющихся разветвленных блоков и терминальных групп, которые влияют на функциональные свойства молекул (рис. 1).

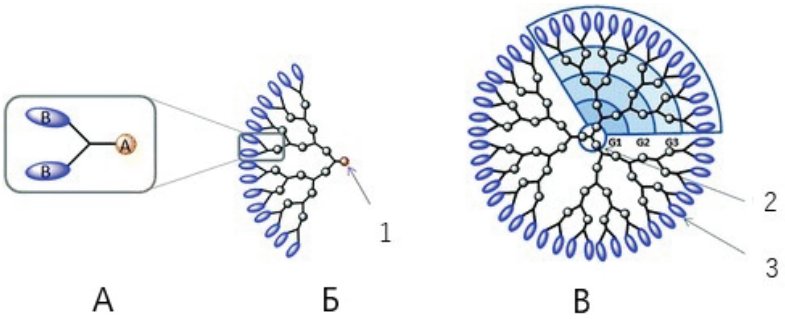


Рисунок 1. Строение дендримера:
А – полимер АБ2; Б – строение дендрона; В – дендример 4G: 1 – ядро дендримера;
2 – место разветвления; 3 – терминальные группы [3]

Физические и химические свойства дендримеров представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Свойства дендримеров [1, 3]

Свойство	Описание
Форма молекул	Сферическая глобулярная
Размер молекул	1–100 нм
Структура	Симметричная. Обеспечивается особенностями синтеза и обуславливает возможность их применения в рентгеноконтрастном анализе
Кристалличность	Аморфный материал
Химическая активность	Высоко активны. Данное свойство обуславливает зависимость структурных перестроек от pH среды и обеспечивает возможность pH-зависимой инкапсуляции лекарств внутрь дендримеров.
Растворимость	Растворимость в гидрофильных и липофильных растворителях зависит от природы терминальных групп. Например, полиамидоаминные (ПАМАМ) дендримеры имеют на поверхности амино-группы, обеспечивающие гидрофильность; в тоже время полипропилениминные (ППИ) дендримеры амфифильны, поскольку содержат концевые группы различной природы.

При синтезе дендримеров возможны два подхода: дивергентный и конвергентный. Суть дивергентного состоит в том, что сначала синтезируют отдельные ветви, которые затем конденсируют в одну молекулу. Метод заключается в многократном повторении определенного набора реакций, что позволяет «наращивать» новые слои элементарных фрагментов вокруг центрального атома-ядра. При конвергентной схеме синтеза формирование молекулы начинается с ее периферии и протекает с увеличением размеров дендронов, имеющих форму конуса. На последней стадии все полученные дендроны присоединяют к ядру (рис. 2) [2].

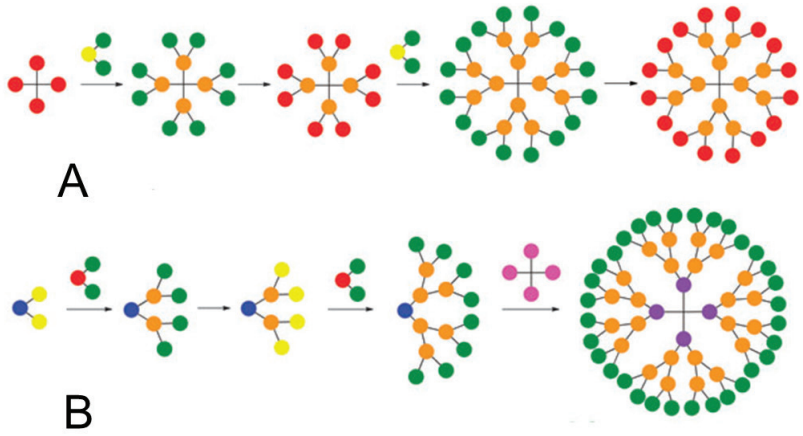


Рисунок 2. Схема дивергентного (А) и конвергентного (В) синтеза [4]

На современном этапе развития технологий дендримеры находят широкое применение в медицинской и биомедицинской областях (рис. 3).

Рисунок 3. Области применения дендримеров [5, 6]

Рассмотрим подробнее применение дендримеров в составе лекарственных препаратов – как активных фармацевтических субстанций (АФС) и систем направленной доставки. Примером АФС в форме дендримера с антимикробными свойствами является соединение SPL7013®, разработанное австралийской компанией Starpharma Holdings Limited [7]. Структура его молекулы представлена на рисунке 4 [8].

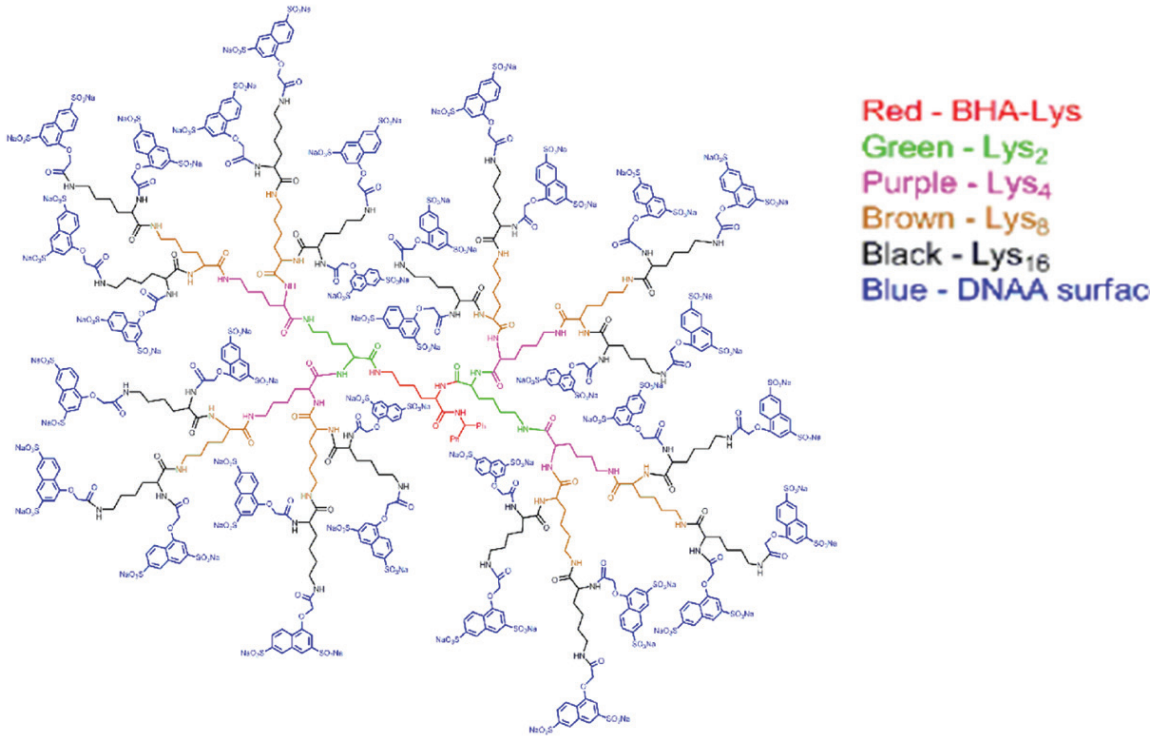


Рисунок 4. Структура молекулы SPL7013 [9]

SPL7013® представляет собой водорастворимый дендример, построенный из двухвалентного ядра бензгидриламинового амида L-лизина. К этому ядру прикрепляются четыре последовательных слоя разветвленных единиц L-лизина, создавая дендример с 32 аминовыми группами на поверхности. Доказана антимикробная активность дендримера SPL7013® в отношении *Chlamydia trachomatis, Escherichia coli, Salmonella enterica, Kelbsiella pneumoniae, Bordetella pertussis*. Механизм антибактериального действия связан с предотвращением адгезии бактерий на поверхности клеток, что позволяет препятствовать формированию биопленок. Известно противовирусное действие дендримера в отношении вируса иммунодефицита человека и вируса простого герпеса [10]. Механизм противовирусного действия заключается в инактивации вируса путем препятствования взаимодействию между вирусными поверхностными белками и клеткой человека [13]

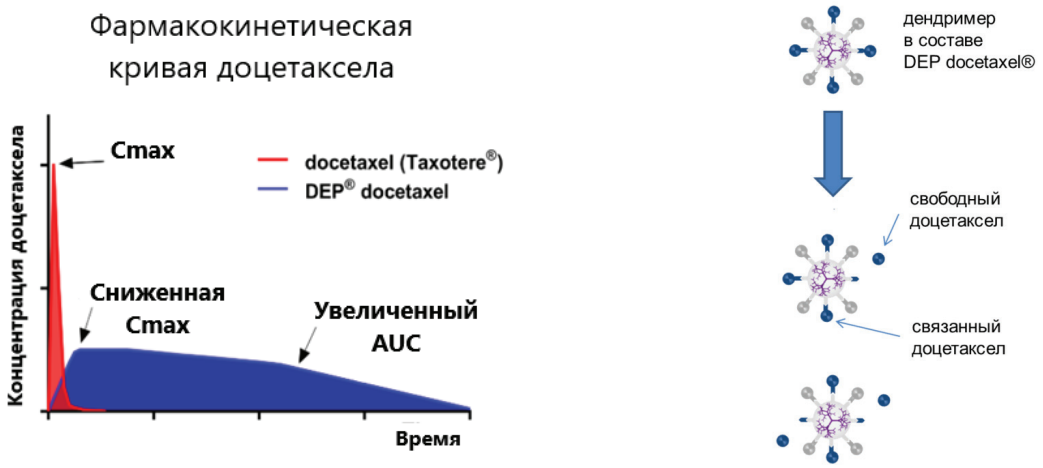
Дендример SPL7013® в 3 % концентрации входит в состав мукоадгезивного вагинального геля VivaGel® (Starpharma Ltd). Основой геля является карбомер – продукт полимеризации акриловой кислоты, буферизированный до физиологического уровня pH влагалища [11]. VivaGel® зарегистрирован как средство лечения бактериального вагиноза и профилактики рецидивирующего бактериального вагиноза на территории Европейской Экономической Зоны (ЕЭЗ) [10].

Перспективным направлением является использование SPL7013® в лечении COVID19. Последние исследования *in vitro* показали, что препарат обладает максимальной противовирусной активностью при минимальной клеточной токсичности [13].

Другим известным направлением является применение дендримеров как транспортных систем доставки лекарств. Сферическая форма молекул и возможность формирования на концах ветвей широкого спектра активных групп, позволяют использовать дендримеры в качестве носителей для соединений разной химической природы. На отдельных ветвях одной и той же молекулы могут быть иммобилизированы как действующие вещества, так и специфические лиганды, ответственные адресную доставку всей системы к определенному органу или ткани. Это обеспечивает накопление препарата в очаге поражения и, как следствие, более выраженный эффект. Использование таких таргетных систем открывает новые возможности в терапии многих заболеваний и, в первую очередь, онкологических.

Ещё одним продуктом компании Starpharma – новатора в разработке полимерных систем доставки на основе дендримеров, является препарат DEP docetaxel®, который в настоящее время проходит вторую фазу клинических испытаний [14]. Доцетаксел – один из ведущих химиотерапевтических препаратов, применяемых для лечения новообразований, включая опухоли груди, легких и простаты. В препарате DEP docetaxel® каждая его молекула иммобилизована на ветвях дендримера, а связующее звено между дендримером и АФС обеспечивает контролируемое высвобождение.

Следует отметить, что иммобилизация позволила улучшить также и растворимость доцетаксела, молекулы которого практически нерастворимы в воде (в 1 л растворяется менее 0,3 мг) [15]. Поэтому обычно в состав инфузионных препаратов доцетаксела вводят солюбилизаторы – поверхностно-активные вещества. Например, концентрат для приготовления раствора для инфузий Таксотер® (Авентис Фарма, Франция) представляет собой спиртовой раствор доцетаксела с полисорбатом-80 [16]. При этом молекулы дендримера с доцетакселом в препарате DEP docetaxel® растворимы в воде, что позволило значительно упростить состав и улучшило его биофармацевтические свойства. Результаты сравнительных исследований препаратов DEP docetaxel® и Таксотер®, полученные в ходе клинических испытаний, представлены на рисунке 5 [17, 18].



А Б

Рисунок 5. Кривая «концентрация – время» для препаратов Taxtore® и DEP docetaxel® (А) и механизм высвобождения доцетаксела из дендримера (В) [14]

На основании анализа данных, представленных на рисунке 5, установлено, сто препарат DEP docetaxel имеет более низкий уровень Cmax – максимальной концентрации вещества в крови, что существенно снижает риск развития нейтропении и ряда других побочных эффектов. Площадь под кривой «концентрация-время» AUC отражает количество вещества, достигшего системного кровотока, и следственно, чем больше AUC, тем концентрация в крови будет выше. Таким образом, приведённое исследование показывает преимущества использования лекарственной формы, содержащей дендримеры в качестве систем направленного транспорта АФС.

В работе проанализированы особенности структуры и свойств молекул дендримеров, а также рассмотрены общие подходы к их синтезу, который заключается в присоединении цепочек к центральному атому (дивергентный подход) или синтезе отдельных ветвей с последующей сборкой молекулы (конвергентный). Установлено, что основным свойством молекулы дендримера является её целостная симметричная структура с большой вариативностью концевых групп. Изменяя их, можно получать соединения с заданными свойствами – такими, как избирательная растворимость, фармакологическая активность, возможность взаимодействия со специфическими лигандами. Всё это обуславливает широкое распространение дендримеров, наиболее интересными с точки зрения фармацевтической технологии являются области их использования как АФС и транспортных систем.

В работе рассмотрен антимикробный препарат VivaGel® (Starpharma Ltd), представляющий собой 3 % гель дендримера SPL7013®, обладающего антибактериальной и противовирусной активностью. Дана характеристика препарату DEP docetaxel®, в котором молекулы дендримера используются в качестве систем направленной доставки доцетаксела к клеткам новообразований. В настоящее время данный препарат находится на второй фазе клинических исследований, а его сравнение *in vivo* с препаратом Таксотер® доказывает улучшенные биофармацевтические системы на основе дендримера.

Таким образом, разработка лекарственных препаратов и систем направленной доставки на основе дендримеров уже сейчас является востребованным направлением фармацевтической технологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pooja Mittal, Anjali Saharan, Ravinder Verma. Dendrimers. A New Race of Pharmaceutical Nanocarriers. 2021:11 DOI: https://doi.org/10.1155/2021/8844030 (дата обращения 02.03.2021)

2. Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. Nanoscale Res Lett. 2014;9:247.

3. Udayana Ranatunga, Pubudu Wimalasiri, Indika Chandrasiri. DenDrigen. 2015. Available at: https://sites.google.com/site/dendrigen/home (дата обращения 02.03.2021)

4. Meredith A. Mintzer and Mark W. Grinstaff. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. Chemical Society Reviews. 2011;40:173-190 DOI: https://doi.org/10.1039/B901839P

5. Щербин ДГ, Кляйнерт Б, Брышевска М. Дендримеры и их применение в биологии и медицине. 2008:113-117

6. Mlynarczyk DT, Kocki T, Goslinski T. Dendrimer Structure Diversity and Tailorability as a Way to Fight Infectious Diseases. Nanostructured Materials. Fabrication to Applications InTech. 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.5772/67660.

7. VivaGel®. Starpharma. 2020. Available at: https://starpharma.com/vivagel (дата обращения 08.03.2021)

8. Patravale V, Dandekar P, Jain R. Nanoparticulate drug delivery. Woodhead Publishing Limited. 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.1533/9781908818195

9. Tyssen D, Henderson SA, Johnson A, et al. Structure Activity Relationship of Dendrimer Microbicides with Dual Action Antiviral Activity. Ambrose Z, editor. PLoS ONE [Internet]. Public Library of Science (PLoS). 2010 Aug 23;5(8):e12309. DOI: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012309

10. Richard Rupp, Susan L Rosenthal, Lawrence R Stanberry. VivaGel™ (SPL7013 Gel): A candidate dendrimer – microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. 2007;2(4):561–566.

11. Clare F. Price, David Tyssen, Secondo Sonza, Ashley Davie, Sonya Evans. SPL7013 Gel (VivaGel®) Retains Potent HIV-1 and HSV-2 Inhibitory Activity following Vaginal Administration in Humans. PLoS One. 2011;6(9):e24095. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024095

12. SushamaTelwattea, Katie Moorea, Adam Johnsona, David Tyssena. Virucidal activity of the dendrimer microbicide SPL7013 against HIV-1. June 2011;90(3):195-199. DOI: https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.03.186

13. Jeremy R.A. Paulla, Alex Castellarnaua, Carolyn A. Luscombea, et al. Astodrimer sodium, dendrimer antiviral, inhibits replication of SARS-CoV-2 in vitro. 2020: 4.

14. DEP® docetaxel positive phase 1 results. 2017. Available at: https://starpharma.com/news/339 (дата обращения 03.03.2021)

15. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 2004. PubChem Compound Summary for CID 148124. Docetaxel. [cited 2021 Mar. 8]. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Docetaxel

16. Регистрационное удостоверение. Таксотер®, 2007 Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=f4eb8013-1677-4b46-9f85-7b9425fd5bc3&t (дата обращения:08.03.2021)

17. Kelly BD, McLeod V, Walker R, et al. Abstract 1716: Anticancer activity of the taxane nanoparticles, DEP®docetaxel and DEP®cabazitaxel. Clinical Research (Excluding Clinical Trials) [Internet]. American Association for Cancer Research. 2020 Aug 13. DOI: http://dx.doi.org/10.1158/1538-7445.am2020-1716

18. Song P, Huang C, Wang Y. The efficacy and safety comparison of docetaxel, cabazitaxel, estramustine, and mitoxantrone for castration-resistant prostate cancer: A network meta-analysis. International Journal of Surgery [Internet]. Elsevier BV. 2018 Aug; 56:133–40. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2018.06.010

SUMMARY

DENDRIMERS AS ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS AND TARGETED DRUG DELIVERY SYSTEMS

Radichkina D.A., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The analysis of scientific literature of the main dendrimers properties as well as the possibility of their use in the medical products has been carried. The prospects of using dendrimers as antibacterial and antiviral agents have been described. The main attention was paid to medical products and targeted transport systems based on dendrimers.

Key words: *nanoparticles, dendrimers, targeted transport systems, active pharmaceutical ingredient, excipients, antimicrobial properties.*

REFERENCES

1. Pooja Mittal, Anjali Saharan, Ravinder Verma. Dendrimers. A New Race of Pharmaceutical Nanocarriers. 2021:11 DOI: https://doi.org/10.1155/2021/8844030 (дата обращения 02.03.2021)

2. Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. Nanoscale Res Lett. 2014;9:247.

3. Udayana Ranatunga, Pubudu Wimalasiri, Indika Chandrasiri. DenDrigen. 2015. Available at: https://sites.google.com/site/dendrigen/home (дата обращения 02.03.2021)

4. Meredith A. Mintzer and Mark W. Grinstaff. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. Chemical Society Reviews. 2011;40:173-190 DOI: https://doi.org/10.1039/B901839P

5. Scherbin DG, Kleinert B, Bryszewska M. Dendrimers and their applications in biology and medicine. 2008: 113-117 (in Russ)

6. Mlynarczyk DT, Kocki T, Goslinski T. Dendrimer Structure Diversity and Tailorability as a Way to Fight Infectious Diseases. Nanostructured Materials. Fabrication to Applications InTech. 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.5772/67660.

7. VivaGel®. Starpharma. 2020. Available at: https://starpharma.com/vivagel (дата обращения 08.03.2021)

8. Patravale V, Dandekar P, Jain R. Nanoparticulate drug delivery. Woodhead Publishing Limited. 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.1533/9781908818195

9. Tyssen D, Henderson SA, Johnson A, et al. Structure Activity Relationship of Dendrimer Microbicides with Dual Action Antiviral Activity. Ambrose Z, editor. PLoS ONE [Internet]. Public Library of Science (PLoS). 2010 Aug 23;5(8):e12309. DOI: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012309

10. Richard Rupp, Susan L Rosenthal, Lawrence R Stanberry. VivaGel™ (SPL7013 Gel): A candidate dendrimer – microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. 2007;2(4):561–566.

11. Clare F. Price, David Tyssen, Secondo Sonza, Ashley Davie, Sonya Evans. SPL7013 Gel (VivaGel®) Retains Potent HIV-1 and HSV-2 Inhibitory Activity following Vaginal Administration in Humans. PLoS One. 2011;6(9):e24095. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024095

12. SushamaTelwattea, Katie Moorea, Adam Johnsona, David Tyssena. Virucidal activity of the dendrimer microbicide SPL7013 against HIV-1. June 2011;90(3):195-199. DOI: https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.03.186

13. Jeremy R.A. Paulla, Alex Castellarnaua, Carolyn A. Luscombea, et al. Astodrimer sodium, dendrimer antiviral, inhibits replication of SARS-CoV-2 in vitro. 2020: 4.

14. DEP® docetaxel positive phase 1 results. 2017. Available at: https://starpharma.com/news/339 (дата обращения 03.03.2021)

15. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 2004. PubChem Compound Summary for CID 148124. Docetaxel. [cited 2021 Mar. 8]. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Docetaxe

16. Registration certificate. Taxotere®, 2007 State registry of medicines. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=f4eb8013-1677-4b46-9f85-7b9425fd5bc3&t

17. Kelly BD, McLeod V, Walker R, et al. Abstract 1716: Anticancer activity of the taxane nanoparticles, DEP®docetaxel and DEP®cabazitaxel. Clinical Research (Excluding Clinical Trials) [Internet]. American Association for Cancer Research. 2020 Aug 13. DOI: http://dx.doi.org/10.1158/1538-7445.am2020-1716

18. Song P, Huang C, Wang Y. The efficacy and safety comparison of docetaxel, cabazitaxel, estramustine, and mitoxantrone for castration-resistant prostate cancer: A network meta-analysis. International Journal of Surgery [Internet]. Elsevier BV. 2018 Aug; 56:133–40. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2018.06.010

ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ГИГРОСКОПИЧНОСТЬ СУХОГО ЭКСТРАКТА БЕССМЕРТНИКА САМАРКАНДСКОГО

Садикова Р.К., стажер-исследователь
Руководитель: **Кариева Ё.С.**, докт. фарм. наук, проф.
Ташкентский фармацевтический институт,
100015, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Айбека, 45
E-mail: ranosadikova597@gmail.com

Проведено изучение гигроскопичности сухого экстракта бессмертника самаркандского. По методике, приведенной в Европейской Фармакопее (Ph.Eur.7.0) установлена степень гигроскопичности анализируемого экстракта. Далее гравиметрическим методом, предложенным С.А. Носовицкой, в модификации авторов изучено влияние влажности окружающей среды и площади поверхности образца на влагосорбционные свойства сухого экстракта. Согласно полученным данным анализируемый экстракт относится к категории «очень гигроскопичен» и его влагосорбционные свойства находится в линейной зависимости от изучаемых факторов.

Ключевые слова: *бессмертник самаркандский, сухой экстракт, гигроскопичность, гравиметрический метод, влажность окружающей среды, площадь поверхности образца.*

Известно, что применение лекарственных растений для профилактики и лечения тех или иных заболеваний не только эффективно, но и имеет меньший спектр побочных действий. Также суммарное содержание биологически активных ве-

ществ позволяет улучшить обменные процессы и повышает устойчивость организма к нежелательным факторам. Однако, использование лекарственных растений в виде сырья для приготовления водных настоев и отваров непрактично и требует временных затрат, также необходимо отметить малый срок их хранения, который не превышает 2-3 суток. В связи с вышеизложенным, является актуальным получение экстрактов в различных агрегатных состояниях. При этом возможно обеспечение максимального выхода биологически активных веществ, данные экстракты удобны для применения, имеют длительный срок годности и могут быть использованы в качестве для разработки препаратов в других лекарственных формах [1–4].

В Ташкентском фармацевтическом институте проведены исследования по получению сухого экстракта бессмертника самаркандского (*Helichrysum maracandicum*) методом циркуляционного экстрагирования. Целью настоящих исследований явилось изучение гигроскопичности полученного сухого экстракта.

В качестве материала исследований был выбран сухой экстракт бессмертника самаркандского, полученный методом циркуляционной экстракции. Экстракт светло-коричневого цвета с характерным травянистым запахом. По показателям качества соотвествует требованиям ГФ XIV изд. [5]

Гигроскопичность анализируемого экстракта определяли методом, приведенным в Европейской Фармакопее (Ph. Eur.7.0,vol.1 general texts 5.11) [6]; а влияние различных факторов на влагосрбционные свойства – гравиметрическим методом, предложенным С.А.Носовицкой с соавторами и модифицированным нами.

Методика определения гигроскопичности (Ph.Eur.7.0): отвешивали 1 г (т.н.) сухого экстракта, переносили в предварительно взвешенный (вместе с крышкой) бюкс высотой 15 мм и диаметром 50 мм. Бюкс с содержимым помещали в эксикатор, содержащий насыщенный раствор аммония хлорида. Эксикатор термостатировали при температуре 25 ^{0}С в течение 24 часов. По истечению указанного времени рассчитывали влагопоглощение анализируемого сухого экстракта по увеличению массы образца.

Зависимость влагосорбционных свойств экстракта от различных факторов изучали модифицированным гравиметрическим методом. В качестве переменных факторов были изучены влажность окружающей среды и площадь поверхности анализируемого образца. Для первой части исследования влажность окружающей среды создавали при помощи воды очищенной (100%) и насыщенных растворов солей. Так, раствор цинка сульфата создавал влажность 90%, раствор аммония хлорида – 79% и раствор натрия бромида – 58%. Бюксы с образцами сухого экстракта помещали в эксикаторы, содержащие вышеприведенные растворы. Эксперимент длился 10 суток, регистрация количества поглощенной влаги проводилась ежедневно в одно и то же время.

Второй этап исследования по изучению кинетики влагосорбции сухого экстракта проводили также гравиметрическим методом, различная площадь поверхности образца создавалась за счет использования бюксов разного диаметра.

Согласно Европейской фармакопее (Ph.Eur.7.0) анализируемый сухой экстракт бессмертника самаркандского относится к группе «гигроскопичных веществ», поскольку увеличение в массе составило 9,6±1,2%. (от 2% до 15%).

Результаты изучения кинетики влагосорбции экстракта от величины влажности окружающей среды отображены в виде диаграммы на рис. 1.

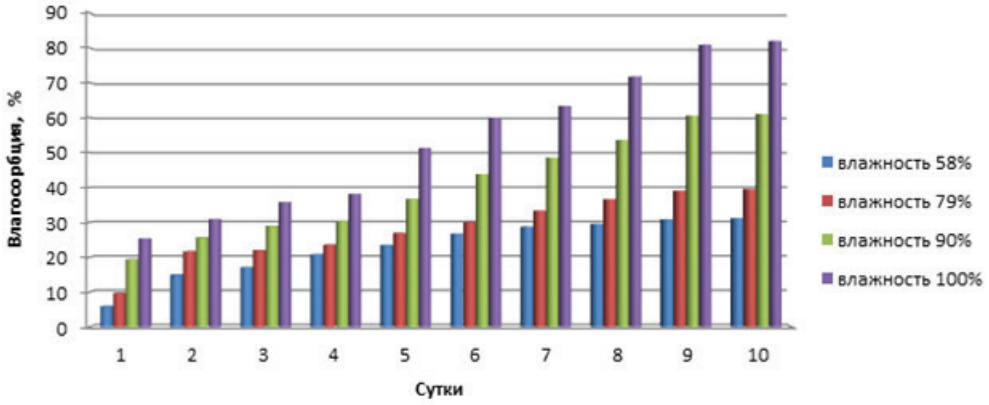


Рисунок 1. Зависимость влагосорбционной способности сухого экстракта бессмертника самаркандского от относительной влажности окружающей среды

Согласно полученным результатам, сухой экстракт бессмертника самаркандского проявляет ярко выраженные гигроскопичные свойства, которые находятся в линейной зависимости от изучаемого фактора. О линейной зависимости кинетики влагосорбции от изучаемого фактора свидетельствуют тот факт, что при одинаковых навесках количество сорбированной влаги увеличивалось с повышением относительной влажности воздуха. Так, при влажности окружающей среды, равной 58%, образец потерял свойство сыпучести ко 2-му дню исследований, а при относительной влажности 79% и 90% – к концу первых суток, сорбировав от 9,6% до 19,3% влаги, при этом образец, содержавшийся в эксикаторе со максимальной влажностью (100%) не только потерял свойство сыпучести, но и превратился в тягучую массу, поглотив 25,3% влаги. Аналогичного состояния образцы в других эксикаторах достигли к 2-му дню (90% относительная влажность), 5-му дню (79% относительная влажность), 6-му дню (58% относительная влажность).

Образец, содержащийся в эксикаторе с относительной влажностью 58% ежедневно увеличивался в массе от 1,01 до 2,57 раз и к 10-му дню эксперимента сорбировал 31,1% влаги. В эксикаторе, содержащем насыщенный раствор аммония хлорида (79% относительная влажность), масса образца возрастала в 1,01-2,25 раз, а максимальное влагопоглощение составило 39,5%. Т.е. повышение относительной влажности в 1,36 раз привело к увеличению гигроскопичности образца в 1,27 раз.

Аналогичные показатели при 90% и 100% относительной влажности составили 61,1% и 82%, соответственно. Т.е. при увеличение относительной влажности в 1,55 раз (90% относительная влажность) влагосорбция образца увеличилась в 1,96 раз, а навеска сухого экстракта в эксикаторе с водой очищенной (100% относительная влажность) поглотила в 2,64 раза больше влаги, чем образец, содержавшийся в эксикаторе с насыщенным раствором натрия бромида (58% относительная влажность).

Также нами были проведенно изучение кинетики влагосорбции сухого экстракта бессмертника самаркандского в зависимости от величины площади поверхности образца. Для задания необходимых условий проведения эксперимента нами были использованы бюксы различного диаметра: d_1=2,8 см, d_2=3,5 см, d_3=3,9 см. Площадь поверхности образцов при этом составила соответственно 6,15 см^2, 9,62 см^2, 11,94 см^2. Эксперименты проводили при относительной влажности – 58%, а время проведения эксперимента – 10 суток. Полученные результаты отображены на рисунке 2.

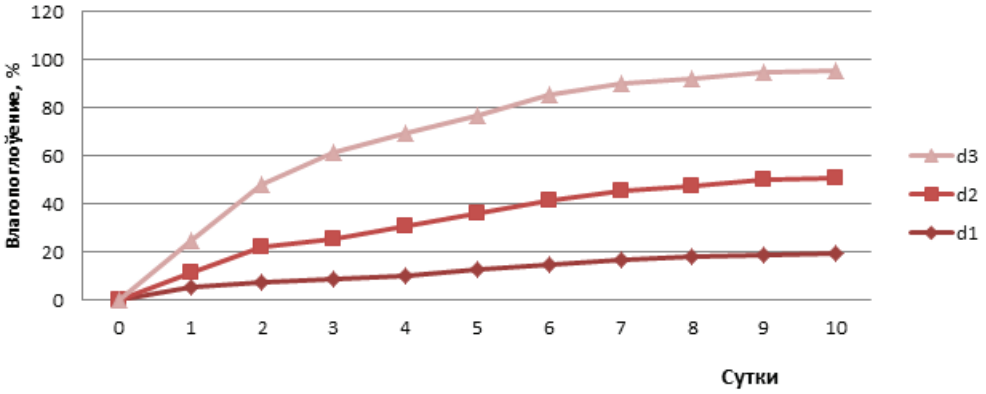


Рисунок 2. Зависимость влагосорбционной способности сухого экстракта бессмертника самаркандского от площади поверхности образца

По результатам исследований установлено, что данный фактор также оказывал существенное слияние на влагосорбционные свойства анализируемого сухого экстракта. Так, если в бюксах меньшего (6,15 см^2) и среднего (9,62 см^2) размера образцы потеряли свойство сыпучести к концу 2-го дня экспериментов, то при площади поверхности образца, равного 11,94 см^2 (бюкс большего диаметра) данное явление наблюдалось уже по окончании первых суток исследований. Различия наблюдались и в процессе перехода анализируемого сухого экстракта в тягучую жидкость, в результате поглощения большого количества влаги. Так, например в бюксах с диаметром d_1=2,8 см данный переход наблюдался к концу 5-х суток экспериментов: влагопоглощение составило 23,4%. При этом у образцов, содержащихся в бюксах с d_2=3,5 см и d_3=3,9 см, по окончании 4-х и 2-х суток (23,5% и 25,6%, соответственно).

Образец сухого экстракта бессмертника самаркандского, содержащийся в бюксе диаметром d_1=2,8 см к концу проведения эксперимента поглотил 19,5% влаги, а образец в бюксе с диаметром d_2=3,5 см – 31,1%. Таким образом, увеличение площади поверхности образца в 1,56 раз повлекло возрастания сорбированной влаги в 1,59 раз. А влагосорбция навески анализируемого сухого экстракта в третьем бюксе (d_3=3,9 см) возросла в 2,31 раз при увеличении площади образца в 1,39 раз.

Сухой экстракт бессмертника самаркандского относится к «гигроскопичным веществам» согласно Европейской фармакопее (Ph.Eur.7.0). Установлено, что кинетики влагосорбции анализируемого сухого экстракта находится в линейной зависимости от влажности окружающей среды и площади поверхности образца. Полученные результаты имеют ценность при разработке лекарственных форм на основе сухого экстракта, а также для создания необходимых условий хранения как самого экстракта, так и препаратов на его основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агбади РК, Каухова ИЕ, Вайнштейн ВА, и др. Разработка технологии сухого экстракта моринды цитрусолистной корней. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017;3(20):94-97.

2. Кухтенко АС, Бевз НЮ, Гладух ЕВ, Кухтенко ГП. Исследования по разработке жидкого экстракта бронхолитического действия. Социальная фармация и здравоохранение.2018;4:12-18.

3. Сампиев АМ, Никифорова ЕБ, Шевченко АИ. Разработка технологии получения суммарного фитопрепарата из листьев зизифуса настоящего. Медико-фармацевтический журнал пульс.2020;22(5):83-87.

4. Веселова ДВ, Лежнева ЛП, Темирбулатова АМ, Чахирова АА. Технологические исследования по разработке лапчатки прямой экстракта сухого и лекарственной формы на его основе. Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2019;1(9290):75-83.

5. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» Доступно по: http://femb.ru/femb/ pharmacopea.php

6. European pharmacopeia 7.0, vol. 1 (general texts 5/11).

SUMMARY

STUDY OF FACTORS AFFECTING THE HYGROSCOPICITY OF DRY EXTRACT OF SAMARKAND IMMORTELLE

Sadikova R.K., trainee researcher
Tashkent Pharmaceutical Institute$
45, Aybek str., Tashkent, 100015, Uzbekistan

The hygroscopicity of the dry extract of the Samarkand immortelle was studied. According to the method given in the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.7.0) the degree of hygroscopicity of the analyzed extract was established. Further, the influence of the ambient humidity and the surface area of the sample on the moisture-absorbing properties of the dry extract was studied by the gravimetric method proposed by S.A.Nosovitskaya in the modification of the authors. According to the obtained data, the analyzed extract belongs to the category «very hygroscopic» and its moisture-absorbing properties are in a linear relationship with the studied factors.

Key words: *Samarkand immortelle, dry extract, hygroscopicity, gravimetric method, ambient humidity, sample surface area.*

REFERENCES

1. Agbadi RK, Kaukhova IE, Vainshtein VA, et al. Razrabotka tehnologii suhogo ekstrakta morindy sitrusolistnoi kornei. Razrabotka i registratsiya lekarstvennix sredstv. 2017;3(20):94-97. (in Russ)
2. Kukhtenko AS, Bevz NYu, Gladukh EV, Kukhtenko GP. Issledovaniya po razrabotke jidkogo ekstrakta bronholiticheskogo deistviya. Sotsialnaya farmatsiya i zdravoohraneniye. 2018;4:12-18. (in Russ)
3. Sampiev AM, Nikiforova EB, Shevchenko AI. Razrabotka tehnologii polucheniya summarnogo fitopreparata iz listyev zizifusa nastoyashego. Medical and pharmaceutical pulse magazine. 2020;22(5):83-87. (in Russ)
4. Veselov DV, Lezhneva LP, Temirbulatova MA, Tahirova AA. Tehnologicheskie issledovanія po razrabotke lapchatki pryamoi ekstrakta suhogo i lekarstvennoi formy na ego osnove. Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennyh sredstv.2019;1(9290):75-83. (in Russ)
5. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. Volume 2. OFS.1.4.1.0021.15 «Extracts» Available at: http://femb.ru/femb/ pharmacopea.php (in Russ)
6. European pharmacopeia 7.0, vol. 1 (general texts 5/11).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОРБЕНТОВ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

Скоблева А.П., студ. 4 курса
Руководитель: **Пивоварова Н.С.**, к. фарм. наук, доц., **Шебитченко Т.С.**, ст. преподаватель
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: skobleva.aleksandra@pharminnotech.com

В работе описаны основные типы, классификация и механизмы действия сорбентов. Приведены методы определения сорбционной активности. Рассмотрены основные виды энтеросорбентов, а также их лекарственные формы.

Ключевые слова: *энтеросорбция, сорбент, сорбционная активность, тест-индикаторы.*

В современном мире человек нередко сталкивается с проблемой интоксикации организма. Быстрое выведение из организма токсинов, аллергенов, радионуклеидов и патогенных микроорганизмов может быть достигнуто при применении сорбентов. Эфферентная терапия (от латинского слова efferens - удаление) – лечение, направленное на выведение из организма различных патологических продуктов и субстратов – предполагает использование средств, обладающих высокой сорбционной активностью. Методы эфферентной терапии известны не одну тысячу лет. Уголь для наружного и внутреннего применения использовали в Египте более трех тысяч лет назад. В медицинских документациях врачей Древней Греции также присутствует описание целительных свойств энтеральных адсорбентов. В Петербурге в XVIII в., когда были открыты сорбционные свойства углей, Т.Е. Ловиц подвел теоретическую базу под метод энтеросорбции. В период второй мировой войны адсорбенты на основе лигнина широко применяли для лечения диспепсий у немецких военнослужащих. Лигниновые сорбенты успешно применялись в период чернобыльской аварии в зоне радиации [2].

Сорбенты, используемые в медицине, подразделяются на три вида, в зависимости от способа их введения в организме:

• Энтеросорбенты. Это сорбенты, которые принимают перорально (путем проглатывания). Выпускаются в форме капсул, гелей, таблеток, порошков, жидкостей.

• Средства для наружного применения. Например, присыпки и пудры, эффективные для лечения различных повреждений кожи, таких, как язвы, раны, грибковые поражения, ожоги, а также воспалительные заболевания.

• Сорбенты для внутривенного применения. Используются для очистки плазмы и крови.

Особое внимание получили энтеросорбенты. Энтеросорбенты – группа лекарственных средств, которые обладают большой адсорбционной поверхностью, являются нерастворимыми в биологической среде и интактными к слизистым оболочкам желудочно-кишечного тракта. Энтеросорбенты осуществляют связывание экзогенных и эндогенных веществ в желудочно-кишечном тракте (в том числе токсических соединений и биологически активных веществ) путем адсорбции, абсорбции, ионообмена и комплексообразования с последующим выведением данных веществ из организма [3].

Эффективность действия энтеросорбентов на организм можно оценивать по двум ключевым характеристикам, которые определяют выраженность их действия и показания к применению. К таким двум показателям относятся адсорбционная активность и способность сорбировать молекулы и бактериальные клетки разного размера и массы [9]. Первый показатель характеризует выраженность действия, второй – показания к применению.

Основные механизмы действия сорбентов.

1)Поглощение токсических веществ (микроорганизмы, яды и ксенобиотики), поступающих в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ);

2) сорбция токсических веществ, которые выделяются в просвет ЖКТ с пищеварительными соками (желчь, секрет поджелудочной железы) или секретируются слизистой оболочкой кишечника;

3) связывание токсических метаболитов, образующихся в ЖКТ (индол, скатол, фенолы, аммиак и др.);

4) фиксация и перенос физиологически активных веществ (ферменты, желчные кислоты, стероидные гормоны и т.д.), а также избирательность поглощения различных органических соединений (аминокислоты, холестерин, свободные жирные кислоты);

5) изменение объёма неперевариваемого остатка аналогично пищевым волокнам.

Дополнительные механизмы действия энтеросорбентов:

1) обволакивающее и цитопротекторное действие;

2) образование агрегатов и флокулятов, содержащих микробы и вирусы;

3) прямое бактерицидное действие;

4) комплексообразование и хелатирование;

5) модификация химического состава кишечного содержимого, неблагоприятная для размножения патогенной микрофлоры.

Существуют отдельные свойства энтеросорбентов, которые не являются отличительной особенностью данной группы, присущи многим веществам и лекарственным средствам, но производители энтеросорбентов придают им некую степень значимости. В частности, к ним относятся степень токсичности, биосовместимость с тканями, степень травматического воздействия на ткани и слизистые оболочки.

Энтеросорбенты традиционно классифицируют по нескольким признакам:

По форме выпуска: гранулы (угли), порошки (карболен, холестирамин, повидон), таблетки, пасты, пищевые добавки (пектины, хитин).

По селективности: селективные, моно-, би-, полифункциональные, неселективные (угли активированные, природные соединения – лигнин, хитин, целлюлоза).

По механизму сорбции: адсорбенты, абсорбенты, ионообменные материалы, комплексообразователи, сорбенты с сочетанием различных механизмов действия [6].

Несмотря на разнообразие торговых марок и названий сорбентов, все энтеросорбенты можно разделить на несколько групп по химической структуре и природе материала:

• на основе углерода (активированный уголь);

• соединения кремния («Белый сорбент», «Энтеросгель», «Полисорб»);

• на основе лигнина («Лактулоза+лигнин Consumed (сорбент)», «Фильтрум-сти»);

• соединения алюминия или глинистых минералов;

• на основе поливинилпирролидона («Энтеродез»)

• пищевые волокна растительного происхождения и пектины («Сорбигель», Жидкий сорбент Consumed, Жидкий сорбент для детей Consumed).

К современным сорбентам предъявляют все более высокие требования в связи с их широким применением и распространением:

1. Создание большой площади активной поверхности, что будет способствовать увеличению эффективности вследствие возможности употребления умеренных терапевтических доз.

2. В отношении токсинов белкового происхождения должны обладать высокой сорбционной емкостью.

3. Отсутствие агрессивного воздействия на желудочно-кишечный тракт, иметь подтвержденную безопасность применения (отсутствие токсичности и аллергических реакций).

4. Не должны растворяться, всасываться и не иметь системного действия.

5. Должны обладать нейтральным вкусом (т.е. не допускается наличие резких ароматических и вкусовых добавок).

6. Форма выпуска, удобная для применения.

У каждого препарата из категории адсорбентов есть свои особенности, показания к применению и противопоказания [4]. Особенно необходимо обращать внимание на последние, т.к. неправильное употребление лекарства может привести к негативным последствиям. В таблице 1. представлены наиболее известные препараты-энтеросорбенты [5].

Таблица 1 – Энтеросорбенты, наиболее широко представленные на российском рынке

Наименование	Форма выпуска	Описание
Уголь активированный	таб. 250мг №30.	При недлительном использовании данного препарата, организм очищается от вредных веществ. Работает по принципу впитывания в себя токсинов и быстрого выводения их из организма. Однако при приеме имеются побочные эффекты: нарушенное пищеварение, запор. Его не рекомендуют принимать более 2-х недель, т.к. это может привести к нарушению всасывания полезных питательных веществ и микроэлементов.
Уголь белый Актив	таблетки №30.	В состав препарата «Белый уголь» входят частицы сверхвысокодисперсного диоксида кремния, сорбента IV поколения, именно он выглядит как мелкий белый кристаллический порошок. Этот препарат не впитывает полезные вещества и воду, и, соответственно, не приводит к возникновению запора и недостатку витаминов.
Энтеросгель	паста для внутреннего применения 225г (сладкая) туба	Как и другие адсорбенты, применяется для устранения кишечных инфекций, интоксикации организма, аллергических проявлений. Он относится к препаратам нового поколения. Не вызывает обезвоживания и не выводит полезные вещества из организма.
Смекта	порошок для суспензий 3г №10 ванильный вкус	Данный препарат отличается высоким уровнем безопасности. У него нет противопоказаний для беременных и детей до 1 года. Его эффективно используют при вздутии живота, изжоге. Препарат улучшает состояние больного при гастрите, колите, язве.
Фосфалюгель	гель для внутреннего применения 16г пак. №20	Препарат обволакивает стенки ЖКТ и способен нормализовать кислотность желудка. Фосфалюгель можно применять при гастрите и язве.
Сорболонг	капсулы №10	Комплекс детоксиканта энтеросгеля с пребиотиком инулином. Получен по технологии иммобилизации инулина. При приеме Сорболонга внутрь, препарат оказывает детоксикационное действие. Препарат эффективно адсорбируется в кишечном содержимом и крови (через мембрану капилляров ворсинок слизистой оболочки кишечника) и выводит из организма среднемолекулярные токсические вещества, продукты незавершенного метаболизма, инкорпорированные радионуклиды.

Проанализировав лекарственные формы энтеросорбентов, представленных в аптечном сегменте, можно сделать вывод о том, что в настоящее время преобладают таблетки и порошки для приготовления суспензий. Однако одним из наиболее перспективных лекарственных форм являются капсулы.

Отдельный вид сорбентов – «природные сорбенты». Это средства, изготовленные из натуральных, не подвергавшихся химической обработке, компонентов, например, «Природный энтеросорбент Consumed», который не только обладает высокой сорбционной емкостью и активностью, но и оказывает комплексную поддержку желудочно-кишечному тракту [9]. Природные сорбенты относятся к БАДам. Также многие сорбенты создают на основе шрота растений. Использовать такие сорбенты можно как в промышленности для очистки, например, стоков, так и в медицине. Так в медицинских целях широко используется активированный уголь, который получают из древесного угля, полипефан на основе гидролизованного лигнина. Внимание к данной фармакологической группе увеличилось, и был разработан энтеросорбент Панасорб из шрота биомассы женьшеня, а также энтеросорбент на основе шрота семян сосны кедровой сибирской [3].

Эффективность действия энтеросорбентов зависит от площади их активной поверхности. Площадь активной поверхности обратно пропорциональна размеру частиц. Иными словами, чем меньше размеры частиц, тем больше суммарная площадь их активной поверхности и сорбционная емкость энтеросорбента. Соответственно, от сорбционной емкости зависит дозирование, которое обеспечивает должный терапевтический эффект.

Определение сорбционной активности растворов для анализа проводят при помощи красителей (метиленовый синий, конго красный, медный купорос) в зависимости от заряда, который приобретает в воде поверхность самого сорбента. Так, метиленовый синий является катионным тест-индикатором, а конго красный – анионным. Большинство сыпучих и гранулированных адсорбентов заряжаются отрицательно, поэтому на их поверхности адсорбируются красители [6].

Согласно современным представлениям, при выборе энтеросорбента необходимо иметь данные относительно структуры пористости сорбента (соотношение в энтеросорбенте пор различного радиуса и, соответственно, площадь пассивной и активной поверхности абсорбции). Это позволяет определить скорость и избирательность действия энтеросорбента, оценить площадь его активной поверхности и установить в конечном итоге удельную эффективность.

Красители адсорбируются в форме мицелл, в которых молекулы располагаются в несколько слоев, а среднее число молекул в одной мицелле увеличивается в кубической зависимости от массы окрашивающего иона в молекуле красителя [7].

В качестве маркеров адсорбции применяются вещества разной молекулярной массы и иногенности, имитирующие факторы интоксикации: метиленовый синий, конго красный, меди сульфат пентагидрат. Краситель метиленовый синий (М=320 г/моль) выбран для изучения адсорбции положительно заряженных низкомолекулярных соединений катионного типа. Отрицательно заряженные низкомолекулярные соединения изучаются с помощью анионного красителя- конго красный (М=697 г/моль). Меди сульфат (М=249,68 г/моль) моделирует отравление тяжелыми металлами: медью, хромом, ртутью и т.д [8].

Метод основан на фармакопейной статье определения сорбционной активности (ОСФ.1.2.3.0021.15). Используется спектрофотометрический метод: адсорбционную активность энтеросорбента определяется по разнице значений оптических плотностей раствора реактива до и после контакта с энтеросорбентом в течение определенного времени [6].

Таким образом, разработка природного энтеросорбента на основе шрота биотехнологического растительного сырья, а также грамотная оценка сорбционной активности полученного средства является актуальной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шиков АН, Фомичева ТИ, Бузанова ГН, Пожарицкая ОН. Материалы V Международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных средств природного происхождения». СПб. [Internet], 2001: 142–145.Available at: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=19520543

2. Хотимченко ЮС, Кропотов АВ. Применение энтеросорбентов в медицине. Тихоокеанский медицинский журнал. [Internet]. 1999: 84–89. Available at: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=32285580

3. Горелов АВ, Урсова НИ. Современный взгляд на проблему энтеросорбции. Оптимальный подход к выбору препарата. Русский медицинский журнал. [Internet]. 2006:1391–1396. Available at: https://www.rmj.ru/articles/pediatriya/Sovremennyy_vzglyad_na_problemu_enterosorbcii_Optimalynyy_podhod_k_vyboru_preparata/

4. Бабаян МЛ. Применение Смекты в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта. Русский медицинский журнал. [Internet] 2004:972–975. Available at: https://www.rmj.ru/articles/pediatriya/Primenenie_Smekty_v_lechenii_zabolevaniy_gheludochnokishechnogo_trakta/

5. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. Под ред. акад. НАН Украины А.А.Чуйко. Киев: Наукова думка, [Internet] 2003:416 Available at: https://search.rsl.ru/ru/record/01002158221

6. ГФ XIV издания. Фармакопейная статья ОФС.1.2.3.0021.15 «Определение адсорбционной активности энтеросорбентов» [Internet]. Available at: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0021-15-opredelenie-adsorbtsionnoj-aktivnosti-enterosorbentov/

7. .Николаев ВГ, Михаловский СВ, Гурина НМ. Современные энтеросорбенты и механизм их действия. [Internet]. Available at: https://szgmu.ru/files/terapy/Terap_No_04_2005.pdf#page=4

8. Балыкин ВП, Ефремова ОА, Булатов АВ. Адсорбция метиленового синего и метанилового желтого на углеродной поверхности [Internet]. 2006:7-12. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/adsorbtsiya-metilenovogo-sinego-i-metanilovogo-zheltogo-na-uglerodnoy-poverhnosti

9. Везенцев АИ, Нгуен Хоай Тьяу, Соколовский ПВ, и др. Композиционный сорбент на основе минерального и растительного сырья[Internet]. 2004:25-29 Available at: file:///C:/Users/User/Downloads/263-Текст%20статьи-723-1-10-20180219.pdf

SUMMARY

USE OF SORBENTS IN MEDICAL PRACTICE

Skobleva A.P., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The paper describes the main types, classification and mechanisms of action of sorbents. Methods for determining the sorption activity are presented. The main types of enterosorbents and their dosage forms are considered.

Key words: *enterosorption, sorbent, sorption activity, test indicators.*

REFERENCES

1. Shikov AN, Fomicheva TI, Buzanova GN, Pozharitskaya ON. Proceedings of the V International Congress "Actual problems of creating new drugs of natural origin." Saint Petersburg. [Internet], 2001: 142–145.Available at: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=19520543 (in Russ)

2. Khotimchenko YuS, Kropotov AV. The use of enterosorbents in medicine. Pacific Medical Journal. [Internet]. 1999, 84–89. Available at: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=32285580 (in Russ)

3. Gorelov AV, Ursova NI. Modern view on the problem of enterosorption. Optimal approach to the choice of a drug. Russian Medical Journal. [Internet]. 2006:1391–1396. Available at: https://www.rmj.ru/articles/pediatriya/Sovremennyy_vzglyad_na_problemu_enterosorbcii_Optimalynyy_podhod_k_vyboru_preparata/ (in Russ)

4. Babayan ML. Application of Smecta in the treatment of diseases of the gastrointestinal tract. Russian medical journal. [Internet]. 2004:972–975. Available at: https://www.rmj.ru/articles/pediatriya/Primenenie_Smekty_v_lechenii_zabolevaniy_gheludochnokishechnogo_trakta/ (in Russ)

5. Medical chemistry and clinical application of silicon dioxide. Ed. acad. NAS of Ukraine A.A. Chuiko. Kiev: Naukova Dumka? [Internet] 2003:416. Available at: https://search.rsl.ru/ru/record/01002158221 (in Russ)

6. GF XIV edition. Pharmacopoeia article OFS.1.2.3.0021.15 "Determination of the adsorption activity of enterosorbents". [Internet]. Available at: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0021-15-opredelenie-adsorbtsionnoj-aktivnosti-enterosorbentov/ (in Russ)

7. Nikolaev VG, Mikhalovsky SV, Gurina NM. Modern enterosorbents and their mechanism of action. [Internet]. Available at: https://szgmu.ru/files/terapy/Terap_No_04_2005.pdf#page=4 (in Russ)

8. Balykin VP, Efremova OA, Bulatov AV. Adsorption of methylene blue and methanyl yellow on a carbon surface. [Internet]. 2006:7-12. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/adsorbtsiya-metilenovogo-sinego-i-metanilovogo-zheltogo-na-uglerodnoy-poverhnosti (in Russ)

9. Vezentsev AI, Nguyen Hoay Tiau, Sokolovsky PV, et al. Composite sorbent based on mineral and vegetable raw materials. [Internet]. 2004:25-29Available at: file:///C:/Users/User/Downloads/263-Текст%20статьи-723-1-10-20180219.pdf (in Russ)

АЛГОРИТМ РАНЖИРОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТА В ФОРМЕ ТАБЛЕТОК ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ СПЕЦИФИКАЦИИ НА ГОТОВОЙ ПРОДУКТ

Сон А.В., преподаватель, **Зайцев С.А.**, соискатель
Руководитель: **Басевич А.В.**, к. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: andrew.son@pharminnotech.com

В настоящей работе описан подход ранжирования показателей качества препарата в форме таблеток. Целью этого подхода является формирования надлежащих спецификаций на полупродукт и готовый продукт. Основными задачами, которые решаются в рамках ранжирования показателей качества, являются: идентификация значимых показателей, которые необходимо включить в спецификацию на готовый продукт, выделение показателей, которые будут характеризовать полупродукт для внутрипроизводственного контроля, а также выявление показатели, которые являются незначимыми для данного продукта.

Ключевые слова: *алгоритм ранжирования, спецификация на полупродукт, спецификация на готовый продукт, показатели качества, значимые показатели, эффективность, безопасность.*

Спецификация – перечень испытаний, ссылок на аналитические методики и критериев приемлемости. Спецификация устанавливает набор критериев, которым должен соответствовать материал, чтобы считаться приемлемым для его предполагаемого применения [1]. Поэтому важно правильно выбрать показатели качества для включения в спецификацию на готовый продукт и полупродукт.

Описанный в настоящей работе алгоритм ранжирования показателей качества препарата в форме таблеток позволяет сформировать надлежащие спецификации на полупродукт и готовый продукт.

Для оценки показателей качества выбран инструмент ранжирования с выставлением баллов. Алгоритм ранжирования показателей качества препарата в форме таблеток включает следующие этапы:

1. Составление списка показателей для ранжирования.
2. Оценка взаимосвязи показателей качества таблеток, их эффективности и безопасности для пациентов.
3. Выставление баллов.
4. На основании полученных данных оценки (выставленных баллов) включение значимых показателей в спецификации на готовый продукт и/или полупродукт.
5. Исключение из дальнейшего рассмотрения показателей, которые не связаны с эффективностью и безопасностью для пациентов.

Основными источником для формирования списка показателей качества на готовый продукт является Государственная Фармакопея РФ текущего издания [2], руководства ЕАЭС, руководства ICH, а также Фармакопеи США, Великобритании, Европейского союза, Японии и др. Для воспроизведенных лекарственных препаратов дополнительными источниками информации могут служить монографии, частные статьи зарубежных Фармакопей, фармацевтические обзоры FDA, отчеты EMA, инструкции по медицинскому применению на препарат сравнения, сертификаты качества на препарат сравнения, патенты и др.

Типовой список показателей качества, который характеризует препарат в форме таблеток с обычным высвобождением для перорального применения, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Типовой список показателей качества таблеток

Показатель	Источник информации
Описание	ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».
Однородность массы дозированных лекарственных форм	ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».
Однородность дозирования	ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».

Показатель	Источник информации
Распадаемость	ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».
Растворение	ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».
Потеря в массе при высушивании или Вода	ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».
Микробиологическая чистота	ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».
Прочность на раздавливание	ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».
Истираемость	ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».
Элементные примеси	Руководство ICH Q3D (R1) «Элементные примеси» [3].
Тест сравнительной кинетики растворения	Решение ЕАЭК №85 от 03.11.2016 Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза [4].
Остаточные органические растворители	ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители».
Подлинность	Руководство ICH Q6A «Спецификации» [5].
Полиморфизм	ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0017.15 «Полиморфизм». Руководство ICH Q6A «Спецификации».
Количественное определение	Руководство ICH Q6A «Спецификации».
Родственные примеси	ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0023.18 «Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах». Руководство ICH Q6A «Спецификации».
Содержание стабилизатора	Решение ЕАЭК №78 от 03.11.2016 О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения [6].
Энантиомеры	Руководство ICH Q6A «Спецификации».
Запах	Фактические данные.
Геометрические параметры	Фактические данные.
Высота таблетки	Фактические данные.

После составления списка показателей, характеризующего таблетки, следующим этапом алгоритма идет оценка взаимосвязи показателей качества таблеток, их эффективности и безопасности для пациентов. Выставление баллов проводится согласно таблице 2.

Таблица 2 – Инструмент для ранжирования показателей качества

Оценка	Риск для пациента	Оценка влияния
1	Низкий	Показатель не оказывает прямого или опосредованного влияния на эффективность и безопасность готового продукта.
2	Потенциально высокий	Показатель оказывает опосредованное влияние на эффективность и/или безопасность готового продукта.
3	Высокий	Показатель оказывает прямое влияние на эффективность и/или безопасность готового продукта.

Ранжирование показателей качества, которые характеризует препарат в форме таблеток с обычным высвобождением для перорального применения, представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Ранжирование показателей качества таблеток

Показатель	Оценка	Включение показателя в спецификацию		Обоснование оценки показателя качества
		готовый продукт	полу-продукт	
Описание	1	+	+	Цвет, форма таблетки, наличие гравировки и/или риски не связаны с эффективностью и безопасностью.
Однородность массы дозированных лекарственных форм	2	-	+	Показатель связан с эффективностью с прямой зависимостью от содержания действующего вещества в таблетке: чем больше отклонение от номинальной массы, чем больше отклонение от номинального содержания.
Однородность дозирования	3	+	+	Показатель связан с эффективностью.

Показатель	Оценка	Включение показателя в спецификацию		Обоснование оценки показателя качества
		готовый продукт	полу-продукт	
Распадаемость	2	-	+	Распадаемость таблетки должна быть достаточной для обеспечения приемлемой биодоступности. Показатель вводится без оценки количества активного компонента, перешедшего в раствор.
Растворение	3	+	-	Растворение таблетки должно быть достаточным для обеспечения приемлемой биодоступности. Показатель вводится с оценкой количества активного компонента, перешедшего в раствор.
Потеря в массе при высушивании или Вода	2	+	+	Показатель включают в спецификацию, если технология производства таблеток предполагает использование влажных процессов и/или таблетки гигроскопичны и/или остаточное содержание воды оказывает влияние на физико-химические свойства таблеток.
Микробиологическая чистота	3	+	+	Показатель связан с безопасностью для пациентов.
Прочность на раздавливание	2	-	+	Прочность на раздавливание должна обеспечивать приемлемое высвобождение действующего вещества из таблетки. Таким образом, показатель связан с эффективностью.
Истираемость	1	-	+	Показатель не связан с эффективностью и безопасностью и вводится для оценки прочности таблетки к механическому воздействию.
Элементные примеси	3	+	-	Показатель связан с безопасностью для пациентов.
Тест сравнительной кинетики растворения	3	+	-	Показатель связан с оценкой эквивалентности для воспроизведенных лекарственных препаратов.
Остаточные органические растворители	3	+	-	Показатель включают в спецификацию, если технология производства таблеток предполагает использование органических растворителей. Показатель связан с безопасностью для пациентов.
Подлинность	3	+	+	Показатель связан с безопасностью для пациентов.
Полиморфизм	3	+	-	Полиморфная форма активного компонента часто связана с его растворением и биодоступностью. Показатель вводится для субстанций, которые обладают полиморфизмом, и связывают его с эффективностью.
Количественное определение	3	+	+	Показатель связан с эффективностью.
Родственные примеси	3	+	-	Показатель связан с безопасностью для пациентов.
Содержание стабилизатора	3	+	-	Стабилизатор вводят в таблетки с целью защиты активного компонента, например, от окисления. Показатель связан с эффективностью и безопасностью.
Энантиомеры	3	+	-	Если технология получения субстанции предполагает стереоселективный синтез, то в спецификацию на готовый продукт обычно включают контроль содержания энантиомеров. Показатель связан с безопасностью для пациентов.
Запах	1	-	-	Показатель не связан с эффективностью и безопасностью.
Геометрические параметры (форма, длина, ширина или диаметр таблетки)	1	-	-	Геометрические параметры (форма, длина, ширина или диаметр) таблетки определяются пресс-инструментом таблеточного пресса и не оказывают влияния на эффективность и безопасность.
Высота таблетки	2	-	+	Высота таблетки находится в обратной зависимости от ее прочности. В свою очередь, прочность таблетки должна обеспечивать приемлемое высвобождение действующего вещества из таблетки. Таким образом, высота таблетки связана с ее эффективностью.

В таблице 3 приведена оценка взаимосвязи типовых характеристик таблеток, эффективности и безопасности, а также обоснование выставленных баллов. Такой подход способствует:

1. Более глубокому пониманию связей между показателями качества, эффективностью и безопасностью для пациентов.

2. Выявлению значимых показателей, которые непосредственно связаны с эффективностью и безопасностью полупродукта и готового продукта.

Описанный в настоящей работе подход ранжирования показателей качества препарата в форме таблеток позволяет сформировать надлежащие спецификации на полупродукт и готовый продукт, проследить логику включения и обоснования включения тех или иных показателей качества в спецификации, сделать процесс создания спецификаций последовательным и прозрачным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 N916 (ред. от 18.12.2015) «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики». Доступно по: https://minpromtorg.gov.ru/docs/#!prikaz__916_ot_14062013g (дата обращения 01.03.2021).

2. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». Доступно по: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/1/index.html.

3. Руководство ICH Q3D (R1) «Элементные примеси». Доступно по: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R1EWG_Document_Step4_Guideline_2019_0322.pdf (дата обращения 01.03.2021).

4. Решение ЕАЭК №85 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411942/cncd_21112016_85 (дата обращения 01.03.2021).

5. Руководство ICH Q6A «Спецификации». Доступно по: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6A%20Guideline.pdf (дата обращения 01.03.2021).

6. Решение ЕАЭК №78 от 03.11.2016 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411969/cncd_21112016_78 (дата обращения 01.03.2021).

SUMMARY

ALGORITHM FOR RANKING QUALITY ATTRIBUTES OF A MEDICINE IN THE FORM OF TABLETS FOR FORMATION OF SPECIFICATIONS FOR A FINISHED PRODUCT

Son A.V., teacher, **Zaitsev S.A.**, applicant
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

This paper describes an approach for ranking the quality attributes of a medicine in the form of tablets. The goal of this approach is to form proper specifications for the intermediate product and the finished product. The main tasks solved within the framework of the ranking of quality attributes are: the identification of significant attributes must be included in the specification for the finished product, the selection of attributes that will characterize the intermediate product for in-process control, and also identify attributes that are insignificant for this product.

Key words: *ranking algorithm, specification of an intermediate product, specification of a finished product, quality attributes, significant attributes, efficiency, safety.*

REFERENCES

1. Order of the Ministry of Industry and Trade of Russia of June 14, 2013 N916 (as amended on December 18, 2015) “On approval of the Good Manufacturing Practice Rules”. Available at: https://minpromtorg.gov.ru/docs/#!prikaz__916_ot_14062013g [Accessed 03/01/2021]. (in Russ)

2. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. Volume 2. GPM.1.4.1.0001.15 “Dosage forms”. Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/1/index.html.

3. Guideline ICH Q3D (R1) “Elemental impurities”. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R1EWG_Document_Step4_Guideline_2019_0322.pdf [Accessed 03/01/2021]. (in Russ)

4. Decision of the EAEC No. 85 dated 03.11.2016 “On approval of the Rules for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union”. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411942/cncd_21112016_85 [Accessed 03/01/2021]. (in Russ)

5. ICH Q6A “Specifications” manual. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6A%20Guideline.pdf [Accessed 03/01/2021]. (in Russ)

6. Decision of the EAEC No. 78 of 03.11.2016 “On the Rules for the Registration and Expertise of Medicines for Medical Use”. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411969/cncd_21112016_78 [Accessed 03/01/2021]. (in Russ)

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСТРАКТА ЛАДАННИКА ШАЛФЕЕЛИСТНОГО ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НАЗАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Сретенская И.И., студ. 4 курса, **Проявина Л.В.**, студ. 4 курса
Руководитель: **Пивоварова Н.С.**, канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: sretenskaya.irina@pharminnotech.com

В работе представлены данные о перспективности использования экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) в терапии заболеваний ЛОР-органов. Проведен количественный анализ содержания основных биологически активных веществ в данном экстракте. Сумма флавоноидов в пересчете на рутин составила порядка 9,93%.

Ключевые слова: *ладанник шалфеелистный, экстракт, фитопрепараты, назальный фитоспрей, назальный гель, сумма флавоноидов.*

В настоящее время интраназальное введение лекарственных препаратов является актуальным не только для лечения острых и хронических заболеваний полости носа, но и для доставки лекарственных веществ в системный кровоток и центральную нервную систему [1]. При этом слизистая оболочка носа является перспективным неинвазивным путем для введения препаратов как для местного, так и для системного, резорбтивного действия на организм. Интраназальный способ введения обладает значимыми преимуществами, такими как быстрое наступление терапевтического эффекта и высокая биодоступность [2]. Развитая площадь поверхности и многочисленные кровеносные сосуды слизистой носа обеспечивают быстрое всасывание и попадание в мозговой, а затем и в системный кровоток многих лекарственных веществ, что позволяет избежать прохождения препарата через желудочно-кишечный тракт и печень. Поэтому, такой способ введения представляется привлекательным для широкого спектра лекарственных веществ [1, 3]. Ассортимент российского фармацевтического рынка назальных лекарственных форм представлен 14 фармакотерапевтическими группами. Зарегистрировано 122 препарата в форме спрея и всего 3 средства, которые представляют собой гель [4, 5]. При этом наблюдается дефицит назальных лекарственных форм комплексного действия на основе растительного сырья. Одним из перспективных объектов для разработки таких средств является ладанник шалфеелистный (*Cistus salviifolius*). Результаты исследований, проведённых в лабораториях Института молекулярной вирусологии (Мюнстер, Германия) и НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург, Россия), свидетельствуют о высоком противовирусном потенциале растений рода *Cistus*, в том числе экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) [6]. Экстракт также обладает бактерицидным и противовоспалительным действиями. Поэтому актуальной является разработка назальных форм на его основе. На первом этапе исследований необходимо определить оптимальные условия растворения экстракта, а также количественное содержание суммы флавоноидов.

Объектом исследования является экстракт ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*).

Для количественного определения флавоноидов в экстракте предлагается методика, основанная на их способности образовывать окрашенный комплекс с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида, который вызывает батохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения. Определение содержания суммы флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом в пересчете на рутин [7]. Основной максимум поглощения наблюдается при длине волны 418 нм. Спектры снимали на приборе СФ-2000.

Приготовлен образец 5% водного раствора экстракта ладанника шалфеелистного. В качестве сорастворителя использован пропиленгликоль, который повышает физическую стабильность исследуемого раствора. При хранении в течение 7 дней не наблюдается выпадение осадка при комнатной температуре. Значение pH 5% водного раствора составило 5,75, что соответствует физиологической норме.

Исследуемый раствор для количественного определения приготовлен следующим образом: 1 мл образца поместили в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавили 1 мл 5% раствора алюминия хлорида в 96% спирте этиловом, объем довели до метки 96% спиртом. В качестве раствора сравнения использован 1 мл образца с добавлением 1 капли уксусной кислоты, доведенный 96% спиртом до метки в мерной колбе на 25 мл. Растворы выдерживают 30 минут, затем измеряют оптическую плотность на спектрофотометре. Параллельно измеряют оптическую плотность комплекса раствора стандартного образца рутина.

Полученный спектр представлен на рисунке.

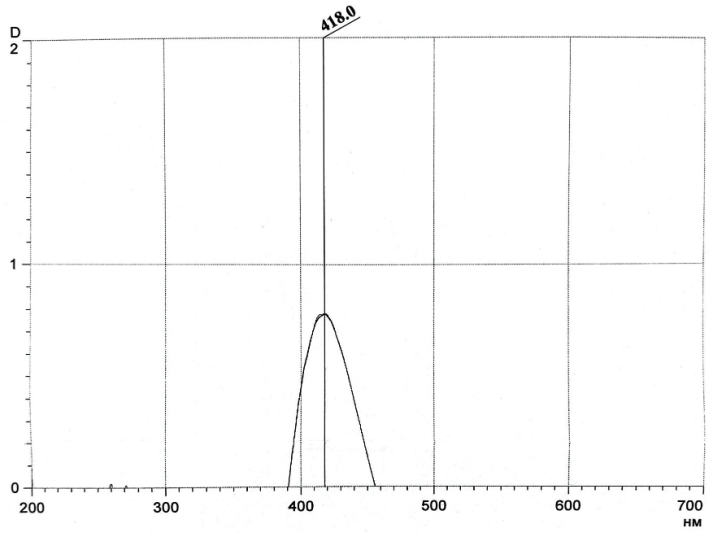


Рисунок. Электронный спектр поглощения раствора экстракта ладанника шалфеелистного с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида

Содержание суммы флавоноидов (X) в 1 г экстракта, использованного для приготовления 5% раствора, в пересчете на рутин (в процентах), вычислено по формуле [7]:

$$X = \frac{D_1 \cdot a_{ст} \cdot W_1}{D_{ст} \cdot a_1 \cdot W_{ст}} \cdot 100\%,$$

где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;
$D_{ст}$ – оптическая плотность раствора рабочего СО рутина (0,393);
$a_{ст}$ – масса навески СО рутина, г;
a_1 – масса навески испытуемого образца, г;
W_1, $W_{ст}$ – разведения навески образца и навески СО рутина соответственно.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что содержание суммы флавоноидов в экстракте ладанника шалфеелистного составляет 9,93%.

Таким образом, подтверждена перспективность использования экстракта ладанника шалфеелистного для разработки средства для терапии заболеваний ЛОР-органов. Установлено, что для получения физически стабильного раствора экстракта ладанника шалфеелистного необходимо использовать сорастворитель – пропиленгликоль. Значение pH полученного раствора – 5,75. Для количественного определения суммы флавоноидов в экстракте использован метод спектрофотометрии. Содержание суммы флавоноидов в экстракте в пересчете на рутин составило 9,93%. Дальнейшие исследования будут направлены на выбор вспомогательных веществ и разработку технологии назального фитоспрея и геля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маркс Д, Биркхофф М, Вильямс Г. Интраназальное введение лекарств – интересное прошлое и замечательное будущее. Фармацевтические технологии и упаковка. 2015;5:70–77.

2. Демина НБ, Бахрушина ЕО, Бардаков АИ, Краснюк ИИ. Биофармацевтические аспекты дизайна интраназальных лекарственных форм. Фармация. 2019;68(3):12–17. DOI: 10.29296/25419218-2019-03-02.

3. Гладкая ЮВ, Лосенкова СО, Евсеев АВ, Михеева АВ. Анализ ассортимента интраназальных лекарственных форм и прогнозы его расширения. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2018;4.

4. Кинев МЮ, Петров АЮ. Сравнительный анализ отечественного и зарубежного фармацевтических рынков спреев для носа с целью поиска перспектив дальнейшей их разработки. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018;(1):216–224.

5. Государственный реестр лекарственных средств РФ Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx (Дата обращения: 09.03.2021);

6. Изучение механизмов противовирусного действия экстракта ладанника. Отчёт о НИР, ФБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. 2020.

7. Огай МА, Степанова ЭФ, Ларионов ЛП, Петров АЮ. Идентификация и количественная оценка флавоноидов в комплексных фитопрепаратах. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2010;10(81):85–88.

SUMMARY

RESEARCH OF THE POSSIBILITY OF USING THE EXTRACT OF CISTUS SALVIIFOLIUS FOR THE DEVELOPMENT OF A NASAL DRUGS

Sretenskaya I.I., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The paper presents data on the prospects of using a extract of Cistus salviifolius in the treatment of diseases of the upper respiratory tract. A quantitative analysis of the content of the main biologically active substances in this extract was carried out. It was found that it contains about 9.93% of flavonoids in terms of rutin.

Key words: *Cistus salviifolius, extract, phytodrugs, nasal phytospray, nasal gel, flavonoids, quantitative determination.*

REFERENCES

1. Marx D, Birkhoff M, Williams G. Intranasal drug administration is an interesting past and a wonderful future. Pharmaceutical technologies and packaging. 2015;5:70–77. (in Russ)
2. Demina NB, Bakhrushina EO, Bardakov AI, Krasnyuk II. Design of intranasal dosage forms: biopharmaceutical aspects. Farmatsiya. (Pharmacy). 2019;68(3):12–17. DOI: 10.29296/25419218-2019-03-02. (in Russ)
3. Gladkaya YV, Losenkova SO, Evseev AV, Mikheeva AV. Analysis of the range of intranasal dosage forms and forecasts on its expansion. Bulletin of the Smolensk State Medical University. 2018;4. (in Russ)
4. Kinev MYu, Petrov AYu. Comparative analysis of the domestic and foreign pharmaceutical markets for the nose with the purpose of searching for future development prospects. Drug development and registration 2018;(1):216–224. (in Russ)
5. The State Register of Medicines of the Russian Federation. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx (Date of appeal: 09.03.2021) (in Russ)
6. Study of the mechanisms of the antiviral action of the Cistus extract. Research report, Saint-Petersburg Pasteur Institute, 2020. (in Russ)
7. Ogai MA, Stepanova EF, Larionov LP, Petrov AJ. Identification and quantification of flavonoids in phitopreparation complex. Belgorod State University Scientific Bulletin Medicine Pharmacy. 2010;10 81):85–88. (in Russ)

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ВАЛИДАЦИИ ПРОЦЕССА НА ОСНОВЕ СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Степанов К.С., магистрант 1 года обучения
Руководитель: **Сорокин В.В.**, канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: stepanov.konstantin@pharminnotech.com

Проведена статистическая обработка данных в программе «Minitab» с помощью построения полной квадратичной модели поверхности отклика и линейной регрессионной модели для оптимизации условий проведения процесса прямого прессования таблеток флуоксетина. Найдены оптимальные количество лубриканта, время смешивания и сила прессования.

Ключевые слова: *статистические инструменты, DoE, Minitab.*

В соответствии с «Руководством по валидации процессов» FDA США [3], валидация процесса – это сбор и оценка данных, начиная со стадии разработки процесса и во время коммерческого производства, которые устанавливают научные доказательства того, что процесс способен обеспечивать стабильное получение качественного продукта. Исходя из такого определения, можно заключить, что статистический метод имеет значимость для валидационного процесса, поскольку как сбор, так и оценка данных нуждаются в статистической обработке. Применение статистического подхода к решению задач разработки и производства лекарств позволяет достигать желаемого результата и обеспечивать качество, затрачивая при этом наименьшее количество ресурсов. Статистические методы обработки данных на этапе 1А валидации технологического процесса используются для оптимизации состава лекарственной формы, а также для выбора параметров технологического процесса.

Целью работы является проведение анализа и оптимизации данных с помощью статистических инструментов программы «Minitab» на примере технологии получения таблеток флуоксетина.

Задачами работы являются создание поверхности отклика на основе полной квадратичной модели, нахождение линейной регрессионной модели, проведение анализа полученных моделей для определения связи между зависимыми и независимыми переменными, оценка точности полученных моделей, проведение оптимизации технологического процесса.

В работе использовались статистические инструменты программы «Minitab» и ряд данных, полученных из работы «Development and optimization of fluoxetine orally disintegrating tablets using Box-Behnken design» [1].

В работе [1] для выбора состава таблеток флуоксетина рассматривается процесс оптимизации состава таблеток без учета такого важного технологического свойства, как сыпучесть порошка для таблетирования.

Сыпучесть обеспечивает способность порошка высыпаться под силой собственной тяжести или с помощью вибрации из загрузочного бункера и равномерно поступать на прессование. Материал, имеющий плохую сыпучесть, может прилипать к стенкам оборудования, что нарушает ритмичность его поступления в матрицу, что приведёт к тому, что заданная масса и плотность таблеток будут неравномерны.

Сыпучесть порошков является комплексной характеристикой, определяемой дисперсностью и формой частиц, влажностью масс, гранулометрическим составом. Эта технологическая характеристика должна быть использована при выборе состава и технологии лекарственного препарата, так как даже если состав является оптимальным с точки зрения показателей качества таблеток, плохая сыпучесть данного состава может стать препятствием к получению таблеток данного состава. Степень сыпучести можно оценить с помощью таких показателей, как индексы Хауснера и Карра.

Изготовление таблеток, содержащих гидрохлорид флуоксетина (300 мг), было проведено методом прямого прессования [1]. Масса для таблетирования состояла из флуоксетина гидрохлорида (6,67%), микрокристаллической целлюлозы (30%), кроскармеллозы натрия (4%) и высушенной распылением лактозы (до 100%). Эти вещества смешивали в течение 15 минут. Затем добавляли стеарат магния (0,5, 1 или 1,5%) и перемешивали в течение 2, 13,5 или 25 минут. После этого 100 г каждой изготовленной порошковой смеси подвергли испытанию на сыпучесть. Все полученные порошковые смеси прессовали при 5, 10 или 15 кН с использованием роторного таблеточного пресса. Результаты анализа таблеток и порошка для таблетирования представлены в таблице.

Для оптимизации состава использовали программу Minitab.

Таблица 1 – Результат DOE

№	Независимые переменные			Зависимые переменные							
				Свойства таблеток					Свойства таблеточной массы		
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8
1	1,0	25,0	15	315,5	4,22	61,78	0,09	31,01	1,24	19,57	30,10
2	1,5	2,0	10	303,3	4,22	50,01	0,33	25,97	1,33	25,00	32,72
3	1,0	25,0	5	312,1	4,65	12,75	2,14	12,42	1,25	19,79	30,54
4	1,0	2,0	5	300,9	4,55	17,65	1,13	11,42	1,31	23,50	33,10
5	1,5	13,5	5	319,2	4,73	13,73	1,96	12,53	1,27	21,54	29,92
6	1,5	25,0	10	313,5	4,3	44,13	0,38	25,68	1,26	20,83	31,60
7	0,5	2,0	10	299,1	4,24	51,98	0,32	20,07	1,47	32,18	35,39
8	0,5	13,5	5	312,3	4,76	11,77	2,5	11,89	1,31	23,81	34,77
9	1,0	2,0	15	300,2	4,08	80,41	0,06	40,88	1,33	25,00	32,41
10	1,5	13,5	15	311,5	4,18	64,72	0,16	45,45	1,28	21,88	29,48
11	0,5	13,5	15	311,1	4,2	71,59	0,16	27,98	1,30	23,10	35,14
12	0,5	25,0	10	313,6	4,37	44,13	0,32	19,13	1,35	25,81	33,25
13	1,0	13,5	10	308,3	4,29	43,15	0,19	22,29	1,24	19,44	30,98
14	1,0	13,5	10	307,5	4,27	42,17	0,2	22,02	1,25	19,89	29,78
15	1,0	13,5	10	309,2	4,31	44,13	0,18	22,78	1,24	19,47	29,92

Таблица 2 – Сведения о переменных, использованных в DOE

Переменные	Код	Единица измерения	Уровень фактора в DOE		
			Низкий (-1)	Средний (0)	Высокий (1)
Независимые переменные					
Концентрация лубриканта	X_1	%	0,5	1	1,5
Время смешивания	X_2	минута	2	13,5	25
Сила прессования	X_3	кН	5	10	15
Зависимые переменные					
Переменные	**Код**	**Единицы измерения**	**Максимум**	**Минимум**	**Цель**
Вес	Y_1	мг	299,1	319,2	300мг±5%
Толщина	Y_2	мм	4,08	4,72	Минимум
Прочность на раздавливание	Y_3	Н	11,77	80,41	Максимум

Переменные	Код	Единица измерения	Уровень фактора в DOE		
			Низкий (-1)	Средний (0)	Высокий (1)
Истираемость таблеток	Y_4	%	0,06	2,5	Минимум
Распадаемость	Y_5	секунда	11,42	45,45	Минимум
Индекс Хауснера	Y_6	-	1,24	1,47	Минимум
Индекс Карра	Y_7	%	19,44	32,18	Минимум
Угол естественного откоса	Y_8	градус	29,48	35,39	Минимум

Создание поверхности отклика. Данные DoE были введены из таблицы 1 в программу «Minitab» и в ней выбрано «Stat> DOE> Response Surface> Define Custom Response Surface Design». Выбор данного вида дизайна экспериментов обусловлен тем, что это позволяет получить и исследовать регрессионную модель с двойным взаимодействием факторов (уравнение 1), что аналогично модели, построенной в оригинальной исследовательской статье.

$$Y = a_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (1)$$

С помощью «Analyze Response Surface Design» по уравнению 1 построена поверхность отклика для Y_1-Y_8. Найденные результаты объединены в таблицу 3.

Таблица 3 – Результат «Analyze Response Surface Design»

Зависимая переменная		X_1	X_2	X_3	X_1^2	X_2^2	X_3^2	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	R-sq, %
Y_1	Уравнение регрессии	$Y_1 = 308{,}63 - 9{,}69\ X_1 + 1{,}311\ X_2 - 1{,}742\ X_3 + 10{,}78\ X_1^2 - 0{,}02763\ X_2^2 + 0{,}0998\ X_3^2 - 0{,}187\ X_1X_2 - 0{,}650\ X_1X_3 + 0{,}0178\ X_2X_3$									95,97
	P-Value	0,100	0,000	0,323	0,049	0,017	0,062	0,331	0,165	0,352	
Y_2	Уравнение регрессии	$Y_2 = 5{,}407 - 0{,}356\ X_1 + 0{,}01553\ X_2 - 0{,}1616\ X_3 + 0{,}1700\ X_1^2 - 0{,}000378\ X_2^2 + 0{,}005400\ X_3^2 - 0{,}00217\ X_1X_2 + 0{,}00100\ X_1X_3 + 0{,}000174\ X_2X_3$									98,94
	P-Value	0,232	0,007	0,000	0,075	0,046	0,001	0,523	0,896	0,606	
Y_3	Уравнение регрессии	$Y_3 = -26{,}94 - 0{,}92\ X_1 - 0{,}619\ X_2 + 10{,}099\ X_3 + 3{,}43\ X_1^2 + 0{,}02687\ X_2^2 - 0{,}1422\ X_3^2 + 0{,}086\ X_1X_2 - 0{,}883\ X_1X_3 - 0{,}0597\ X_2X_3$									99,77
	P-Value	0,222	0,001	0,000	0,386	0,011	0,011	0,596	0,052	0,011	
Y_4	Уравнение регрессии	$Y_4 = 5{,}844 - 2{,}64\ X_1 + 0{,}0719\ X_2 - 0{,}787\ X_3 + 0{,}975\ X_1^2 - 0{,}000728\ X_2^2 + 0{,}03045\ X_3^2 + 0{,}0022\ X_1X_2 + 0{,}0540\ X_1X_3 - 0{,}00426\ X_2X_3$									96,93
	P-Value	0,527	0,176	0,000	0,114	0,484	0,002	0,923	0,320	0,102	
Y_5	Уравнение регрессии	$Y_5 = 11{,}04 - 13{,}09\ X_1 + 0{,}353\ X_2 + 0{,}054\ X_3 + 1{,}76\ X_1^2 - 0{,}00068\ X_2^2 + 0{,}0664\ X_3^2 + 0{,}028\ X_1X_2 + 1{,}683\ X_1X_3 - 0{,}0473\ X_2X_3$									99,18
	P-Value	0,001	0,067	0,000	0,605	0,914	0,092	0,840	0,003	0,016	
Y_6	Уравнение регрессии	$Y_6 = 1{,}652 - 0{,}589\ X_1 - 0{,}01494\ X_2 + 0{,}0093\ X_3 + 0{,}2333\ X_1^2 + 0{,}000384\ X_2^2 - 0{,}000467\ X_3^2 + 0{,}00217\ X_1X_2 + 0{,}00200\ X_1X_3 - 0{,}000130\ X_2X_3$									92,48
	P-Value	0,014	0,008	0,904	0,010	0,017	0,458	0,411	0,735	0,614	
Y_7	Уравнение регрессии	$Y_7 = 43{,}39 - 34{,}14\ X_1 - 0{,}820\ X_2 + 0{,}422\ X_3 + 13{,}94\ X_1^2 + 0{,}02169\ X_2^2 - 0{,}0201X_3^2 + 0{,}096X_1X_2 + 0{,}105\ X_1X_3 - 0{,}0075\ X_2X_3$									93,87
	P-Value	0,012	0,004	0,830	0,005	0,012	0,526	0,474	0,727	0,572	
Y_8	Уравнение регрессии	$Y_8 = 45{,}30 - 18{,}71\ X_1 - 0{,}371\ X_2 - 0{,}123\ X_3 + 7{,}61\ X_1^2 + 0{,}00841\ X_2^2 + 0{,}0080\ X_3^2 + 0{,}0443\ X_1X_2 - 0{,}081\ X_1X_3 + 0{,}00109\ X_2X_3$									89,69
	P-Value	0,005	0,048	0,717	0,021	0,111	0,743	0,664	0,729	0,914	

Создание линейной регрессионной модели. В основе модели лежит уравнение 2:

$$Y = a_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 \quad (2)$$

Для регрессионной модели используется только часть возможных предикторов, поскольку в таком случае предсказание отклика будет с меньшей дисперсией, чем при использовании всех независимых переменных. Выбор набора предикторов (из X_1-X_3), используемых в регрессионных уравнениях для каждого отдельного отклика Y_1-Y_8, осуществлен при помощи функции «Best Subsets». Выбирается тот набор факторов, для которого величина параметр R-sq(adj) принимает наибольшее значение. Таким образом, исключаются независимые переменные, которые оказывают несущественное

влияние на отклик модели. Регрессионные модели по данным DoE из таблицы 1 были созданы через выбор в меню Minitab «Stat> Regression> Regression> Fit Regression Model» для каждой переменной Y_1-Y_8. Найденные результаты объединены в таблицу 4.

Таблица 4 – Результат «Fit Regression Model»

Зависимая переменная		X_1	X_2	X_3	R-sq, %
Y_1	Уравнение регрессии	$Y_1 = 298,79 + 2,85 X_1 + 0,557 X_2$			69,50
	P-Value	0,278	0,000	-	
Y_2	Уравнение регрессии	$Y_2 = 4,7945 + 0,00489 X_2 - 0,05025 X_3$			84,68
	P-Value	-	0,100	0,000	
Y_3	Уравнение регрессии	$Y_3 = -6,58 - 0,405 X_2 + 5,565 X_3$			97,07
	P-Value	-	0,006	0,000	
Y_4	Уравнение регрессии	$Y_4 = 2,490 - 0,1815 X_3$			67,57
	P-Value	-	-	0,000	
Y_5	Уравнение регрессии	$Y_5 = -6,99 + 7,64 X_1 - 0,110 X_2 + 2,427 X_3$			91,40
	P-Value	0,008	0,308	0,000	
Y_6	Уравнение регрессии	$Y_6 = 1,4177 - 0,0725 X_1 - 0,00370 X_2$			48,21
	P-Value	0,051	0,026	–	
Y_7	Уравнение регрессии	$Y_7 = 29,52 - 3,91 X_1 - 0,2139 X_2$			47,93
	P-Value	0,061	0,023	–	
Y_8	Уравнение регрессии	$Y_8 = 36,84 - 3,708 X_1 - 0,0884 X_2$			60,29
	P-Value	0,003	0,063	–	

Анализ полученных моделей. Исходя из полученных статистических моделей было определено, какие независимые переменные оказывают статистически значимое влияние на зависимые переменные. Для них P-Value будет меньше уровня значимости, то есть менее 0,05.

Увеличение концентрации лубриканта (X_1) ведёт к росту времени распадаемости (Y_5), снижению индекса Хауснера (Y_6), индекса Карра (Y_7) и угла естественного откоса (Y_8). Увеличение времени смешивания (X_2) приводит к повышению веса (Y_1) и толщины (Y_2) таблеток, снижению прочности на раздавливание (Y_3), индекса Хауснера (Y_6), индекса Карра (Y_7) и угла естественного откоса (Y_8). Такое влияние на вес и толщину объясняется тем, что при повышении времени смешивания лубрикант лучше распределяется по поверхности частиц таблеточной массы, что приводит к повышается текучести и соответственно более полному заполнению матриц. Увеличение силы прессования (X_1) повышает прочность на раздавливание (Y_3), временя распадаемости (Y_5), снижает толщину (Y_2) и истираемость (Y_4) таблеток.

Оценка точности полученных статистических моделей. В оригинальной исследовательской статье были рассчитаны оптимальные значения предикторов и проведен опыт с их использованием. Рассмотрим пригодность найденных нами регрессионных уравнений. Для этого были вычислены значения откликов Y_1-Y_8 и ошибки предсказания, полученные при оптимальных значениях факторов из оригинальной статьи (X_1=0,86; X_2=15,3; X_3=10,6). Результаты представлены в таблице 5. «Regression Model» предсказала опытные данные с меньшей точностью, чем «Response Surface Design», что свидетельствует о недостаточности линейной модели и необходимости применения полной квадратичной модели для более точного описания системы из-за её нелинейности.

Таблица 5 – Результат проверки адекватности предложенных моделей

Фактор	Отклик	Опыт	Statgraphics® Centurion XV		Minitab 17			
					Response Surface Design		Regression Model	
			Расчет	Ошибка, %	Расчет	Ошибка, %	Расчет	Ошибка, %
X_1=0,86	Y_1	308,2	309,15	0,31	309.12	0,30	309,76	0,50
X_2=15,3	Y_2	4,30	4,28	-0,47	4.28	-0,47	4,37	1,60
X_3=10,6	Y_3	45,11	46,09	2,13	46,09	2,13	46,22	2,40
	Y_4	0,129	0,135	4,44	0,137	5,84	0,566	77,21
	Y_5	21,6	22,4	3,57	22.4	3,57	23,6	8,47
	Y_6				1,25		1,30	
	Y_7				20,07		22,88	
	Y_8				30,74		32,30	

Поиск оптимальных условий технологического процесса. Для нахождения оптимальных параметров (X_1-X_3) выберем желаемые показатели качества таблеток (Y_1-Y_8). В соответствии с ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дози-

рованных лекарственных форм» средней вес таблеток должен быть 300 мг ± 5% (Y_1=285-315 мг). Желательно получить таблетки с минимальной толщиной. Таблетки должны иметь максимальную прочность. Согласно рекомендациям ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» примем, что прочность должна составлять не менее 40 Н ($Y_3 \geq 40$ Н). В соответствии с ОФС.1.4.2.0004.15 «Истираемость таблеток» потеря массы после испытания не должна превышать 1% ($Y_4 \leq 1\%$). Время распадаемости таблеток должно быть минимальным. Индекс Хауснера, индекс Карра и угол естественного откоса должны иметь минимальные значения.

Для оптимизации будем использовать функцию «Response Optimizer» и показатели качества Y_3, Y_4, Y_5, Y_6 и Y_8. Y_1 и Y_2 были исключены, поскольку Y_2 не является критическим показателем качества, а Y_1 возможно корректировать изменением свободного пространства матриц, регулируя положение пуансонов в период объемного дозирования порошка в полости матриц. В оптимизационную модель были включены показатели текучести таблетируемой массы, поскольку хорошая сыпучесть порошка является необходимым условием для проведения прямого прессования. Были выбраны Y_6 и Y_8, поскольку эта пара обладает наименьшей корреляцией среди Y_6-Y_8 (таблица 6) и исходя из p-value (таблицы 3, 4) Y_6 и Y_7 в большей степени зависят от X_2, в то время как Y_8 от X_1.

Таблица 6 – Результаты проверки корреляции факторов Y_6-Y_8

		Y_6	Y_7
Y_7	Коэффициент корреляции Пирсона	0,998	
	P-Value	0,000	
Y_8	Коэффициент корреляции Пирсона	0,753	0,764
	P-Value	0,001	0,001

Результаты оптимизации статистических моделей, а также значения откликов Y_1, Y_2 и Y_7 для найденных оптимальных предикторов приведены в таблице 7. В «Regression Model» полученное значение для Y_1 превысило нормированный диапазон. В рамках данной модели необходимо провести настройку таблеточного пресса, чтобы параметр Y_1 удовлетворял требованию ОФС.1.4.2.0009.15 по однородности массы.

Таблица 7 – Результат оптимизации моделей Minitab 17

Response Surface Design				Regression Model			
Фактор	**Отклик**		**95% доверительный интервал**	**Фактор**	**Отклик**		**95% доверительный интервал**
X_1=1,0	Y_1	311,24	(308,49; 314,00)	X_1=1,4	Y_1	316,66	(312,67; 320,66)
X_2=21,1	Y_2	4,24	(4,18; 4,29)	X_2=25,0	Y_2	4,25	(4,15; 4,35)
X_3=11,8	Y_3	50,18	(47,78; 52,58)	X_3=13,3	Y_3	57,22	(52,89; 61,54)
	Y_4	-0,044	(-0,382; 0,293)		Y_4	0,079	(-0,291; 0,449)
	Y_5	25,5	(23,4; 27,6)		Y_5	33,1	(28,9; 37,3)
	Y_6	1,23	(1,20; 1,27)		Y_6	1,22	(1,17; 1,28)
	Y_7	19,06	(17,10; 21,02)		Y_7	18,74	(15,73; 21,75)
	Y_8	29,97	(28,45; 31,50)		Y_8	29,48	(27,90; 31,06)

Следует учесть, что Y_4 не может быть меньше 0, а значит полученный в «Response Surface Design» показатель «Истираемость таблеток» на практике будет находиться с вероятность 95% в области от 0 до 0,293%.

Проведена статистическая обработка данных в программе «Minitab» с помощью построения полной квадратичной модели поверхности отклика и линейной регрессионной модели для оптимизации условий проведения процесса прямого прессования таблеток флуоксетина.

Проведен анализ полученных моделей. Показано, что увеличение концентрации лубриканта ведёт к росту времени распадаемости, снижению индекса Хауснера, индекса Карра и угла естественного откоса. Увеличение времени смешивания приводит к повышению веса и толщины таблеток, снижению прочности на раздавливание, индекса Хауснера, индекса Карра и угла естественного откоса. Увеличение силы прессования повышает прочность на раздавливание, временя распадаемости, снижает толщину и истираемость таблеток.

Установлено, что из-за нелинейности системы для более точного её описания необходимо использовать полную квадратичную модель вместо линейной модели.

Найдены оптимальные количество лубриканта, время смешивания и сила прессования для квадратичной модели поверхности отклика (X_1=1,0; X_2=21,1; X_3=11,8) и для линейной регрессионной модели (X_1=1,4; X_2=25,0; X_3=13,3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ali B, Rabba A, Fayed M, et al. Development and optimization of Fluoxetine orally disintegrating tablets using Box-Behnken design. Trop. J.of Pharma. Res. 2016;15(4):669-677. DOI: 10.4314/tjpr.v15i4.1

2. Государственная фармакопея РФ. 2018;2(14). Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php [Доступ 05 март, 2021].

3. US FDA. Guidance for industry, process validation: general principles and practices. White Oak: US Food and Drug Administration. 2011. Available at: https://www.fda.gov/media/71021/download [Доступ 05 март, 2021].

4. USP. General chapters: <1174> Powder flow. Available at: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1174.html [Доступ 05 март, 2021].

5. Pazhayattil A, et al. Solid Oral Dose Process Validation. Volume 1. AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences. 2018:133. DOI 10.1007/978-3-030-02472-7

6. Pazhayattil A, et al. Solid Oral Dose Process Validation. Volume 2. AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences. 2019:116. DOI: 10.1007/978-3-030-27484-9

SUMMARY

MODERN APPROACHES TO PROCESS VALIDATION BASED ON STATISTICAL METHODS

Stepanov K.S., 1st year master student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Statistical data processing was carried out in the "Minitab 17" program using the construction of a full quadratic model of the response surface and a linear regression model to optimize the conditions for the process of direct compression of fluoxetine tablets. The optimal amount of lubricant, mixing time and pressing force were found.

Key words: *statistical tools, DoE, Minitab 17, Stage 1A.*

REFERENCES

1. Ali B, Rabba A, Fayed M, et al. Development and optimization of Fluoxetine orally disintegrating tablets using Box-Behnken design. Trop. J.of Pharma. Res. 2016;15(4):669-677. DOI: 10.4314/tjpr.v15i4.1

2. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 2018;2(14). Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php [Accessed 05 March, 2021].

3. US FDA. Guidance for industry, process validation: general principles and practices. White Oak: US Food and Drug Administration. 2011. Available at: https://www.fda.gov/media/71021/download [Доступ 05 март, 2021].

4. USP. General chapters: <1174> Powder flow. Available at: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1174.html [Доступ 05 март, 2021].

5. Pazhayattil A, et al. Solid Oral Dose Process Validation. Volume 1. AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences. 2018:133. DOI 10.1007/978-3-030-02472-7

6. Pazhayattil A, et al. Solid Oral Dose Process Validation. Volume 2. AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences. 2019:116. DOI: 10.1007/978-3-030-27484-9

РАЗРАБОТКА СОСТАВА ГРАНУЛ С СУХИМ ЭКСТРАКТОМ КОРНЕЙ ЛОПУХА БОЛЬШОГО В ТВЁРДЫХ ЖЕЛАТИНОВЫХ КАПСУЛАХ

Стрелкова А.В., магистрант 2 года
Руководитель: **Каухова И.Е.**, доктор фармацевтических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: anna.strelkova@pharminnotech.com

Разработан состав гранул с сухим экстрактом корней лопуха большого в кишечнорастворимых твёрдых желатиновых капсулах. Проведена стандартизация капсул по показателям качества ГФ XIV издания.

Ключевые слова: *кишечнорастворимые твердые желатиновые капсулы, гранулы, сухой экстракт, корни лопуха большого, инулин, стандартизация.*

Твердые лекарственные формы широко распространены на фармацевтическом рынке. Одной из самых популярных лекарственных форм являются твердые желатиновые капсулы. Они обладают рядом преимуществ с технологической и потребительской точек зрения.

Кишечнорастворимые твердые желатиновые капсулы защищают содержимое от воздействия желудка осуществляя адресную доставку активной фармацевтической субстанции в кишечник. Оболочка капсул является корригентом вкуса и запаха, является удобной для проглатывания пациентами.

Таким образом, твердые желатиновые капсулы являются перспективной лекарственной формой.

Целью данного исследования было разработать состав и провести стандартизацию гранул с сухим экстрактом корней лопуха большого в твердых желатиновых капсулах.

Сухой экстракт получен из корней лопуха большого. Лекарственное сырье было закуплено у производителя ООО «Лекра-СЭТ», Россия (ТУ 10.89.19-050-40852492-2018). Для данного сырья были определены показатели качества в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XIV издания ФС.2.5.0025.15 «Лопуха корни». Сухой экстракт получен при экстрагировании сырья методом трёхступенчатой ремацерации на кипящей водяной бане с обратным холодильником [1].

Вспомогательными веществами в технологии гранул с сухим экстрактом корней лопуха большого были выбраны: макрогол-4000, производитель ООО «Аквахим», Россия и карбонат магния, производитель XING MEI, Китай. Увлажнитель – метилцеллюлоза -16 (Мц-16), производитель ООО Фелицата Холдинг, Москва, Россия.

Оптимальный состав был получен с использованием планирования эксперимента в программе: Jmp pro. Для построения плана эксперимента были выбраны вспомогательные вещества на основании анализа литературных источников и терапевтической группы БАВ лопуха большого.

Алгоритм проектирования плана эксперимента был следующим:

1) создаём индивидуальный дизайн с помощью DOE > Custom Design;

2) задаем Responses (ответы): вводим Response Name (наименование отклика); Goal (целевое значение дальнейшей оптимизации); Lower / Upper Limit (максимальный / минимальный предел признака);

3) в Factors (факторы) вводим наименования компонентов, которые планируем изменять и их Values (границы изменения), тип факторов Continuous (непрерывные), тип изменения – Easy (простое).

Границы варьирования были выбраны для каждого вспомогательного вещества индивидуально, опираясь на литературные данные. Количество сухого экстракта было фиксированным, исходя из суточной дозы инулина и количественного содержания полисахаридов в сухом экстракте [1]. План эксперимента представлен в таблице 1.

Существует высокая вероятность того, что изменение выходных данных обусловлено комбинированным эффектом между двумя или более переменными – взаимодействием. В Model (модель) в раскрывающемся списке Interations (взаимодействия) выбираем 2nd(двойные взаимодействия факторов) [2].

4) в Design Generation (генерирование плана), в поле Number of Replicate Runs (количество повторных прогонов) – ввели 1; выбираем User Specified (заданные пользователем) и используем план из 6 опытов, предложенных программой (таблица 1) [2].

Таблица 1 – План эксперимента по разработке состава гранул на основе сухого экстракта корней лопуха большого

№ п/п	Сухой экстракт лопуха, %	Макрогол 4000, %	Карбонат магния, %
1	40,00	30,00	30,00
2	40,00	1,00	59,00
3	40,00	1,00	59,00
4	40,00	58,7	1,21
5	40,00	58,9	1,03
6	40,00	1,00	59,00

Исходя из технологических свойств сухого экстракта корней лопуха большого [1] для получения гранул был выбран метод влажной грануляции. Увлажнитель – 0,5% МЦ-16.

Для гранул были определены основные технологические показатели: сыпучесть, угол естественного откоса, фракционный состав, насыпная плотность в соответствии с требованиями ГФ XIV издания.

Инулин – основное действующее вещество сухого экстракта корней лопуха большого обладает фармакологической активностью в кишечнике.

Для целевой доставки действующего вещества в кишечник были выбраны твёрдые желатиновые капсулы кишечнорастворимые DRcaps, производства компании Capsugel, белого цвета, размер 0. Размер капсул был выбран исходя из насыпной плотности полученного гранулята.

Для определения показателей качества полученных гранул и готовой лекарственной формы применяли тестеры фирмы ERWEKA (Германия): распадаемости серии ZT 220, насыпной плотности серии SVM, определения степени сыпучести порошков и гранулятов серии GTB.

Влияние состава на показатели качества гранул на основе сухого экстракта корней лопуха большого представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние состава на технологические свойства гранул на основе корня лопуха большого

№ п/п	Состав гранул в пересчете на капсулу типа, %		Содержание фракции гранул (0,5-1,00) мм, %	Насыпная плотность, г/см3	Угол естественного откоса, °	Сыпучесть г/с
	состав	%				
1	Сухой экстракт лопуха	40,00	98,0± 0,02	0,657± 0,02	26,00 ± 0,03	21,2 ± 0,05
	Макрогол-4000	30,00				
	Карбонат магния	30,00				

№ п/п	Состав гранул в пересчете на капсулу типа, %		Содержание фракции гранул (0,5-1,00) мм, %	Насыпная плотность, г/см3	Угол естественного откоса, °	Сыпучесть г/с
	состав	%				
2	Сухой экстракт лопуха	40,00	76,0± 0,03	0,597± 0,02	65,00 ± 0,05	15,2 ± 0,07
	Макрогол-4000	1,00				
	Карбонат магния	59,00				
3	Сухой экстракт лопуха	40,00	73,0± 0,06	0,595± 0,01	65,00 ± 0,03	16,9 ± 0,10
	Макрогол-4000	1,00				
	Карбонат магния	59,00				
4	Сухой экстракт лопуха	40,00	65,7± 0,05	0,609± 0,04	35,00 ± 0,04	10,1 ± 0,05
	Макрогол-4000	58,7				
	Карбонат магния	1,21				
5	Сухой экстракт лопуха	40,00	67,0± 0,05	0,601± 0,03	37,00 ± 0,04	9,9 ± 0,06
	Макрогол-4000	58,9				
	Карбонат магния	1,03				
6	Сухой экстракт лопуха	40,00	78,4± 0,05	0,600± 0,04	23,00 ± 0,04	15,7 ± 0,02
	Макрогол-4000	1,00				
	Карбонат магния	59,00				

Как показали результаты исследования, наилучшими технологическими свойствами обладали гранулы состава 1.

На основании проведенного комплекса исследований разработан состав гранул, представленный в таблице 3.

Таблица 3 – Состав гранул на основе сухого экстракта корней лопуха большого в твердых желатиновых капсулах

Наименование компонентов	Масса компонентов, мг	Содержание компонентов в одной капсуле типа #0, %
Сухой экстракт корней лопуха	176,0	40,00
Макрогол 4000	132,0	30,00
Карбонат магния	132,0	30,00
Общая масса:	440,0	100,0

Полученные капсулы стандартизовали по показателям качества: описание, подлинность, количественное содержание полисахаридов, однородность массы, распадаемость в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0005.15 Капсулы. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Показатели качества гранул с сухим экстрактом корней лопуха большого в твердых желатиновых капсулах

Показатель	Метод определения	Требования НД	Результаты
Описание	Визуально	Одноцветные белые твёрдые желатиновые капсулы цилиндрической формы с полусферическими концами	Соответствует
Подлинность	ТСХ ГФ РФ	При просмотре после последовательной обработки хроматографической пластинки спиртовым раствором тимола 20% и 16% серной кислотой должны обнаружиться пятна оранжево-красного цвета, одно из которых соответствует инулину (R_f = 0.83 ± 0.02)	Соответствует
Количественное содержание полисахаридов, %	Спектрофотометрический ГФ РФ	Не менее 35.00 %	36,67 ± 0,43
Однородность массы, мг	ГФ РФ	0.44± 7.5%	Соответствует
Распадаемость, %	ГФ РФ	Капсулы должны остаться неповреждёнными в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М в течение 2 ч, затем распасться в фосфатном буферном растворе со значением pH 6,8 не более чем через 1 ч.	Соответствует
Упаковка	В банках из тёмного стекла, укупоренных навинчиваемыми пластмассовыми крышками с прокладками		Соответствует
Хранение	В сухом, защищённом от света месте		Соответствует

Таким образом, полученные капсулы удовлетворяют требованиям ГФ XIV издания.

Разработан состав гранул с сухим экстрактом корней лопуха большого в твердых желатиновых капсулах с использованием метода планирования эксперимента в программе Jmp pro. Проведена стандартизация капсул по показателям описание, подлинность, количественное содержание полисахаридов, однородность массы, распадаемость. Полученные капсулы удовлетворяют требованиям государственной фармакопеи XIV издания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стрелкова АВ, Каухова ИЕ. Разработка технологии сухого экстракта корней лопуха. СПб.: СПХФА, 2020; М., 2020: 599-601.

2. Голубев АН, Нгуен ТШ, Сорокин ВВ, Каухова ИЕ. Разработка таблеток на основе фитосубстанции клевера лугового травы с применением методов планирования эксперимента и инструментов QbD. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;9(3):24–32.

3. Стрелкова АВ, Новикова ЕК. Обзор лекарственных препаратов, в состав которых входит инулин. М., 2019: 383-385.

4. Стрелкова А. Актуальность создания лекарственных средств из сухого экстракта корней лопуха. М., ВИЛАР, 2019: 501-504.

5. Стрелкова АВ. Каухова ИЕ. Обзор лекарственных препаратов и косметических средств, в состав которых входит корень лопуха. ФГБНУ ВИЛАР, 2020. М., 2019: 281-284.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF THE COMPOSITION OF GRANULES WITH DRY EXTRACT OF ARCTIUM LAPPA L. ROOTS IN SOLID GELATIN CAPSULES

Strelkova A.V., 2th Master's student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The composition of granules with dry extract of burdock roots in intestinal-soluble solid gelatin capsules was developed, the capsules were standardized according to the quality indicators of the GF XIV edition.

Key words: *intestinal-soluble solid gelatin capsules, granules, dry extract, Arctium Lappa L. roots, inulin, standardization.*

REFERENCES

1. Strelkova AV. Kaukhova IE. Development of dry Arctium Lappa L root extract technology. Saint Petersburg: SPCPA, 2020; Moscow, 2020: 599-601. (in Russ)

2. Golubev AN, Nguyen TS, Sorokin VV, Kauhava IE. Development of tablets based on phytosubstances clover grass using the methods of experiment planning and tools of QbD. Development and registration of medicines. 2020;9(3):24-32. (in Russ)

3. Strelkova AV. Novikova EK. Review of medicines that contain inulin. Moscow, 2019:383-385. (in Russ)

4. Strelkova AV. The relevance of creating medicines from dry Arctium Lappa L root extract. Moscow, VILAR, 2019: 501-504 (in Russ)

6. Strelkova AV. Kaukhova IE. Review of medicinal products and cosmetics that include Arctium Lappa L root. VILAR 2020. Moscow, 2019: 281-284. (in Russ)

РАЗРАБОТКА КОСМЕТИЧЕСКОГО ЗАЩИТНОГО КРЕМА ДЛЯ РУК, СОДЕРЖАЩЕГО МАСЛО АВОКАДО

Тарасова К.И., студ. 4 года обучения
Руководитель: **Басевич А.В**., канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: tarasova.kseniya@pharminnotech.com

Обозначен ряд составов косметического защитного крема для рук, содержащего масло авокадо. Проведен анализ крема различных составов посредством разработанной системы оценивания потребительских и органолептических свойств продукта. Технологией приготовления крема выбран метод холодного эмульгирования.

Ключевые слова: *крем для рук, крем для зимнего периода, масло авокадо, эмульсия, холодное эмульгирование, мочевина.*

Уменьшение эффекта старения кожи – один из приоритетов современной косметологии. Основные причины потери кожей эластичности проявляются за счет замедления процесса выработки и ускорением процессов распада биохими-

ческих веществ организма. Температура окружающей среды и, соответственно, температура тела влияют на протекание физиологических и биохимических процессов организма. Трансэпидермальная потеря воды влияет на чувствительность и обезвоженность кожи. Натуральный увлажняющий фактор, состоящий в основном из аминокислот, минералов и мочевины, и липиды – основные компоненты кожи человека, отвечающие за удержание влаги в клетках.

В зимний период кожа рук подвержена особому влиянию термических факторов. Эндогенные патологические изменения в роговом слое также протекают при аномально низком содержании влаги [2]. При низких температурах молекулы липидов прилегают друг к другу гидрофобными «хвостами», таким образом, что их подвижность ограничена, проницаемость мембран клеток наименьшая.

Выбор формы основан на удобстве применения, универсальности и кратности применения косметического крема в течение дня. Ввиду повышенной уязвимости кожи в холодный период защитный крем должен образовывать защитную пленку, удерживающую влагу, и дополнительно увлажнять кожу.

Метод получения крема – холодное эмульгирование. Основными технологическими этапами являются:

1) подготовление водной фазы – растворение всех водорастворимых компонентов;

2) приготовление масляной фазы- объединение масла авокадо, эмолента и эмульгатора;

3) добавление водной фазы к масляной фазе

Для получения стабильной системы ведется механическое перемешивание с нарастающей интенсивностью.[3]

Основных компонентов были выбраны эмульгатор Cosmedia SP (Sodium polyacrylate), Вода очищенная, D-пантенол, диметикон, глицерин, мочевина, масло авокадо, эуксил PE 9010 и отдушка. Расчет каждого состава представлен на 100 грамм готового продукта.

На первом этапе был обоснован выбор данных компонентов был анализом рынка современных компонентов, их доступностью и свойствами [5].

Cosmedia SP (Sodium polyacrylate)-высокоэффективный эмульгатор и стабилизатор. Улучшает сенсорные характеристики эмульсий, полученных холодным способом. Процент ввода: 1,2-1,5%.

Введение такого компонента как глицерин необходимо для придания крему увлажняющего свойства. Процент ввода: 1,3-1,8%.

Ввод силикона также обусловлен заданной ранее целью – созданием защитной пленки. Диметикон улучшает структуру крема и не теряет свойства при широких диапазонах температур. В составе является эмолентом. Процент ввода: 3-4%.

D-пантенол- водорастворимый витамин группы В, способствует заживлению микротрещин и является дополнительным фактором увлажнения кожных покровов. Процент ввода: 3,8-5,2%.

Мочевина – кератолитик. Облегчает проникновение веществ через кожу, усиливая их фармакологические эффекты, и оказывает дополнительный фактор удержания влаги. [1] В меньшей степени дополнительно оказывает увлажняющее свойство. Процент ввода: 0,1-0,3%.

Эуксил PE 9010- жидкий быстродействующий косметический консервант на основе феноксиэтанола. Помимо основного свойства дополнительно увеличивает смачиваемость в зависимости от процента ввода, что непосредственно влияет на распределение крема по поверхности. Процент ввода: 0.5 – 1.0 %.

Масло авокадо стимулирует выработку коллагена. В состав масла входят каротины; витамины C, D, K, PP, группы B, биотин; жирные кислоты [4].

Отдушка использована для придания аромата косметическому средству. Не имеет в составе запрещенных аллергенов. Процент ввода: 0,02%.

Также в состав входит вода очищенная, получаемая из воды питьевой методом обратного осмоса до 100% (см. таблицу 1).

Таблица 1 – Разработка состава крема для рук

№	Наименование компонента	Вариант									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Содержание в креме, %									
1	Cosmedia SP	3	1,5	1,5	1,2	1,2	1,2	1,4	1,4	1,4	3
2	Диметикон	3	3	3	3	3	3,9	3,9	3	3	3
3	D-пантенол	3,9	3,9	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,4	5,2	3,9
4	Масло авокадо	7	7	7	7	8,54	8,54	6	6	6	7
5	Мочевина	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,32	0,1
6	Глицерин	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,5	1,8	1,4
7	Отдушка	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
8	Эуксил PE 9010	-	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,12	0,18	0,15
9	Вода очищенная	До 100	До 100	До 100	До 100	До 100	До 100	До 100	До 100	До 100	До 100

Для оценки крема различных составов были предложены критерии оценивания потребительских и органолептических свойств продукта и разработана шкала оценивания в баллах (см. таблица 2).

Основные критерии оценивания:

1. Внешний вид
2. Скатываемость
3. Жирность
4. Увлажнение
5. Время полного впитывания
6. Комфортность после применения

Таблица 2 – Показатели системы оценивания потребительских и органолептических свойств образцов

Показатель оценки	Система оценки
Внешний вид	1 – жидкая субстанция с мех. включения; полупрозрачный молочный цвет; 2 – неплотная неоднородная структура с мех. включениям, видно отслаивание фаз, полупрозрачный цвет; 3 – неоднородная структура с мех. включениями; белый цвет; 4 – однородная плотная структура без мех. включений; молочно-желтый цвет; 5 – однородная структура без мех. включений; белый цвет;
Скатываемость	1 – скатывается при нанесении на кожу; 2 – скатывается после нанесения на кожу при прикосновении к другим предметам; 3 – скатывается через 30-120 мин после нанесении на кожу; 4 – скатывается через 2-4 часа после нанесения на кожу; 5 – не скатывается;
Жирность	1 – эффект жирных рук сохраняется более 30 мин; 2 – эффект жирных рук сохраняется более 15 минут; 3 – эффект жирных рук сохраняется более 5 минут; 4 – эффект жирных рук сохраняется более 1 минут; 5 – не ощущается эффекта жирных рук;
Увлажнение	1 – стягивающая сухость кожи; 2 – сильная сухость кожи; 3 – нет эффекта увлажнения кожи; 4 – эффект увлажненной кожи действует до 4 часов; 5 – эффект увлажненной кожи действует более 4 часов;
Время полного впитывания	1 – более чем за 5 мин; 2 – 3-5 3 – 1-3 мин; 4 – более 30 сек; 5 – менее 30 сек;
Комфортность после применения	1 – липкость и дискомфорт более 5 мин; 2 – липкость и дискомфорт более 3 мин; 3 – липкость и дискомфорт более 1 мин; 4 – липкость и дискомфорт более 30 секунд; 5 – липкость и дискомфорт отсутствуют;
Влияние на кожу	1 – нет ощутимых отличий от кожи до применения; 2 – ощущаются незначительные отличия от кожи до применения; 3 – кожа более гладкая, чем до применения; 4 – кожа мягче, чем до применения; 5 – кожа более гладкая и мягкая, чем до применения

Все полученные варианты крема были проанализированы по всем потребительским свойства, согласно, бальной шкалы оценивания. Результаты оценки представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты оценки различных составов крема для рук на потребительские свойства

№ варианта	Внешний вид	Скатываемость	Жирность	Увлажнение	Время полной впитывания	Влияние на кожу	Комфортность после применения
1	3	1	4	3	4	1	3
2	5	4	4	3	5	4	4
3	5	4	4	4	5	3	4
4	5	5	4	4	5	3	4
5	5	5	4	4	5	5	3
6	5	5	4	4	5	5	3
7	5	5	5	4	5	3	4

№ варианта	Внешний вид	Скатываемость	Жирность	Увлажнение	Время полной впитывания	Влияние на кожу	Комфортность после применения
8	5	5	5	5	5	3	4
9	5	5	5	5	5	5	5
10	5	5	5	5	5	5	4

В результате оценки образцов крема для рук, представленных в таблице 3, установлено, что наилучшими показателями обладают образцы с номерами от №2 до №10. При добавлении эмульгатора Cosmedia SP количестве 3% крем не проходит по показателю скатываемость и меняет внешний вид крема.

Защитное действие кремов №9, №6 сохраняется длительное время (более 6 часов). Так, составы №9 и №6 выбраны для дальнейшего изучения их показателей качества и физико-химических свойств.

Обоснован состав компонентов и разработан состав крема для рук. Разработана система оценки органолептических свойств образцов крема. Отобраны составы с лучшими потребительскими свойствами для дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шейфилд Н. Мочевина: обзор научных и клинических данных. Dermatology Online Journal. Доступно по: [https://www.semanticscholar.org/paper/Urea%3A-a-review-of-scientific-and-clinical-data.-Scheinfeld/876c6d4db509d33cbee48764fcc509b1532a0304] [Дата обращения – 26.02.2021]

2. Кирк ДЛ. Роль турбулентности и магнитных полей в моделируемой нитевидной структуре. ResearchGate. Доступно по: [https://www.researchgate.net/scientific-contributions/D-L-Kirk-2766118] [Дата обращения – 26.02.2021]

3. Государственная фармакопея РФ XIV изд. ОФС.1.4.1.0008.18 Мази. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php [Дата обращения – 26.02.2021]

4. Алан Вульф. Масло Авокадо. ResearchGate. Доступно по: https://www.researchgate.net/publication/289919058_Avocado_Oil [Дата обращения – 26.02.2021]

5. Ляпунов НА, Безуглая ЕП, Зинченко ИА, и др. Мягкие лекарственные средства: фармацевтическая разработка и трансфер технологии. Электронный журнал «Фармацевтическая отрасль» Доступно по: https://vk.com/doc381061382_588999289?hash=09ea83acb7d8f8876d&dl=b9af61c5fa8449621c [Дата обращения – 26.02.2021]

SUMMARY

FORMULATION OF A COSMETIC PROTECTIVE HAND CREAM CONTAINING AVOCADO OIL

Tarasova K.I., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A number of compositions of cosmetic protective hand cream containing avocado oil are indicated. The analysis of the cream formulations was carried out by means of the developed system for evaluating the consumer and organoleptic properties of the product. The method of cold emulsification was chosen for the preparation of samples.

Key words: *hand cream, winter cream, avocado oil, emulsion, cold emulsification, urea.*

REFERENCES

1. Sheyfield H. Urea: review of scientific and clinical data Dermatology Online Journal Available at: [https://www.semanticscholar.org/paper/Urea%3A-a-review-of-scientific-and-clinical-data.-Scheinfeld/876c6d4db509d33cbee48764fcc509b1532a0304]. [Accessed – 26.02.2021]

2. Kirk DL. The role of turbulence and magnetic fields in the simulated filamentous structure. ResearchGate Available at: https://www.researchgate.net/scientific-contributions/D-L-Kirk-2766118 [Accessed – 26.02.2021]

3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. OFS.1.4.1.0008.18 Ointments Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php [Accessed – 26.02.2021]

4. Alan Wolf. Avocado oil by ResearchGate Available at: https://www.researchgate.net/publication/289919058_Avocado_Oil [Accessed – 26.02.2021]

5. Lyapunov NA, Bezuglaya EP, Zinchenko IA, et al. Soft medicines: pharmaceutical development and technology transfer. Electronic Journal "Pharmaceutical Industry" Available at: https://vk.com/doc381061382_588999289?hash=09ea83acb7d8f8876d&dl=b9af61c5fa8449621c [Accessed – 26.02.2021]

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА CO_2 ЭКСТРАКТА РАПСА (*BRASSICA NAPUS*)

Тилеуберди Н.Н., магистрант 2 года обучения
Руководители: **Буракова М.А[1].**, к. фарм. н, доц., **Тургумбаева А.А.[2]**, PhD, и.о. доц.
[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
[2]НАО «Казахский Национальный Медицинский Университет имени С.Д. Асфендиярова»,
050012, г. Алматы, ул. Толе би 92, Республика Казахстан
E-mail: nazym.tileuberdi@spcpu.ru

Данное исследование включает в себя изучение химического состава экстракта рапса (*Brassica napus*) методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (Agilent 7890B/5977A).

Ключевые слова: *экстракт рапса, газовая хроматография, эфирные масла, терпеноиды, жирные кислоты.*

Рапс – однолетнее растение, принадлежащее к семейству Крестоцветных (*Brassicaceae*) и является одним из культивируемых лекарственных растений в Средней Азии, Северной Африки и Западной Европы [1]. При промышленной переработке семян рапса получают масло. Масло рапса широко применяется в производстве лекарственных и пищевых продуктов, а также используется в качестве смазочных масел и биотоплива в химической промышленности. В иранской народной медицине корни рапса применялись в лечебных целях как средство против цинги, мочегонное и противовоспалительное [2]. Масло семян рапса способствует снижению уровня холестерина в крови и укрепляет сосуды, препятствуя образованию тромбов. Ранее в составе рапсового масла были обнаружены мононенасыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты, витамины Е, А, РР, В1, В2 и фитостеролы [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение компонентного состав CO_2 экстракта рапса методом газовой хроматографии.

Растительный материал был собран в Казахском научно-исследовательском институте земледелия и растениеводства города Алматы в период созревания семян. Экстракт рапса был получен методом докритической CO_2 экстракции.

Изучение химического состава экстракта рапса осуществлялось на газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием оснащенной Agilent 7890B/5977A, WAXetr колонка (30 м × 0,25 мм, толщина 0,25 мм). Обработка данных включала в себя определение времен удерживания, площадей пиков, а также обработку, спектральной информации полученной с помощью масс-спектрометрического детектора.

Условия хроматографического анализа: объем образца 1,0 мкл, температура ввода пробы 240 °С, с делением потока 1:10. Разделение проводили с помощью хроматографической капиллярной колонки WAXetr длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм при постоянной скорости газа-носителя (гелий) 1 мл/мин. Температуру хроматографирования программируют от 40°С (выдержка 0 мин) до 260°С со скоростью нагрева 10 °С/мин (выдержка 20 мин). Детектирование проводили в режиме SCAN m/z 34-850. Для управления системой газовой хроматографии, регистрации и обработки полученных результатов и данных использовали программное обеспечение Agilent MSD ChemStation (версия 1701EA). Результаты хроматографического анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты хроматографического анализа CO_2 экстракта рапса

№	Время удерживания, мин	Соединение	Вероятность идентификации, %	Процентное содержание, %
1	11,7	Тетрадекан	94	0,85
2	13,0	Ментон	92	1,25
3	14,1	Пентадекан	90	0,22
4	15,4	Ментилацетат	89	0,28
5	15,7	Изокариофиллен	89	0,20
6	15,8	Борнилацетат	89	0,20
7	15,9	5-метил-2-(1-метилэтенил) циклогексанон	90	0,28
8	16,6	Гексадекан	92	0,48
9	17,3	Пулегон	93	12,91
10	17,5	Пинокарвеол	92	0,43
11	17,8	1-Нонанол	90	0,20
12	17,9	Изовалериановая кислота	84	0,64
13	21,1	2,4-декадиенал	89	1,35
14	21,7	Капроновая кислота	86	0,42

№	Время удерживания, мин	Соединение	Вероятность идентификации, %	Процентное содержание, %
15	22,0	Додекановая кислота	71	0,26
16	23,3	Вербенон	68	0,23
17	24,6	Кариофиллен оксид	86	0,19
18	25,5	Циклотен	78	0,64
19	25,8	Геранил-α-терпинен	77	2,05
20	27,0	Гераниллиналоол	83	1,35
21	27,7	6,10,14-триметил-2-пентадеканон	92	0,79
22	28,4	Гексадекатриеновая кислота	86	3,14
23	28,6	Бицикло[4.1.0]гептан	73	0,89
24	29,5	Цембрен	73	30,07
25	29,9	11,15-тетраметилгексадека-1,3,6,10,14-пентен	87	4,55
26	30,0	Сесквисабинен гидрат	74	1,20
27	30,1	Пальмитиновая кислота	88	8,28
28	30,8	Олеиновая кислота	78	0,40
29	32,0	3,4-метилендиоксипропиофенон	82	9,67
30	33,8	Лауриновая кислота	69	0,35
31	36,1	Фитол	94	1,26
32	37,2	Миристиновая кислота	80	0,88
33	37,3	Цис-11-эйкозеновая кислота	75	0,29
34	38,8	Пентадекановая кислота	71	0,45
35	40,1	Октакозанол	85	5,50
36	40,9	Гексадекановая кислота	87	0,88
37	41,6	4,8,12,16-тетраметилгептадекан-4-олид	82	0,27
38	43,6	Сквален	95	3,78
39	44,4	Стеариновая кислота	89	2,94

Обработка данных включала в себя определение времен удерживания, площадей пиков, а также обработку, спектральной информации полученной с помощью масс-спектрометрического детектора (рис. 2). Для расшифровки полученных масс-спектров использовали библиотеки Wiley 7th edition и NIST'02 (общее количество спектров в библиотеках – более 550 тыс.).

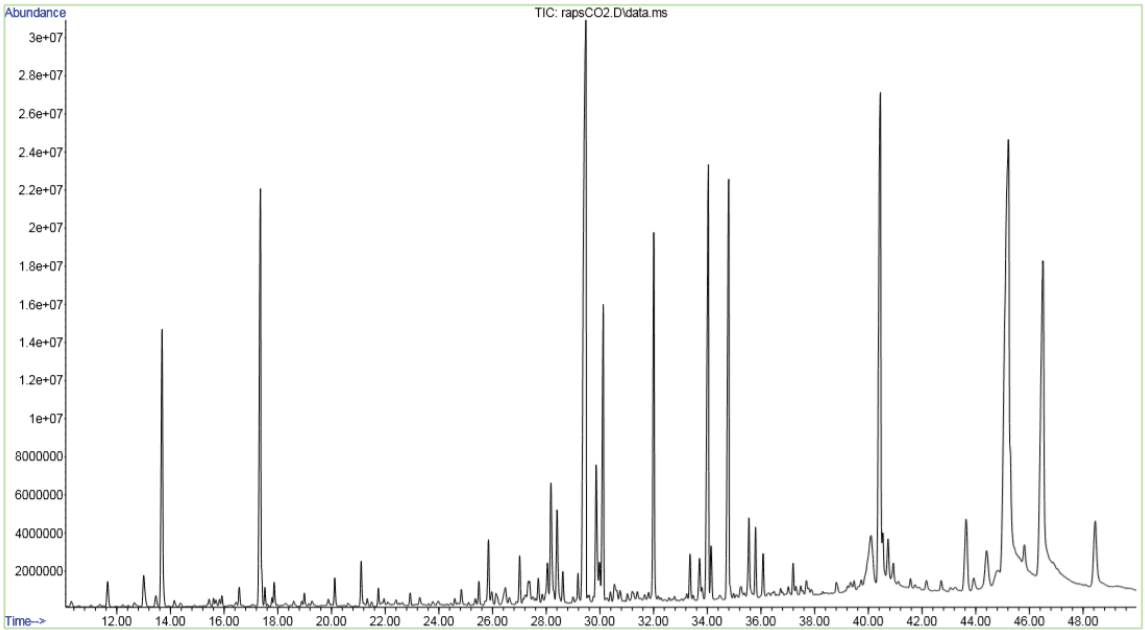


Рисунок 2. Хроматограмма анализа CO_2 экстракта рапса

По результатам исследования, в составе экстракта семян рапса в больших количествах обнаружены следующие химические соединения: цембрен (30,07%), пулегон (12,91%), 3,4-метилендиоксипропиофенон (9,67%) и пальмити-

новая кислота (8,28%). Биологическая активность экстракта рапса обусловлена присутствием в ней эфирных масел, терпеноидов и жирных кислот.

Проведено исследование химического состава CO2 экстракта семян рапса обыкновенного (Brassica napus) методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Анализ проводили посредством капиллярной колонки WAXetr, в режиме детектирования SCAN m/z 34-850. Определили время удерживания и площади пиков с использованием детектора. В итоге, в составе экстракта рапса выявили 39 наименований химических соединений, в которых преобладают терпеноиды, жирные кислоты и другие органические вещества.

ЛИТЕРАТУРА

1. El-Beltagi HES, Mohamed AA. Variations in fatty acid composition, glucosinolate profile and some phytochemical contents in selected oil seed rape (Brassica napus L.) cultivars. Fats Oil. 2010;61(2):143-150.
2. Zargari A. Medicinal Plants. Vol 1, 5th Edn. Tehran: Tehran University Publications, 2001
3. Szydlowska-Czerniak A, Trokowski K, Karlovits G, Szlyk E. Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties. J. Agric. Food Chem. 2010;58:7502-7509.

SUMMARY

RESEARCH OF COMPONENT COMPOSITION OF CO_2 EXTRACT OF RAPESEED (*BRASSICA NAPUS*)

Tileuberdi N.N., 2nd year undergraduate
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation
JSC "Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarov",
050012, Almaty, st. Tole bi 92, Republic of Kazakhstan

This research includes the study of the chemical composition of rapeseed extract (*Brassica napus*) by gas chromatography with mass spectrometric detection (Agilent 7890B / 5977A).

Key words: *rapeseed extract, gas chromatography, essential oils, terpenoids, fatty acids.*

REFERENCES

1. El-Beltagi HES, Mohamed AA. Variations in fatty acid composition, glucosinolate profile and some phytochemical contents in selected oil seed rape (Brassica napus L.) cultivars. Fats Oil. 2010;61(2):143-150.
2. Zargari A. Medicinal Plants. Vol 1, 5th Edn. Tehran: Tehran University Publications, 2001
3. Szydlowska-Czerniak A, Trokowski K, Karlovits G, Szlyk E. Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties. J. Agric. Food Chem. 2010;58:7502-7509.

РАЗРАБОТКА КОМПЬЮТЕРНОЙ МОДЕЛИ ПРОЦЕССА ПЕРЕМЕШИВАНИЯ И ОЦЕНКА ЕЕ АДЕКВАТНОСТИ

Турманидзе Г.Н., асп. 1 года обучения
Руководитель: **Сорокин В.В.**, канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: georgij.turmanidze@spcpu.ru

В работе разработана модель емкостного аппарата с мешалкой и произведено моделирование процесса перемешивания при различных углах наклона шестилопастной мешалки для оценки адекватности полученной модели

Ключевые слова: *лопастная мешалка, угол наклона, скорость потока, число оборотов, эффективность перемешивания.*

Традиционный вид оборудования для перемешивания – вертикальный цилиндрический аппарат с мешалкой, ось вращения которой совпадает с осью корпуса аппарата [1]. Основным элементом перемешивающих устройств таких аппаратов чаще всего является – вертикально расположенный консольный или однопролётный вал, на котором размещены одна или несколько (до пяти) мешалок [1].

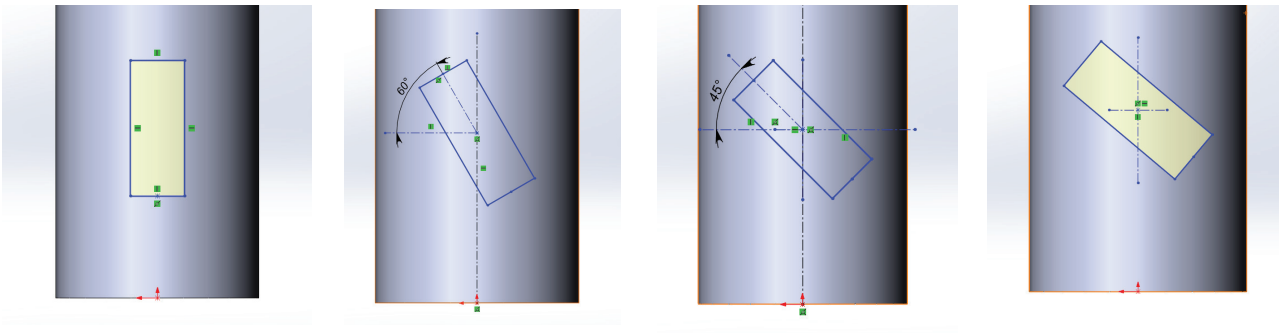
Лопастная мешалка предназначена для перемешивания жидкостей с небольшой вязкостью [до 0,01 кг/(м*с)], растворения и суспендирования твердых веществ с малым удельным весом, а также для глубокого смешивания жидкостей вязкостью меньше 2 кг/(м*с) [2].

Лопастные мешалки отличаются простой конструкцией и низкой стоимостью изготовления. Мешалки лопастные обеспечивают вполне удовлетворительное перемешивание жидкостей с умеренной вязкостью [2].

Наиболее просты по устройству перемешивающие устройства, имеющие импеллер с плоскими лопастями из листового, полосового или углового проката стали, установленными перпендикулярно или наклонно к направлению их движения [2].

Лопастные мешалки работают в переходном режиме, когда число Рейнольдса лежит в диапазоне от 100 до 1000.

Объектами исследования служили емкостные аппараты с мешалкой, при этом лопасти мешалок имели различные углы поворота (см. рис. 1.4).



Угол наклона 90° Угол наклона 60° Угол наклона 45° Угол наклона 30°

Рисунок 1. Четыре модели мешалок с разными углами наклона лопастей

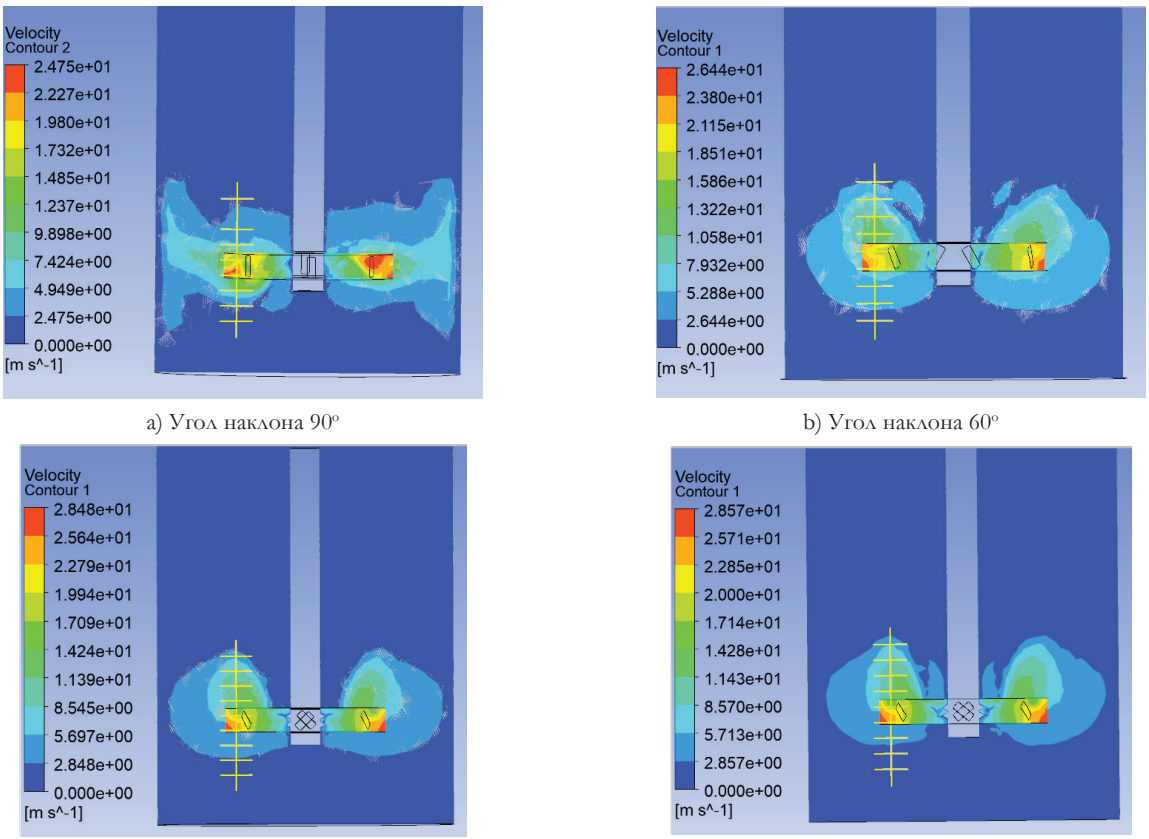
В качестве модельной среды была выбрана вода. Размер лопастей мешалки: 8 мм на 20 мм, длина – 70 мм. Количество лопастей на одной мешалки: 6.

Параметры движения жидкости при использовании данных перемешивающих устройств хорошо изучены, что позволяет произвести оценку работы модели и ее адекватность: соответствие практически наблюдаемым явлениям.

Построение мешалок выполняли в среде SolidWorks. Построены геометрические модели 4 мешалок, создана расчетная сетка и заданы граничные условия моделей.

Далее модели мешалок переносили в программную среду Ansys, где осуществляли процесс моделирования работы мешалок.

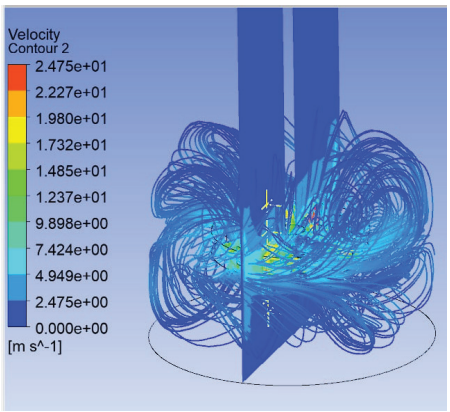
Для оценки работы полученной модели анализировали показатели эффективности перемешивания мешалок: оценивали скорости потоков и давления жидкостей по высоте аппарата. С этой целью выполнили построение вертикальной плоскости, делящей модель пополам, на которую проецировали контур скорости потоков и давления.



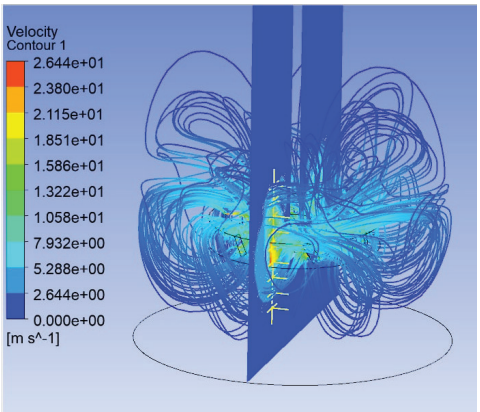
a) Угол наклона 90° b) Угол наклона 60°

c) Угол наклона 45° d) Угол наклона 30°

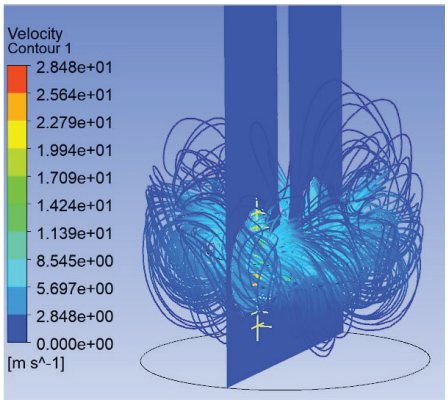
Рисунок 2. Контур скорости моделей процесса перемешивания при разных углах наклона лопастей с точками



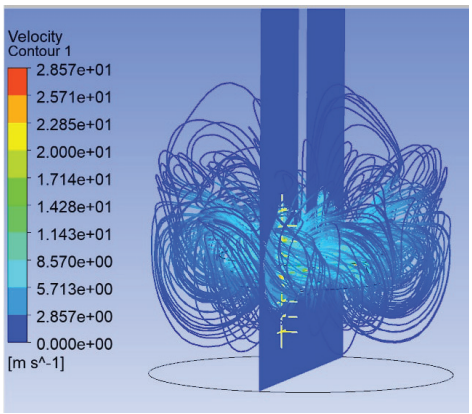
a) Угол наклона 90°



b) Угол наклона 60°



c) Угол наклона 45°



d) Угол наклона 30°

Рисунок 3. Векторы скоростей потоков моделей процесса перемешивания при разных углах наклона лопастей с точками

Исходя из данных рис. 3 видно, что при уменьшении угла наклона импеллеров происходит увеличение максимальной скорости потока, максимальной скорости поток достигает при угле 45 градусов. Также возникает на модели отмечено закручивание потока жидкости при углах, отличных от 90 градусов. Наиболее сильное «закручивание» потока отмечено при углах наклона от 45 градусов до 30 градусов.

Также произведена оценка максимальных значений давления в полученных моделях. Наибольшее абсолютное давление наблюдается при угле наклона лопастей 45 градусов.

Это позволяет говорить об адекватности полученной модели: наблюдаемые в модели явления соответствуют практически получаемым результатам.

Таким образом, полученная компьютерная модель аппарата с мешалкой показывает достоверные результаты и может быть использована для оценки эффективности параметров перемешивания и оптимизации конструкции импеллеров в зависимости от задач перемешивания.

Таким образом, по результатам выполненного моделирования подобраны основные модели и уравнения, позволяющие произвести моделирование процесса перемешивания в Ansys, Разработана геометрическая модель аппарата с модельной шестилопастной мешалкой с наложение сетки на модель, произведена настойка параметров модели. Показана возможность использования полученной модели для оценки процессов перемешивания. Изучено влияние конфигурации модельной мешалки на скорости и давление жидкости в аппарате, показана работоспособность полученной модели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпушкин СВ, Краснянский МН, Борисенко АБ. Расчёты и выбор механических перемешивающих устройств вертикальных емкостных аппаратов. изд. ТГТУ. 2009: 4

2. Лопастная мешалка. Доступно по: https://nr178.ru/mixer_blade_impeller [Доступ 01 марта, 2021]

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A COMPUTER MODEL OF THE MIXING PROCESS AND ASSESSMENT OF ITS CORRECTNESS

Turmanidze G.N., Ph.D. 1th year of study
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The same fluid mixing models are designed, but with different angles of the stirrer blades, to determine how the angle of inclination will affect the fluid flow rate and pressure.

Key words: *paddle mixer, angle of inclination of blades, flow rate, number of revolutions of the mixer, mixing efficiency.*

REFERENCES

1. Karpushkin SV, Krasnyanskiy MN, Borisenko AB. Raschoty i vybor mekhanicheskikh peremeshivayushchikh ustroystv vertikal'nykh yemkostnykh apparatov. izd. TGTU. 2009: 4 (in Russ).
2. Lopastnaya meshalka. Available at: https://nr178.ru/mixer_blade(in Russ).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИБРАЦИЙ В ПРОЦЕССЕ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ ТВЕРДОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Чеботова П.А., студ. 3 курса, **Нестерова Д.И.**, студ. 3 курса
Руководитель: **Рубцова Л.Н.**, канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: polina.chebotova@spcpu.ru

В обзоре дана характеристика современных конструкций вибрационных экстракторов в сравнительном аспекте с традиционными технологиями. Изучено и описано влияние вибраций на процесс экстрагирования. Дана оценка перспективы использования вибрационных аппаратов в системе с твердой фазой с целью повышения скорости и полноты экстрагирования растительного сырья.

Ключевые слова: *экстракция, вибрационный экстрактор, растительное сырье, биологически активные вещества.*

Растительное сырье является источником биологически-активных веществ (БАВ), широко применяемых в изготовлении продукции фармацевтической отрасли [1]. Повышение эффективности извлечения БАВ является основной задачей, стоящей перед учеными, инженерами, химиками и технологами, занятых в разработке инновационных технологий и модернизаций традиционных процессов и аппаратов. Одним из наиболее распространенных методов извлечения БАВ является экстрагирование в системе твердое тело-жидкость.

Традиционные конструкции экстракторов способствуют обеспечению стабильности в работе. Они просты в эксплуатации. На основании твердожидкостных технологий можно прогнозировать время экстракции и количество продукта по отношению к твердой матрице. С другой стороны, они имеют много недостатков. Они потребляют большое количество дорогих и чистых растворителей, обладают низкой селективностью экстракции, имеют высокую скорость испарения растворителя в процессе экстрагирования и, как правило, характеризуются длительным временем экстракции и термическим разложением термолабильных соединений [8]. Для преодоления этих недостатков традиционные методы постоянно модифицируются. Одним из способов интенсификации производства является внедрение конструкций, использующих эффект вибрации. В этой связи перед нами были поставлены следующие задачи. Изучить механизмы процессов экстрагирования. Дать обобщающую оценку современным конструкциям вибрационных экстракторов в патентной литературе за последние десять лет. Сравнить традиционные методы твердожидкостной экстракции с инновационными, использующими вибрационную технику.

Традиционно экстрагирование проводят с использованием экстрагирующих органических или неорганических жидкостей и их смесей, контактирующих с нерастворимой твердой матрицей (например, Метод Сокслета), а также с использованием методов последовательного повышения атмосферного давления, таких как мацерация или перколяция или простым методом отжима [16, 15]. Твердожидкостная экстракция основана на простом явлении. Если твердая матрица, содержащая экстрагируемые соединения, погружена в жидкость, последняя начинает обогащаться определенными химически связанными веществами, которые движутся изнутри к поверхности твердого тела, а затем с поверхности в жидкость. Этот принцип основан на диффузии и осмосе и осуществляется путем мацерации, которая является самым простым и экономичным методом экстракции и поэтому широко и эффективно используется. Процесс мацерации требует только закрывающегося стеклянного или стального контейнера, в котором экстрагируемое твердое вещество по-

крывается жидкостью. Чтобы преодолеть быстрое насыщение жидкости строго вокруг твердого тела, требуется беспорядочное перемешивание [6]. К сожалению, мацерация не всегда применима, поскольку нужно длительное время контакта между твердым телом и жидкостью. Например, растения не могут очень долго мацерироваться в воде при комнатной температуре из-за явлений гниения. Производственные потребности отрасли, требующие получения больших объемов экстрактов в короткие сроки, нашли применение в перколяционной экстракции [5, 2]. При этом можно обрабатывать значительные количества твердого материала при больших объемах жидкости и получать экстракт достаточно быстро, хотя и жертвуя эффективностью экстракции, которая остается низкой из-за ограниченного контакта между твердым веществом и экстрагирующей жидкостью. В этом случае твердая матрица не полностью исчерпана, и вещество может быть повторно извлечено с помощью другой техники.

Сократить время и интенсифицировать массообменные процессы можно за счет вибрационного воздействия [17]. При наложении вибрационного поля низкочастотных механических колебаний на взаимодействующие фазы усиливается активная гидродинамика. Основными положениями научной гипотезы применения вибрации являются следующие утверждения. Увеличение движущей силы процесса растворения и уменьшение когезионных сил взаимодействия дисперсных частиц с лопастью. Увеличение числа равновесных условий дисперсных частиц в жидкой дисперсионной среде при условии снижения сопротивления в жидкой технологической массе при перемешивании, увеличения скорости вращения вала лопасти и снижения энергозатрат при работе смесителя. Повышение качества перемешивания за счет свободного дна рабочей зоны от наносов и самоочищения рабочих органов от наносов.

Низкочастотные колебания обуславливают высокую эффективность массообмена при большой дельной производительности [7]. Виброэкстракторы классифицируют на горизонтальные и вертикальные. Тепломассообменные процессы могут проходить в них, как в непрерывном, так и в периодическом режиме. Вибрация способствует размолу сырья, а также возникновению конвекции, турбуляции и пульсации экстрагента [3].

Известна полезная модель вибрационного экстрактора, в которой технический результат достигается единовременным вводом экстрагента и твердой фазы, что ведет к увеличению времени контакта фаз; наличием обогревающей рубашки, которая производит нагрев смеси жидкой и твердой фазы; перфорированных витков шнека для равномерного распределения экстрагента и лучших условий теплообмена. Всё перечисленное обуславливает более высокую производительность аппарата и повышение эффективности экстракции [10].

С целью обеспечить более интенсивное смывание твердых частиц экстрагентом и увеличения времени контакта фаз, была предложена конструкция вибрационного экстрактора периодического действия. Заданный эффект достигается расположением в аппарате жестко фиксированных перегородок с переточными щелями, расположенными таким образом, что чередуются перегородки с щелями по центру и на периферии. В образованных перегородками секциях установлены тарелки с коническими или цилиндрическими отверстиями перфорации, необходимых для лучшего измельчения твердой фазы и повышения интенсивности массообмена. Отверстия же от тарелки к тарелке увеличиваются, достигая максимального размера в нижних секциях аппарата [11].

С целью создания в аппарате режима, близкого к идеальному смешению, в промышленности используются вибрационные насадки [9]. Известна насадка для вибрационных массобменных аппаратов, положительный эффект от использования которой заключается в расширении диапазона устойчивой работы, повышении производительности и эффективности осуществляемых процессов в вибрационном аппарате [12]. Преимуществами использования таких насадок являются удельные капиталовложения, простота конструкции, низкая металлоемкость [14].

Данные насадки широко используются в конструкциях экстракторов. Одной из последних разработок с применением данного приспособления является экстрактор с вибрационной насадкой. В нем уменьшена элементная база контура внешней рециркуляции и улучшены эксплуатационные характеристик установки [4] по сравнению с наиболее близким по техническому решению экстрактором вибрационным [13], имеющим большое количество дополнительных устройств для очистки и возврата экстрагента в корпус аппарата, что значительно увеличивает капитальные и эксплуатационные расходы, установочные размеры аппарата и трудоемкость обслуживания.

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы. Среди различных форм механического воздействия в процессах экстрагирования, вибрационное воздействие является одним из наиболее эффективных методов. Добавление вибрационного поля на технологическую среду значительно активизирует и интенсифицирует процессы тепломассообмена, повышает качество смешивания материалов с различными физико-механическими свойствами, способствует сокращению продолжительности технологических операций и энергозатрат. Вибрационные эффекты перемешивания обеспечивают равномерный и интенсивный массообмен между твердой и жидкой фазами и обладают большим потенциалом для энергосберегающих технологий. Вибрационные экстракторы, по сравнению с традиционными, имеют более высокую удельную производительность, обеспечивают сокращение времени перемешивания, металлоемкости, энергопотребления и капитальных затрат. Вибрации в процессе экстрагирования растительного сырья позволяют увеличить полноту экстракции БАВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Radu Claudiu Fierascu, Irina Fierascu, Alina Ortan, Milen I. Georgiev, Elwira Sieniawska, Innovative Approaches for Recovery of Phytoconstituents from Medicinal/Aromatic Plants and Biotechnological Production. Molecules. 2020;25(2):309.

2. Алтарёв СН. Способ производства ароматических масляных экстрактов из растительного сырья в процессе вакуумной перколяции. Патент РФ № 2290942 С1. Опубл. 10.01.2007. Бюл. №1

3. Дубашинская НВ, Хишова ОМ, Шимко ОМ. Характеристика способов получения экстрактов и их стандартизация. Часть II. Вестник фармации. 2007;2(36):70-79.

4. Иванов ПП, Сорокопуд АФ, Иванова ЛА, Плотников ИБ Экстрактор с вибрационной насадкой. Патент РФ № 2702581 С1. Опубл. 08.10.2019. Бюл. № 28.

5. Кривова ЛП, Волкова АС Использование метода перколяции для экстракции ароматических компонентов из растительного сырья (разработка рецептуры алкогольного напитка). Образование, наука и технологии: проблемы и перспективы. сборник научных трудов по материалам II международной научно-практической конференции. Под общ. ред. АВ Туголукова. 2019: 176-180

6. Методы экстрагирования, применяемые на фармацевтических производствах // MedInfo.Social: электронный научный журнал. Доступно по: https://medinfo.social/farmakologiya_874_876/metodyi-ekstragirovaniya-primenyaemyie-50156.html [Доступ 01 март 2021]

7. Оробинская ВН, Писаренко ОН Разработка малоотходной технологии экстрагирования биологически активных веществ из плодово-ягодного сырья методом низкочастотного вибрационного воздействия. Международный научно-исследовательский журнал. 2009;7(38):117-122.

8. Просин МВ, Потапов АН, Иванова АС, Полищук ЕС. Роторно-пульсационные аппараты для экстрагирования в системе твердое тело – жидкость. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2014;5(10):70-75.

9. Савенко АВ. Влияние многократного экстрагирования и температуры при переработке листьев крапивы двудомной и березы повислой в аппарате с вибрационной тарелкой. Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2017;1:59-66.

10. Сорокопуд АФ, Иванов ПП, Ворыханов АЕ. Вибрационный экстрактор. Патент РФ № 2434661 С1. Опубл. 27.11.2011. Бюл. № 33.

11. Сорокопуд АФ, Иванов ПП, Карчин КВ Вибрационный экстрактор непрерывного действия. Патент РФ № 2467782 С1. Опубл. 27.11.2012. Бюл. № 33.

12. Сорокопуд АФ, Иванов ПП, Насадка для вибрационных массообменных аппаратов. Патент РФ № 2548983 С1. Опубл. 20.04.2015. Бюл. №11

13. Сорокопуд АФ, Иванов ПП, Халтурин МА Экстрактор вибрационный. Патент РФ № 2525300 С1. Опубл. 10.08.2014. Бюл. № 9.

14. Сорокопуд АФ, Мустафина АС, Бакин ИА, Игушов НВ Особенности переработки замороженных плодов жимолости в аппарате с вибрационной тарелкой. Вестник международной академии холода. 2017;4:3-9.

15. Цебренко КН. Исследование техники для экстракции масляничного материала способом непрерывной многоступенчатой перколяции. Актуальные вопросы современного социально-экономического развития России: проблемы теории и практики. Сборник научных трудов Национальной (всероссийской) научно-практической конференции. 2019: 625-634

16. Шмыгарева АА, Куркин ВА, Саньков АН. Способ получения экстракта крушины ломкой методом модифицированной мацерации. Патент РФ №2716503 С1. Опубл. 12.03.2020. Бюл. №8

17. Яцун СФ, Мищенко ВЯ, Мищенко ЕВ. Влияние вибрационного воздействия на процесс экстракции в пищевой промышленности. Известия вузов. Пищевая технология. 2009;4:70-72.

SUMMARY

THE USE OF VIBRATIONS IN THE PROCESS OF EXTRACTION OF SOLID VEGETABLE RAW MATERIALS FOR THE PURPOSE OF ISOLATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Chebotova P.A., 3rd year student, **Nesterova D.I.**, 3rd year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The review provides a characteristic of modern designs of vibration extractors in a comparative aspect with traditional technologies. The influence of vibrations on the extraction process has been studied and described. An assessment is given of the prospects for the use of vibrating devices in a system with a solid phase in order to increase the speed and completeness of the extraction of plant raw materials.

Key words: *extraction, vibration extractor, plant raw materials, biologically active substances.*

REFERENCES

1. Radu Claudiu Fierascu, Irina Fierascu, Alina Ortan, Milen I. Georgiev, Elwira Sieniawska, Innovative Approaches for Recovery of Phytoconstituents from Medicinal/Aromatic Plants and Biotechnological Production. Molecules. 2020;25(2):309.

2. Altaryov SN. Sposob proizvodstva aromaticheskih maslyanyh ekstraktov iz rastitel'nogo syr'ya v processe vakuumnoj perkolyacii. Patent RF № 2290942 C1. Publ. 10.01.2007. Byul. №1. (in Russ)

3. Dubashinskaya NV, Hishova OM, SHimko OM/ Harakteristika sposobov polucheniya ekstraktov i ih standartizaciya. Chast' II. Vestnik farmacii. 2007;2(36):70-79. (in Russ)

4. Ivanov PP, Sorokopud AF, Ivanova LA, Plotnikov IB. Ekstraktor s vibracionnoj nasadkoj. Patent RF № 2702581 C1. Opubl. 08.10.2019. Byul. № 28. (in Russ)

5. Krivova LP, Volkova AS. Ispol'zovanie metoda perkolyacii dlya ekstrakcii aromaticheskih komponentov iz rastitel'nogo syr'ya (razrabotka receptury alkogol'nogo napitka). V sbornike: Obrazovanie, nauka i tekhnologii: problemy i perspektivy. sbornik nauchnyh trudov po materialam II mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii. Pod obshch. red. AV Tugolukova. 2019:176-180. (in Russ)

6. Metody ekstragirovaniya, primenyaemye na farmacevticheskih proizvodstvah. MedInfo.Social. Elektronnyj nauchnyj zhurnal. Available at: https://medinfo.social/farmakologiya_874_876/metodyi-ekstragirovaniya-primenyaemyie-50156.html [Accessed 01 March, 2021]

7. Orobinskaya VN, Pisarenko ON. Razrabotka maloothodnoj tekhnologii ekstragirovaniya biologicheski aktivnyh veshchestv iz plodovo-yagodnogo syr'ya metodom nizkochastotnogo vibracionnogo vozdejstviya. Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skij zhurnal. 2009;7(38):117-122. (in Russ)

8. Prosin MV, Potapov AN, Ivanova AS, Polishchuk ES. Rotorno-pul'sacionnye apparaty dlya ekstragirovaniya v sisteme tverdoe telo – zhidkost'. Izvestiya vuzov. Prikladnaya himiya i biotekhnologiya. 2014;5(10):70-75. (in Russ)

9. Savenko AV. Vliyanie mnogokratnogo ekstragirovaniya i temperatury pri pererabotke list'ev krapivy dvudomnoj i berezy povisloj v apparate s vibracionnoj tarelkoj. Nauchnyj zhurnal NIU ITMO. Seriya «Processy i apparaty pishchevyh proizvodstv». 2017;1;59-66. (in Russ)

10. Sorokopud AF, Ivanov PP, Voryhanov AE. Vibracionnyj ekstraktor. Patent RF № 2434661 C1. Publ. 27.11.2011. Byul. № 33. (in Russ)

11. Sorokopud AF, Ivanov PP, Karchin KV. Vibracionnyj ekstraktor nepreryvnogo dejstviya. Patent RF № 2467782 C1. Publ. 27.11.2012. Byul. № 33. (in Russ)

12. Sorokopud AF, Ivanov PP, Nasadka dlya vibracionnyh massoobmennyh apparatov. Patent RF № 2548983 C1. Publ. 20.04.2015. Byul. №11. (in Russ)

13. Sorokopud AF, Ivanov PP, Halturin MA. Ekstraktor vibracionnyj. Patent RF № 2525300 C1. Publ. 10.08.2014. Byul. № 9. (in Russ)

14. Sorokopud AF, Mustafina AS, Bakin IA, Igushov NV. Osobennosti pererabotki zamorozhennyh plodov zhimolosti v apparate s vibracionnoj tarelkoj. Vestnik mezhdunarodnoj akademii holoda. 2017;4:3-9. (in Russ)

15. Cebrenko KN. Issledovanie tekhniki dlya ekstrakcii maslyanichnogo materiala sposobom nepreryvnoj mnogostupenchatoj perkolyacii. Aktual'nye voprosy sovremennogo social'no-ekonomicheskogo razvitiya Rossii: problemy teorii i praktiki. Sbornik nauchnyh trudov Nacional'noj (vserossijskoj) nauchno-prakticheskoj konferencii. 2019: 625-634. (in Russ)

16. SHmygareva AA, Kurkin VA, San'kov AN. Sposob polucheniya ekstrakta krushiny lomkoj metodom modificirovannoj maceracii. Patent RF №2716503 C1, Publ. 12.03.2020. Byul. №8. (in Russ)

17. YAcun SF, Mishchenko VYA, Mishchenko EV. Vliyanie vibracionnogo vozdejstviya na process ekstrakcii v pishchevoj promyshlennosti. Izvestiya vuzov. Pishchevaya tekhnologiya. 2009;4:70-72. (in Russ)

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА СОСТАВА ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА С НООТРОПНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Щербаков М.С., магистрант 1 года обучения
Руководитель: **Басевич А.В.**, доц., кандидат фарм. наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: shcherbakov.mihail@pharminnotech.com

Данная статья посвящена обоснованию выбора состава действующих веществ комбинированного лекарственного препарата с ноотропным действием. В ходе выполнения работы был проанализирован рынок ноотропных препаратов, подобраны действующие вещества для разрабатываемого препарата и изучены их технологические свойства, а так же выбраны лекарственные формы – пероральный раствор и сироп.

Ключевые слова: *ноотропные препараты, комбинированные лекарственные препараты, гопантеновая кислота, Бакопа Монье экстракт сухой, неврологические заболевания, Гинкго двулопастного экстракт сухой.*

В современном мире наблюдается сильное влияние хронического психоэмоционального и экологического стресса на жизнь населения индустриально развитых стран. Сотни миллионов людей в мире страдают неврологическими нарушениями. Более шести миллионов человек ежегодно умирают от инсульта; более 80% случаев смерти происходят в странах с низким и средним уровнем дохода. Более 50 миллионов людей в мире страдают эпилепсией. По оценкам, 47,5 миллиона людей в мире страдают деменцией, а ежегодно происходит 7,7 миллиона новых случаев заболевания. Основной причиной деменции является болезнь Альцгеймера, на нее приходится 60-70% случаев деменции. Показатели распространенности мигрени в мире превышают 10%.

Таким образом, показана актуальность профилактики и урегулирования негативного воздействия стресса на деятельность нервной системы современного человека. Особое место в защите головного мозга отводится ноотропным лекарственным препаратам. На основании вышеизложенного была сформулирована цель работы.

Цель: разработка состава и технологии комбинированного препарата с ноотропным действием.

Задачи исследования на первом этапе:

1. изучение и обзор литературы по данной тематике исследований;
2. обзор рынка ноотропных препаратов;
3. предварительный выбор действующих веществ для будущего состава лекарственного препарата;
4. выбор лекарственной формы для препарата.

Ноотропы (греч. noos – мышление, разум; tropos – направление) – средства, оказывающие специфическое позитивное влияние на высшие интегративные функции мозга. Они улучшают умственную деятельность, стимулируют познавательные функции, обучение и память, повышают устойчивость мозга к различным повреждающим факторам, в т.ч. к экстремальным нагрузкам и гипоксии. Кроме этого, ноотропы обладают способностью снижать неврологический дефицит и улучшать кортикосубкортикальные связи.

В настоящее время существует большое количество различных препаратов с ноотропным эффектом. Некоторые из них приведены в таблице 1 [1].

Таблица 1 – Различные препараты с ноотропным и нейропротекторным эффектом.

Торговое название	Действующее вещество	Лекарственная форма	Производитель
Ноотропы			
Пирацетам	Пирацетам	Капсулы	АО «Фармпроект»
Энцетрон-СОЛОфарм	Цитиколин	Раствор для приема внутрь	ООО «Гротекс»
Пантогам	Гопантеновая кислота	Сироп, таблетки	ООО «Пик-Фарма»
Семакс	Метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин	Капли назальные	АО «Инновационный научно-производственный центр «Пептоген»
Ноопепт	Омберацетам	Таблетки	АО «Отисифарм»
Пикамилон	Никотиноил гамма-аминомасляная кислота	Таблетки	ОАО «Акрихин»
Глицин	Глицин	таблетки защечные и подъязычные	АО «Татхимфармпрепараты»
Нейропротекторы			
Винпоцетин	Винпоцетин	Таблетки	ООО «Велфарм»
Гинкго Билоба	Гинкго двулопастного листьев экстракт сухой	Капсулы	АО «Вертекс»
Комбинированные препараты			
Винпотропил	• Винпоцетин • Пирацетам	Капсулы	ЗАО «Канонфарма продакшн»
Фезам	• Пирацетам • Циннаризин	Капсулы	Балканфарма – Дупница АД
Ноосерк	• Пирацетам • Бетагистин	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	Эбботт Продактс Оперейшнз ЭйДжи

На основании данных таблицы 1, показано, что ноотропные лекарственные препараты выпускаются в различных лекарственных формах. Вместе с тем, подавляющее большинство препаратов выпускается в форме таблеток и капсул. Также распространены растворы для инъекций. Из этого можно сделать вывод, что при разработке нового лекарственного средства, стоит обратить внимание на жидкие лекарственные формы, используемые для перорального введения.

Кроме этого, следует отметить, что большинство комбинированных ноотропных препаратов производятся зарубежными компаниями, тогда как монокомпонентные очень широко представлены у российских производителей.

Несмотря на то, что в целом ноотропные препараты довольно широко представлены на российском фармацевтическом рынке, большинство из них являются монокомпонентными, при том, что комбинированные препараты комплексно воздействуют на заболевания. Из всего ассортимента ноотропных препаратов монокомпонентные составляют 98,5%, тогда как комбинированные только 1,5% [2]. Также стоит отметить, что большинство комбинированных препаратов в качестве действующего вещества с ноотропным эффектом содержат пирацетам. Исходя из этого видно, что из-за недостатка комбинированных препаратов на российском фармацевтическом рынке их разработка является перспективной.

В работе были использованы следующие действующие вещества: гопантеновая кислота (гопантенат кальция, ООО«НПФ КЕМ», Россия), Бакопа Монье экстракт сухой (Бакопы экстракт сухой, ООО «Натуринг», Россия), Гинкго двулопастного листьев экстракт сухой (Гинкго Билоба экстракт сухой, «ХАРМС», Россия), янтарная кислота (BASF, Германия).

Определение технологических свойств действующих веществ проводилось по таким показателям, как описание и растворимость согласно соответствующим методикам Государственной Фармакопеи 14 издания. Кроме этого изучались прессуемость веществ и их насыпные характеристики по методике из ОФС 1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков».

В ходе изучения действующих веществ в лекарственных препаратах с ноотропной активностью был проанализирован широкий спектр веществ. Было обнаружено, что у многих ноотропов нет убедительной доказательной базы, а точнее однозначных данных о эффективности или неэффективности препаратов, а также о их безопасности. Поэтому в ходе подбора компонентов было уделено отдельное внимание поиску исследований и статей с результатами.

Исходя из всего вышеперечисленного, был сформирован следующий список действующих веществ:

• Гопантеновая кислота – обладает ноотропным и противосудорожным действием. Повышает устойчивость мозга к гипоксии и воздействию токсических веществ, стимулирует анаболические процессы в нейронах, сочетает умеренное седативное действие с мягким стимулирующим эффектом, снижает моторную возбудимость, повышает умственную и физическую работоспособность. Одно из немногих действующих веществ, проявляющих ноотропный эффект, с доказанной эффективностью и безопасностью для детей и разрешенное к применению в педиатрии практически с рождения [3].

• Бакопа Монье экстракт сухой – бакозиды А и В, содержащиеся в данном экстракте, способствуют улучшению памяти и повышению скорости научения посредством ускорения роста нервных окончаний в головном мозге. В результате нейроны получают возможность обмениваться информацией с гораздо большей скоростью. Помимо этого экстракт бакопы повышает уровень дофамина и серотонина. Повышение уровня обоих этих нейромедиаторов приводит к улучшению настроения и облегчению депрессии. На данный момент в России не зарегистрированы лекарственные препараты с экстрактом Бакопы, однако зарегистрировано множество биологически активных добавок. Экстракт активно изучается, есть много исследований, подтверждающих его эффективность и безопасность для всех возрастных групп [1,4].

• Гинкго двулопастного листьев экстракт сухой – растительный экстракт, который улучшает мозговое кровообращение, нормализуя обмен веществ в клетках и тканях, повышает снабжение мозга кислородом и глюкозой [5].

• Янтарная кислота – оказывает метаболическое, антиоксидантное, антигипоксическое действие. Является мощным регулятором защитных сил организма, улучшает энергетический обмен, активизирует иммунитет, повышает работоспособность.

Следующим этапом стало изучение технологических свойств выбранных субстанций Полученные технологические свойства гопантеновой кислоты приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Технологические свойства гопантеновой кислоты

Технологические свойства	Результаты
Описание	Белый кристаллический порошок
Растворимость	1. 1 г нерастворился до конца в 1 мл 2. 0,1 г растворился в 1 мл
Насыпная плотность	23 мл/14,97 г
Прессуемость	72,4 Н

Так как рынок ноотропных препаратов более чем на 70% состоит из препаратов в виде твердой лекарственной формы, было принято решение подобрать соответствующую назначению препарата жидкую пероральную лекарственную форму.

Проведен анализ рынка ноотропных препаратов, из которого видно, что комбинированные ноотропные препараты составляют малую долю от современного рынка, что говорит об актуальности их разработки.

Выбран предварительный список действующих веществ для дальнейшего изучения, в который вошли: гопантеновая кислота, Бакопа Монье экстракт сухой, Гинкго двулопастного листьев экстракт сухой и янтарная кислота. Также были изучены их технологические свойства. В качестве лекарственных форм разрабатываемого препарата для дальнейшего рассмотрения и проведения экспериментов были выбраны сироп и раствор для перорального применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx (дата обращения: 16.10.2020)

2. Анурова МН, Баряева ЕА, Бахрушина ЕО. Перспективы разработки новой комбинированной лекарственной формы гопантеновой кислоты. Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2017;4(2-5). Доступно по: http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2017-4/2-5.pdf (дата обращения: 05.11.2020). DOI: 10.12737/article_5a058af1129619.97429711.

3. Zavadenko NN, Suvorinova NY, Vakula IN, Malinina EV, Kuzenkova LM. Pharmacotherapy of attention deficit hyperactivity disorder in children: the results of a multicenter double-blind placebo-controlled study of hopantenic acid. Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im SS Korsakova. Media Sphere Publishing Group. 2017;117(5):39. DOI: 10.17116/jnevro20171175139-45

4. Kean JD, Downey LA, Stough C. A systematic review of the Ayurvedic medicinal herb Bacopa monnieri in child and adolescent populations. Complementary Therapies in Medicine. Elsevier BV. 2016 Dec; 29:56–62. DOI: 10.1016/j.ctim.2016.09.002

5. Kennedy DO, Jackson PA, Haskell CF, Scholey AB. Modulation of cognitive performance following single doses of 120 mg Ginkgo biloba extract administered to healthy young volunteers. Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental. Wiley. 2007;22(8)559–66. DOI: 10.1002/hup.885

SUMMARY

DEVELOPMENT OF THE COMPOSITION AND TECHNOLOGY OF COMBINED DRUG WITH NOOTROPIC EFFECT

Shcherbakov M.S., 1st year master's degree student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St.Petersburg, 197376, Russian Federation

This article is devoted to the justification of the choice of the composition of the active ingredients of a combined drug with a nootropic effect. In the course of the work, the following results were obtained: the market of nootropic drugs was analyzed, the active substances for the drug being developed were selected and their technological properties were studied, as well as pharmaceutical forms were selected.

Key words: *nootropic drugs, combined drugs, hopantenic acid, Bacopa Monnieri dry extract, neurological diseases, Ginkgo biloba dry extract.*

REFERENCES

1. State Register of Medicines. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx (accessed 16.10.2020) (in Russ)
2. Анурова М, Anurova M, Баряева Е, Baryaeva E, Бахрушина Е, Bahrushina E. The prospect for the development a new combined medicinal form of hopantenic acid. Journal of New Medical Technologies eJournal. Infra-M Academic Publishing House; 2017 Nov 10;1–1. DOI: 10.12737/article_5a058af1129619.97429711. (in Russ)
3. Zavadenko NN, Suvorinova NY, Vakula IN, Malinina EV, Kuzenkova LM. Pharmacotherapy of attention deficit hyperactivity disorder in children: the results of a multicenter double-blind placebo-controlled study of hopantenic acid. Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im SS Korsakova. Media Sphere Publishing Group. 2017;117(5):39. DOI: 10.17116/jnevro20171175139-45(in Russ)
4. Kean JD, Downey LA, Stough C. A systematic review of the Ayurvedic medicinal herb Bacopa monnieri in child and adolescent populations. Complementary Therapies in Medicine. Elsevier BV. 2016 Dec; 29:56–62. DOI: 10.1016/j.ctim.2016.09.002
5. Kennedy DO, Jackson PA, Haskell CF, Scholey AB. Modulation of cognitive performance following single doses of 120 mg Ginkgo biloba extract administered to healthy young volunteers. Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental. Wiley. 2007;22(8)559–66. DOI: 10.1002/hup.885

РЕГУЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ СУППОЗИТОРИЕВ ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ОСНОВУ

Юнкевич А.М., магистрант 2 года обучения, **Коцур Ю.М.**, аспирант 3 года обучения
Руководитель: **Вайнштейн В.А.**, докт. фарм. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail alisa.yunkevich@spcpu.ru

Было проведено исследование влияния различных ПАВ, таких, как Твин-80, ОС-20, Полоксамер-188 на свойства суппозиторной основы. Были рассмотрены различные составы с разным содержанием данных ПАВ. Также были проведены испытания на готовых суппозиториях 15-и разных составов и были выбраны оптимальные варианты суппозиторных основ. Исходя из полученных данных, суппозитории с добавлением Твин-80 и ОС-20 соответствуют всем требованиям и являются наиболее подходящими для производства.

Ключевые слова: *суппозитории, поверхностно активные вещества, время полной деформации, температура плавления, липофильная основа, суппозиторная основа.*

Суппозитории – твердая при комнатной температуре дозированная лекарственная форма, содержащая одно или более действующих веществ, растворенных или диспергированных в подходящей основе, предназначенная для введения в полости тела и расплавляющаяся (растворяющаяся, распадающаяся) при температуре тела [1].

Суппозитории, в некоторых случаях, имеют преимущества перед другими лекарственными формами (ЛФ). Например, быстрота всасывания действующего вещества быстрее, чем при пероральном и местном применении. Также суппозитории имеют возможность достигать как общего, так и местного действия лекарственного препарата. Суппозитории можно применять при рвотном рефлексе, травмах желудка и пищеварительного тракта и в случаях, когда необходимо достижение терапевтического эффекта в прямой кишке при ректальном введении.

Для обеспечения требуемого пути введения суппозиторная основа должна иметь определенные структурно-механические и реологические свойства. ГФ РФ XIV изд. предъявляет к суппозиториям ряд требований. Так, температура плавления суппозиториев не должна превышать 37^{0}С, время полной деформации суппозиториев на липофильной основе не должно превышать 15 мин и т.д. [1,2,3].

Тип и количество поверхностно-активных веществ (ПАВ) в составе суппозиторной основы оказывают влияние на структурно-механические свойства суппозиториев, а также на стабильность суппозиторной массы [4].

Целью данной работы являлось определение влияния различных ПАВ, таких как Твин-80, ОС-20 и Полоксамер-188, на свойства суппозиторной основы и выбор оптимального состава.

В качестве объектов исследования в работе служили компоненты суппозиторных основ: масло какао и whitepsol H15. В качестве ПАВ использовали: Твин 80, ОС-20, Полоксамер 188.

Для изучения влияния количества ПАВ на свойства суппозиторной основы получали суппозитории в соответствии с составами, приведенными в таблице 1.

Таблица 1 – Составы суппозиторных основ

№ варианта	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Состав в %															
Витепсол Н15	100	70	50	30	68,6	67,2	65,8	64,4	68,6	67,2	65,8	64,4	67,2	65,8	64,4
Масло какао	0	30	50	70	29,4	28,8	28,2	27,6	29,4	28,8	28,2	27,6	28,8	28,2	27,6
Твин 80					2	4,0	6,0	8,0							
ОС-20									2,0	4,0	6,0	8,0			
Полоксамер 188													4,0	6,0	8,0
Итого	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100	100,0	100,0	100,0	100,0	100

Подготавливали все компоненты для получения суппозиторных основ. Брали навески всех компонентов для получения 12 г суппозиторной основы.

Компоненты основ сплавляли в порядке уменьшения температуры плавления в выпарительных чашках на водяной бане (t = 70 – 80^{0}С) при постоянном перемешивании. Полученные сплавы разливали в ячейки формованной суппозиторной ленты по 2,0 г, поддерживая температуру в массе, во избежание преждевременного затвердевания и расслоения массы.

Суппозитории в первичной упаковке охлаждали на воздухе, при комнатной температуре, затем охлаждали в холодильнике при температуре (8 – 15)^{0}С. Охлажденные суппозитории запаивали на автоматической установке Dott Bonapache BP-3 (Италия) и разрезали на стрипы по 5 суппозиториев.

Для полученных суппозиториев проводили изучение свойств в соответствии с требованиями ГФ РВ XIV изд., ОФС.1.4.1.0013.15 Суппозитории. Определяли следующие показатели: внешний вид, средняя масса, температура плавления, время полной деформации [1].

Среднюю массу суппозиториев определяли для каждого состава путем взвешивания 5 полученных суппозиториев. Для полученных значений вычисляли среднее, а также проводили статистическую обработку результатов с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010.

Температуру плавления суппозиториев определяли в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0011.18 Температура плавления по методу каплепадения [2].

Время полной деформации суппозиториев определяли в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.0010.15 Определение времени полной деформации суппозиториев на липофильной основе с использованием тестера Erweka PM 30 (Германия), оснащенного тремя стеклянными трубками, стержнями с иглой и погружаемым термометром [3].

Результаты испытаний графически представлены на рисунках 1-4.

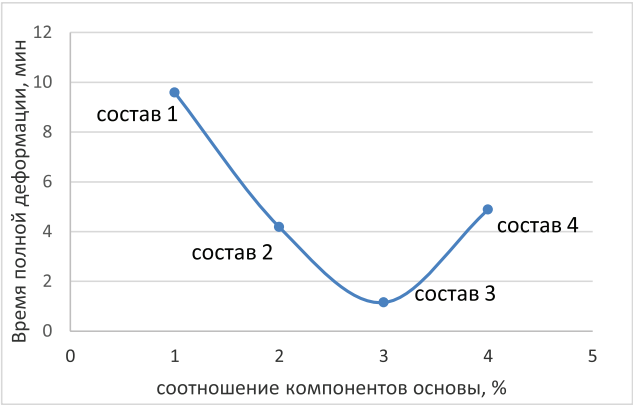
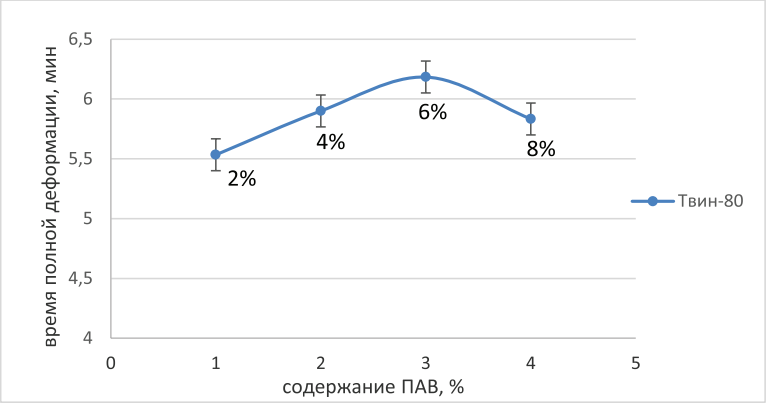


Рисунок 1. Зависимость времени полной деформации от соотношения компонентов основы

Как видно из полученных данных, все опытные составы соответствуют требованиям ГФ IV по времени полной деформации. Однако состав, содержащий только Whitepsol H15, обладал наибольшим временем полной деформации. При этом, состав, содержащий Whitepsol H15 и масло какао в соотношении 1:1 обладал наименьшим временем полной деформации, вероятно, в связи с образованием эвтектической смеси.



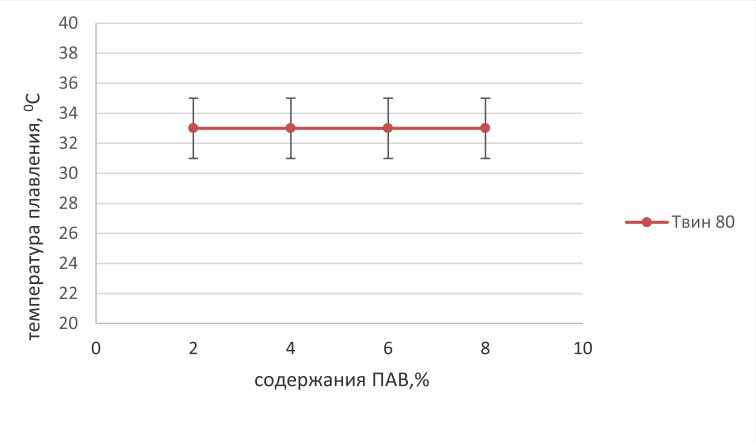
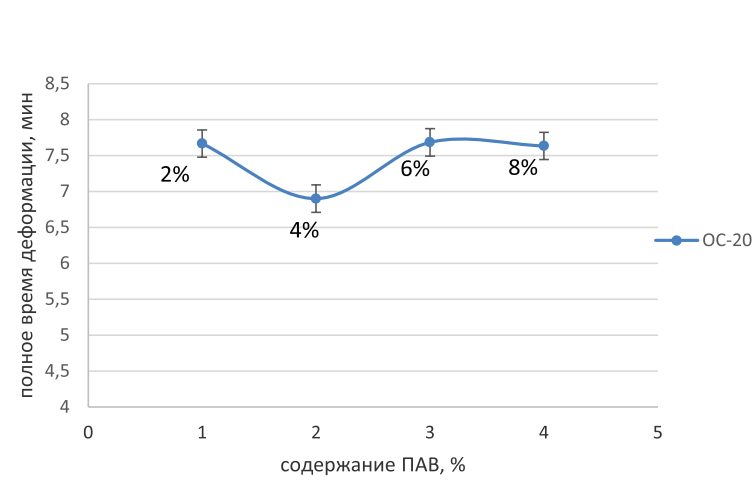


Рисунок 2. Зависимость времени полной деформации от соотношения компонентов основы, зависимость температуры плавления от содержания Твин-80

Результаты показывают, что с увеличением содержания твин-80 в опытных составах, увеличивается время деформации. После добавления ПАВ более 4%, его количество не оказывает влияния на характеристики опытных составов. Температура плавления не зависит от % содержания твин-80 в опытном составе.



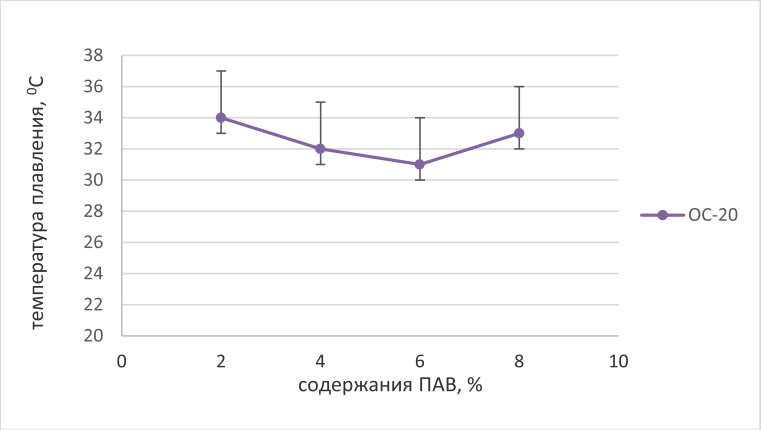
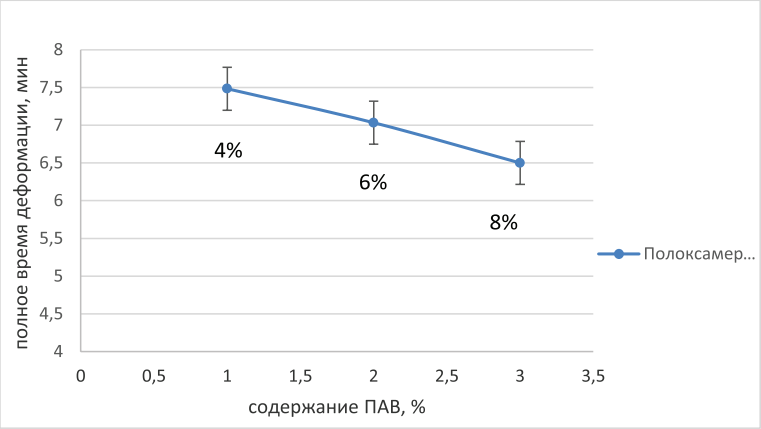


Рисунок 3. Зависимость времени полной деформации от соотношения компонентов основы, зависимость температуры плавления от содержания ОС-20

Температура плавления незначительно уменьшается с увеличением % содержания ОС-20 в опытном составе. Как видно из полученных данных, количество ОС-20 в пределах от 2 до 8%, не влияет на время полной деформации суппозиториев.



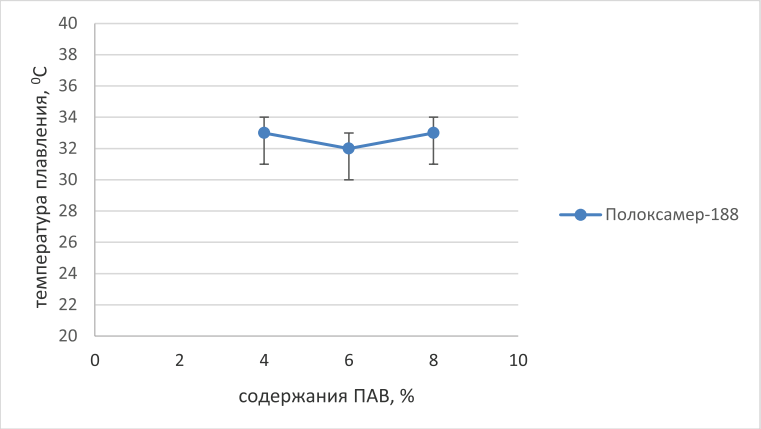


Рисунок 4. Зависимость времени полной деформации от соотношения компонентов основы, зависимость температуры плавления от содержания Полоксамера-188

Результаты показывают, что с увеличением содержания полоксамера-188 в опытных составах, время полной деформации уменьшается. Количество содержания полоксамера-188 в опытных составах не оказывает существенного влияния на температуру плавления.

В соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0013.15, суппозитории должны иметь однородную массу, одинаковую форму и обладать твердостью, обеспечивающей удобство применения. Однородность определяют визуально на продольном срезе по отсутствию вкраплений. На срезе допускается наличие воздушного стержня или воронкообразного углубления.

Определение внешнего вида показало, что композиции 1-12 соответствуют указанным требованиям. В композициях 13-15, содержащих полоксамер, наблюдалось расслоение, кроме того, данные составы обладают хрупкостью, в связи с чем, не могут быть применены для приготовления суппозиториев. При этом составы 7, 8, обладали высокой плавкостью и легко деформировались в руках.

На основании экспертной органолептической оценки, можно сделать вывод, что с увеличением ПАВ в основе суппозитории становятся более мягкими и плавкими, легко деформируются в руках, что влияет на потребительские свойства.

Оптимальными свойствами обладают составы под номерами 1, 2, 5 и 6, в которых содержатся дополнительно к основе эмульгаторы I-го рода: твин-80 или ОС-20 в количестве 2–4 %. В составах, содержащих полоксамер-188, наблюдалось расслоение.

Также, на основании результатов изучения температуры плавления и времени полной деформации, можно сделать вывод, что количество ПАВ в опытных составах практически не влияет на данные показатели. Таким образом, выбор оптимальных составов основывался на комплексной оценке органолептических и фармакопейных показателей суппозиториев.

Выбранные оптимальные варианты липофильных основ, содержащие 2 – 4 % твина-80 или ОС-20, могут быть с успехом использованы для получения суспензионных суппозиториев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея XIVизд. ОФС 1.4.1.0013.15. Суппозитории. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

2. Государственная фармакопея XIVизд. ОФС 1.2.1.0011.18. Температура плавления. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

3. Государственная фармакопея XIVизд. ОФС 1.4.1.0010.15. Определение времени полной деформации суппозиториев на липофильной основе. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

4. Демина НБ, Анурова МН. Суппозитории: аспекты модернизации лекарственной формы. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016;4(17):92-97.

SUMMARY

REGULATION OF THE PROPERTIES OF SUPPOSITORIES BY INTRODUCING SURFACTANTS INTO THE BASE

Yunkevich A.M., master. 2nd year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A study was made of the effect of various surfactants, such as Tween-80, OS-20, Poloxamer-188, on the properties of the suppository base. Were considered various compositions with different contents of these surfactants. Also, tests were carried out on ready-made suppositories of 15 different compositions and the optimal options for suppository bases were selected. Based on the data obtained, suppositories with the addition of Tween-80 and OS-20 meet all the requirements and are the most suitable for production.

Key words: *suppositories, surfactants, complete deformation time, melting point, lipophilic base, suppository base.*

REFERENCES

1. Gosudarstvennaya Pharmacopoeia XIV ed. OFS 1.4.1.0013.15. Suppositories. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)

2. Gosudarstvennaya Pharmacopoeia XIV ed. OFS 1.2.1.0011.18. Temperatura plavleniya. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)

3. State Pharmacopoeia XIV ed. OFS 1.4.1.0010.15. Opredeleniye vremeni polnoy deformatsii suppositoriev na lipofilnoy osnove. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)

4. Demina NB, Anurova MN. Suppositories: aspecti modernizatsii lekarstvennoy formi. Razrabotka I registratsia lekarstvennih sredstv. 2016;4(17):92-97. (in Russ)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ЭКСТРАКЦИОННОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗИТРОМИЦИНА В СУППОЗИТОРИЯХ НА РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ОСНОВ

Яговкин И.В., ординатор 1 года обучения
Руководитель: **Ладутько Ю.М.**, канд. фарм. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: igor.jagovkin@pharminnotech.com

Проведена валидационная оценка пригодности методики качественного и количественного анализа азитромицина в суппозиториях на различных типах суппозиторных основ методом экстракционной спектрофотометрии по реакции с эозинатом натрия.

Ключевые слова: *фотометрия, экстракционная фотометрия, спектрофотометрия, активные фармацевтические субстанции, количественный и качественный анализ, валидация аналитических методик, суппозитории, антибиотики, макролиды и азалиды, азитромицин.*

Антибиотикотерапия – одно из важнейших направлений развития современной фармакологии. В качестве одной из групп для лечения инфекционных заболеваний органов дыхания рассматривают макролиды и азалиды, в частности – азитромицин. Препараты этой фармакологической группы достаточно широко применяются в медицинской практике благодаря проявлению хороших клинико-экономических результатов при наиболее распространенных инфекциях и занимают одно из ведущих мест в повседневных назначениях. Отличительной особенностью макролидов является их способность к накоплению в поражённой ткани – они являются «тканевыми антибиотиками» [2, 6].

Азитромицин выделяется среди других препаратов данной группы большой продолжительностью действия и возможностью его использования коротким трёхдневным курсом, обладая при этом наименьшим количеством побочных эффектов. Растворимость азитромицина дигидрата в воде очень низкая, и составляет всего порядка 1,1 мг/мл при 37 °С, что обычно является препятствием для введения субстанции в таблетки или капсулы и неблагоприятно сказывается на высвобождении лекарственного средства и всасывании invivo [2, 5, 6].

Отличной альтернативой пероральных лекарственных форм служат ректальные формы, в частности – суппозитории. Они представляют собой наиболее широко распространённую лекарственную форму для ректального введения. Выбор суппозиторной основы зависит от физико-химических свойств активной фармацевтической субстанции (АФС), а также от желаемых параметров высвобождения. Если необходимо создать суппозиторий с высокой концентрацией АФС, нерастворимой в основе, выбирают основу, температура плавления которой будет меньше 37 °С [5].

Разработка и валидация аналитических методик качественного и количественного определения в субстанциях и готовых лекарственных средствах для рутинного анализа, которые не требуют значительного расхода растворителей и реактивов, продолжительного времени проведения анализа, позволяющие получать наиболее точный результат, продолжают оставаться одними из актуальных проблем контроля и обеспечения качества [1].

Объекты исследования: АФС – Азитромицина дигидрат; суппозиторные основы: сплав из WitepsolW35 и WitepsolH15 (1:2), масло какао. При изготовлении суппозиториев использовали методы выливания (сплав из WitepsolW35 и WitepsolH15) и выкатывания (масло какао). В работе использовали мерную посуду класса А, мультиротатор MultiBioRS-24, аналитические весы Sartorius CP224S, настольную центрифугу Armed 80-2, pH-метр FiveEasy; рабочий стандартный образец АФС (Pharmaceutical Secondary Standard, CRM), из которого готовили 1% модельные спиртовые растворы с концентрацией 10 мг/мл; трихлорметан х.ч. (АО «Вектор»), свежеприготовленный 1% водный раствор эозината натрия. Регистрацию спектральных характеристик проводили с помощью спектрофотометра СФ – 2000 (ОКБ «Спектр») в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовался трихлорметан (хлороформ).

В настоящее время количественное определение азитромицина дигидрата в лекарственных формах обычно проводится методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [3]. Кроме того, имеются публикации об использовании метода капиллярного электрофореза для качественного и количественного анализа азитромицина [8]. В то же время следует отметить, что, например, для проведения биофармацевтических исследований требуется более доступный с экономической точки зрения метод, не требующий дорогостоящего и, что немало важно в настоящее время, импортного аппаратного обеспечения. Метод анализа должен быть доступным без длительной специальной подготовки персонала. Также стоит отметить, что при анализе лекарственных форм, особенно мягких, не всегда удается полностью очистить пробу, вводимую в колонку хроматографа, от компонентов основы и вспомогательных веществ, что в свою очередь может привести к быстрому выходу дорогостоящей хроматографической колонки из строя. Альтернативой методу ВЭЖХ может служить экстракционно – фотометрический метод анализа [3, 4].

Прямое определение азитромицина спектрофотометрией невозможно, так как вещество недостаточно поглощает в ультрафиолетовой области спектра. Макролиды незначительно поглощают электромагнитное излучение ближнего УФ-диапазона, поэтому не могут быть с достаточной чувствительностью определены методом прямой УФ-спектрофотометрии. При данном методе анализа значение имеют следующие факторы: объем экстрагента, кратность экстракции, время экстракции, порядок добавления реактивов и некоторые другие. Требования к пробе для такого анализа намного более мягкие, чем при хроматографировании. Поэтому ранее была разработана методика экстракционной фотометрии для глазных капель с азитромицином [4]. Она основана на образовании ионных ассоциатов азитромицина с красителями. Ассоциаты экстрагируются хлороформом и проводится спектрофотометрическое исследование. В качестве комплексообразующего агента в методике предлагается использование эозината натрия, для ассоциата данного красителя с азитромицином характерно поглощение при длине волны, равной 540 нм, что соответствует видимой области спектра [1, 4, 7].

На рисунке 1 представлен спектр поглощения ионного ассоциата азитромицина с эозинатом натрия.

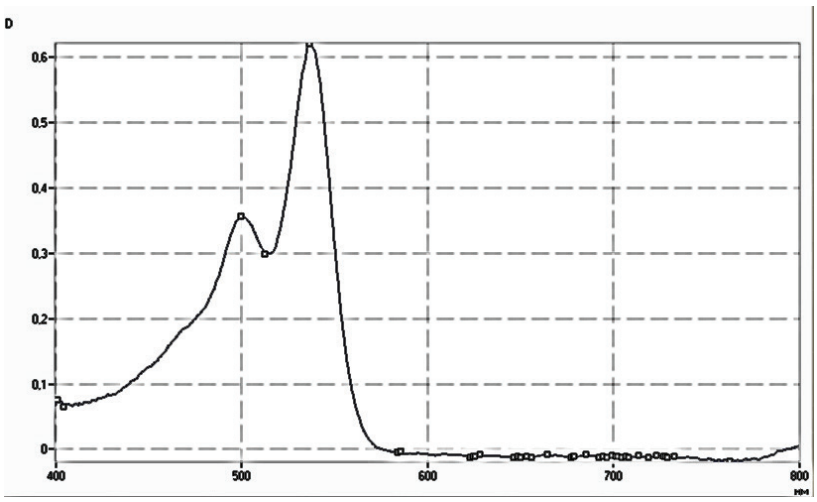


Рисунок 1. Спектр поглощения ионного ассоциата азитромицина с эозинатом натрия

Методика экстракционной спектрофотометрии была применена и адаптирована для анализа суппозиториев, содержащих азитромицина дигидрат в количестве 100 мг. В пластиковую пробирку, объемом 15 мл, вносили 10 мл универсальной буферной смеси с pH, равным 6, далее в неё помещали навеску суппозитория и нагревали на водяной бане до расплавления суппозиторной массы. Затем перемешивали и отбирали 1 мл, к полученной смеси добавляли 1 мл 1% водного раствора эозината натрия. Далее проводили процесс экстракции хлороформом, объемом 10 мл в течение 5 минут. Хлороформные извлечения фильтровали через фильтр «Красная лента» и слой безводного сульфата натрия для удаления остаточной воды. Оптическую плотность хлороформного извлечения измеряли с помощью спектрофотометра в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны, равной 540 нм. Одновременно проводили измерение оптической плотности стандартного раствора. Расчёт производился по калибровочной кривой. Полученные результаты приведены в таблице 1 [4].

Таблица 1 – Результаты воспроизводимости методики определения азитромицина дигидрата методом экстракционной спектрофотометрии

№	Навеска азитромицина	Масса лекарственной формы	Оптическая плотность	Найдено азитромицина		ε, %	RSD,%
				г	%		
Стандартный образец							
1	0,1005	-	1,655	0,0995	99,02	1,0%	0,2
2	0,1023	-	1,739	0,1044	102,98	3,3%	
3	0,1001	-	1,631	0,0981	97,98	2,0%	
4	0,1021	-	1,746	0,1050	102,83	2,8%	
5	0,1048	-	1,794	0,1083	103,93	4,0%	
6	0,1007	-	1,656	0,0996	98,89	1,1%	
Среднее		-	1,715	0,1031	-	-	-
Сплав из WitepsolW35 и WitepsolH15 (1:2)							
1	0,1018	1,1989	1,698	0,1021	100,30	0,3%	0,5
2		1,1999	1,774	0,1067	104,79	4,8%	
3		1,1996	1,664	0,1001	98,29	1,7%	
4		1,1988	1,802	0,1084	106,44	6,4%	
5		1,1982	1,739	0,1046	102,72	2,7%	
6		1,1993	1,834	0,1103	108,33	8,3%	
Среднее		1,1992	1,763	0,1060	-	-	-
Масло какао							
1	0,0998	1,055	1,732	0,1041	104,36	4,4%	0,4
2		1,015	1,613	0,0970	97,19	2,8%	
3		1,032	1,644	0,0989	99,06	1,1%	
4		1,052	1,702	0,1024	102,65	2,4%	
5		1,022	1,615	0,0971	97,31	2,7%	
6		1,011	1,591	0,0959	97,01	3,0%	
Среднее		1,031	1,652	0,0993	-	-	–

В результате проделанной работы была адаптирована и частично валидирована методика экстракционно – фотометрического определения глазных лекарственных форм с азитромицином для анализа суппозиториев, содержащих азитромицина дигидрат в количестве 100 мг. Рассчитаны показатели воспроизводимости методики для количественного определения азитромицина дигидрата в суппозиториях на двух различных основах.

Первоначальная валидационная оценка данной методики показала ее пригодность для количественного определения азитромицина в ректальных лекарственных формах. Актуальна дальнейшая работа по улучшению и валидации данной методики для качественного и количественного анализа всевозможных лекарственных форм с азитромицина дигидратом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валиев АХ, Георгиянц ВА, Здорик АА. Разработка и валидация методики количественного определения азитромицина. Актуальные проблемы медицины. 2012;10(129):107–110.

2. Веселов РС, Козлов АВ. Азитромицин: современные аспекты клинического применения. Клин. микробиология и антимикроб. Химиотерапия. 2006;8(1):18-32.

3. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 3. ФС.2.1.0049.18 «Азитромицина дигидрат». Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

4. Гусов РМ, Вергейчик ЕН, Гусова БА. Экспериментальное обоснование возможности использования метода экстракционной фотометрии для определения азитромицина в глазных лекарственных формах. Актуальные проблемы медицины. 2016;12(233):135-142.

5. Демина НБ. Современные аспекты производства лекарственной формы суппозитории. Фармацевтическая технология и нанотехнологии. 2016;2(16):60-69.

6. Ходош ЭМ, Ефремова ОА, Ефименко ЕВ. Антибиотикотерапия и макролиды: фрагменты понимания. Актуальные проблемы медицины. 2016;12(233):27-33.

7. Gouda A, Ragaa E-S, Khalil M. Spectrophotometric Determination of Certain Macrolide Antibiotics in Pharmaceutical Preparations. International Journal of TechnoChem Research. 2015;1(1):11-14.

8. Kumar A, Park J. Azithromycin as a new chiral selector in capillary electrophoresis. Journal Chromatography Science. 2011;1218(9):1314–1347.

SUMMARY

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF THE POSSIBILITY OF USING THE METHOD OF EXTRACTION SPECTROPHOTOMETRY FOR DETERMINATION OF AZITHROMYCIN IN DIFFERENT BASES TYPES IN SUPPOSITORIES

Iagovkin I.V., first year resident
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A validation assessment of the suitability of the method for the qualitative and quantitative analysis of azithromycin in suppositories on various types of suppository bases by the method of extraction spectrophotometry by reaction with sodium eosinate was carried out.

Key words: *photometry, extraction photometry, spectrophotometry, active pharmaceutical ingredients, quantitative and qualitative analysis, validation of analytical methods, suppositories, antibiotics, macrolides and azalides, azithromycin.*

REFERENCES

1. Valiev A.H., Georgiyants V.A., Zdorik A.A. Development and validation of a method for the quantitative determination of azithromycin. Actual problems of medicine. 2012;10(129):107-110. (in Russ)

2. Veselov RS, Kozlov AV. Azithromycin: current aspects of clinical use. Wedge. microbiology and antimicrobial. Chemotherapy. 2006;8(1):18-32. (in Russ)

3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. Volume 3. FS.2.1.0049.18 “Azithromycin dihydrate”. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)

4. Gusov RM, Vergeichik EN, Gusova BA. Experimental substantiation of the possibility of using the extraction photometry method for the determination of azithromycin in ophthalmic dosage forms. Actual problems of medicine. 2016;12(233):135-142. (in Russ)

5. Demina NB. Modern aspects of the production of the dosage form of suppositories. Pharmaceutical technology and nanotechnology. 2016;2(16):60-69. (in Russ)

6. Khodosh EM, Efremova OA, Efimenko EV. Antibiotic Therapy and Macrolides: Fragments of Understanding. Actual problems of medicine. 2016;12(233):27-33. (in Russ)

7. Gouda A, Ragaa E-S, Khalil M. Spectrophotometric Determination of Certain Macrolide Antibiotics in Pharmaceutical Preparations. International Journal of TechnoChem Research. 2015;1(1):11-14.

8. Kumar A, Park J. Azithromycin as a new chiral selector in capillary electrophoresis. Journal Chromatography Science. 2011;1218(9):1314–1347

ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА КОМБИНИРОВАННОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРА С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ

Салахетдинов Д.Х., асп. 3 года обучения
Руководитель: **Сысуев Б.Б.**, докт. фарм. наук, проф.
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ
ВО ВолгГМУ Минздрава России, 357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11, РФ
E-mail: erabahche04@gmail.com

Показана перспективность разработки комбинированной формы цитиколина и мемантина для терапии когнитивных расстройств, вызванных сосудистой патологией: последствий хронических цереброваскулярных заболеваний, геморрагических и ишемических нарушений мозгового кровообращения.

Ключевые слова: *нейропротектор, цитиколин, мемантин, когнитивные расстройства, таблетки, ноотропы.*

Нарушение высших мозговых функций является самым распространенным видом неврологических расстройств, встречающимся в медицинской практике. По данным ВОЗ, свыше 35 млн людей в мире страдают выраженными формами когнитивных нарушений. Поэтому актуальной является разработка современных подходов к фармакотерапии нейродегенеративных заболеваний. Цитиколин – препарат для улучшения когнитивных расстройств, обладающий ноотропным и нейрометаболическим действием за счет восстановления поврежденных мембран, ингибирования фосфолипаз, антиоксидантного действия, подавления гибели клеток, действия на метаболизм нейромедиаторов. Мемантин (антагонист NMDA глутаматных рецепторов) – безопасная и эффективная альтернатива антипсихотическим средствам для людей с сердечно-сосудистыми или цереброваскулярными рисками.

Клиническими исследованиями доказана безопасность и эффективность совместного применения мемантина и цитоколина при когнитивных нарушениях. Оба компонента хорошо изучены и зарегистрированы в РФ в качестве монопрепаратов. Цитиколин доступен на российском рынке в форме раствора для внутривенного и внутримышечного введения, раствора для приема внутрь и таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Зарегистрированные таблетки цитиколина являются формой с обычным высвобождением (максимальная концентрация в плазме крови достигается через 1-3,5 часа после приема). Мемантин выпускается в твердых лекарственных формах (таблетки). Время достижения максимальной концентрации мемантина в плазме крови в интервалах 2-6 часов и 3-8 часов. Таким образом, лекарственные формы мемантина (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, и таблетки, диспергируемые в полости рта), представленные на фармацевтическом рынке, относятся к формам с обычным высвобождением.

Очевидна перспективность разработки комбинированной формы цитиколина и мемантина для терапии когнитивных расстройств, вызванных сосудистой патологией: последствий хронических цереброваскулярных заболеваний, геморрагических и ишемических нарушений мозгового кровообращения. Комбинированная форма улучшит комплаенс, что актуально, учитывая длительность терапии: минимальная продолжительность лечения цитиколином до 6 недель.

Твердая пероральная лекарственная форма и технология модифицированного высвобождения: мемантин – немедленное высвобождение, цитиколин – пролонгированное высвобождение, даст клинические преимущества. Технологический подход, позволяющий реализовать данную концепцию, заключается в производстве таблеток-ядер, содержащих цитиколин пролонгированного высвобождения, с последующим нанесением пленочной оболочки с мемантином немедленного высвобождения. Далее на таблетки планируется нанесение пленочной оболочки для эстетического вида и легкости проглатывания.

Аддитивные технологии и фармации и медицине

Аддитивные технологии открывают новые возможности в сферах наук о жизни – медицины и фармации. Традиционно лаборатория аддитивных технологий «Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета» проводит специализированную тематическую секцию в рамках Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО». В программе работы секции представлены конкурсные исследовательские работы аспирантов, магистрантов и студентов; мастер классы и доклады партнеров университета и лаборатории.

Объективные обстоятельства внесли коррективы в работу конференции – дистанционный режим ограничил возможность проведения мастер-классов, демонстрации технологий и оборудования.

23 апреля 2021 в онлайн-дискуссии приняли участие:

Hot Melt Extrusion for Pharmaceutical Implant Manufacturing and 3D Printing
Dr.-Ing. Margarethe Richter
Pharma Application Specialist
Thermo Fisher Scientific

Решения компании Nordson для дозирования в медицинской сфере
Кирилл Александрович Ронжин
Nordson EFD Россия

Приборы термического анализа: дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) и термогравиметрический анализ (ТГА) для решения фармацевтических задач
Максим Усачев
Меттлер-Толедо Восток
Шандрюк Георгий
Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН)

В конкурсной программе I место жюри единогласно присудило ***Кондаковой Юлии Александровне,*** магистранту 1 курса за доклад на тему: **«ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛИМЕРА НА СВОЙСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПЛЁНОК»**.

Модератор секции
Денис Николаевич Маймистов
заведующий лабораторией аддитивных технологий ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Аддитивные технологии и фармации и медицине

23 апреля 2021 10:00

Трансляция заседания тематической секции доступна по ссылке и QR-коду

https://spcpu.ru/himfarm_life/events/2491/

Научный редактор секции

Терентьева Оксана Андреевна, н.с. лаборатории аддитивных технологий
ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. фармацевт. наук

Лаборатория аддитивных технологий

Маймистов Денис Николаевич, заведующий лабораторией аддитивных технологий
ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Программа конференции доступна по ссылке и QR-коду

http://www.ypharm.spcpu.r

РАЗРАБОТКА ПОРТАТИВНОГО ДОЗИРУЮЩЕГО УСТРОЙСТВА.

Алиев А.Р., студ. 2 курса
Руководитель: **Гусев К.А.**, младший научный сотрудник
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.14, Российская Федерация
E-mail: Andrej.aliev@spcpu.ru

Процесс подачи точного количества вещества, в том числе повышенной вязкости, представляет особую актуальность в сферах биопечати и аддитивных технологий в фармации. Изучен вопрос проектирования портативного дозирующего устройства для фармацевтических задач. Были определены условия эксплуатации и требования к конструкции. С учетом всех исходных параметров была разработана конструкция и подобраны компоненты для сборки.

Ключевые слова: *дозирующие устройство, дозирование вязких материалов, шприцевое дозирование, 3D печать, проектирование системы подачи, полужидкостная печать.*

Шприцевые системы дозирования приобрели свою популярность благодаря широкому спектру применений, при сравнительно низкой стоимости изготовления и доступности материалов. Так, например, одним из ключевых элементов аддитивного производства является система дозирования. Создание портативного лабораторного дозирующего устройства позволит экструдировать вязкие жидкости, гели или пасты, кроме того данные устройство можно будет установить на 3D принтер в качестве печатающей головки. Система подачи создаёт необходимые потоки и давления при подаче жидких компонентов на рабочую поверхность принтера. Система подачи состоит из поршневой пары, в которой находится жидкая вязкая среда и системы точного перемещения поршня. При движении поршня вниз, в системе образуется избыточное давление, которое выталкивает состав из шприца, в результате чего он наносится на рабочий стол. Такая система позволяет развивать большие давления, обеспечивать равномерность подачи жидкости и позволяет достичь большой точности при контроле потоков жидкостей, используемых при печати. Данная технология является широко используемой в сфере научно-исследовательской деятельности и в последнее десятилетие увеличилось количество публикаций по способам применения шприцевых дозаторов. В качестве примера, система дозирования позволяет исследовать: метод создания лекарственных пленок с помощью технологии 3D печати [7] и метод создания мягких корпусов для роботизированных систем [1], напечатанные по технологии послойного наплавления фильеры (матрицы) [2] и новый метод аддитивного производства для получения гибких чувствительных структур для интеллектуальных систем [5].

Требования к устройству.

Необходимо разработать портативное дозирующее устройство. Для реализации малых габаритов и возможности частой транспортировки вес дозатора должен быть минимальным, также это позволит использовать устройство в паре с 3D принтером и на лабораторном стенде. Шприцевое крепление должно быть спроектировано под установку шприцев различного объема (3 – 10мл) и формы. Фиксирование шприца должно происходить быстро и с минимальными усилиями со стороны оператора. Необходимо экструдировать вязкие жидкости, гели или пасты.

При разработке системы подачи важно выбрать правильные материалы для изготовления поршневой пары. Первоначально рассматривался вариант по изготовлению собственных пар. В виду высокой стоимости, отсутствия расходных компонентов к самостоятельно изготовленным парам, было принято решение использовать стандартные комплектующие. Были выбраны шприцы Nordson EFD, максимальное рабочее давление до 5 * 10^5 Па (50 атм), материал шприцов полипропилен, который способен выдержать высоко агрессивные водные среды, а также ряд органических растворителей.

Приводящий механизм – шаговый электродвигатель, который должен обеспечить необходимое усилие для равномерного продавливания вязких субстанций. Жесткость движения шприцевого поршня по оси Z обеспечивается за счет движения каретки по рельсе. Все элементы приводящего механизма следует закрепить на стандартном алюминиевом профиле Bosch Rexroth. Все электропроводящие элементы должны быть изолированы от механического контакта во избежание разрыва электроцепи.

Предполагаемые габариты устройства ширина 100, глубина 60, высота 300 мм. .

Комплектующие детали для разработки.

Шприцы Optimum компании Nordson EFD 3 $см^3$, 5 $см^3$, 10 $см^3$. Материал шприцов полипропилен. Также данные шприцы разработаны для выдавливания высоковязких материалов, имеют крепление luer lock для игл и обеспечивают рабочее давление в 5 * 10^5 Па (50 атм).

Дозирующие насадки общего назначения (иглы) Optimum компании Nordson EFD.

Игла розовая внутренним диаметром 0,61 мм обеспечивает оптимальную точность и скорость нанесения, соответственно отклонения по массе и форме сводятся к минимуму. Разработаны компанией Nordson для дозирования вязких жидкостей, оснащены креплением luer lock и имеют широкую линейку диаметров, выполнены с высокой точностью.

Ходовой винт с прямоугольной резьбой диаметром 8 мм с латунной гайкой. Данный винт был выбран с учетом надежности и долговечности. Такой винт не имеет эффекта самоторможения, что увеличивает срок эксплуатации конструкции.

Рельсовая направляющая с опорным модулем (кареткой) MGN-12H, длина направляющей 200 мм. Снижает нагрузку на подшипник электродвигателя и обеспечивает жесткое закрепление поршневого механизма, обеспечивает точность перемещения.

Элементы сопряжения изготавливаются 3D печатью методом послойного наплавления, модели которых создаются в программе КОМПАС-3D.

Шаговый электродвигатель NEMA 17 SL42STH40-1684A, Габарит: 42 мм, Длина корпуса: 40 мм, Ток фазы: 1.68 А, Удерживающий момент: 4.0 кг*см, Количество выводов: 4, Полный шаг: 1.8°, Центрирующий диаметр: 22 мм, односторонний вал, Диаметр выходного вала: 5 мм.

Муфта соединительная d_1 = 8 мм, d_2 = 5 мм, жесткая. Обеспечивает жесткое соединение и передачу усилия вала двигателя на ходовой винт.

Профиль алюминиевый квадратного сечения со стороной 20 мм, производства Bosch Rexroth (Германия). Данный профиль имеет большое количество универсальных креплений для сопряжения с другими элементами конструкции. Является стандартным решением для создания каркаса сборных конструкций благодаря универсальности и высокому качеству исполнения.

Изучен вопрос проектирования портативного дозирующего устройства для фармацевтических задач. Были предложены основные критерии и подобраны компоненты для реализации поставленной задачи. Проектирование собственного устройства позволяет сократить финансовые расходы и создать устройство под конкретные задачи исследователей. Модульная конструкция дает возможность легко заменять компоненты и модернизировать устройство.

ЛИТЕРАУРА

1. Morrow J, Hemleben S. Menguc Y. Directly fabricating soft robotic actuators with an opensource 3-D printer, IEEE Robotics and Automation Letters2017;2(1):277–281. doi:10. 1109/LRA.2016.2598601.

2. Beeker LY, Pringle AM, Pearce JM, Open-source parametric 3-D printed slot die system for thin film semiconductor processing, Additive Manufacturing. 2018;20:90–100. doi:10.1016/j.addma.2017.12.004.

3. Klar V, Pearce JM, Kärki P, & Kuosmanen P. Ystruder: open source multifunction extruder with sensing and monitoring capabilities. HardwareX, e00080. 2019 doi:10.1016/j.ohx.2019.e00080

4. Пара винт-гайка. Моушн продактс. Официальный дистрибьютор NKE Austria GMBH Доступно по: https://www.motionproducts.ru/upload/iblock/120/1200e7e4989a3810d6c85b6a6cc7d085.pdf (дата обращения 15.06.2020).

5. Nassar H. Ntagios M,. Navaraj WT, Dahiva R, Multi-Material 3D Printed Bendable Smart Sensing Structures, in: 2018 IEEE SENSORS, IEEE. 2018: 1–4. doi:10.1109/ICSENS.2018.8589625

6. Hinton TJ, Jallerat Q, Palchesko RN, Park JH. et al. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspendedhydrogels, Science Advances. 2015;1(9). e1500758. doi:10.1126/sciadv.1500758.

7. Кондакова ЮА. Технология 3D печати в производстве пленок: дипломная работа. Санкт-Петербург: СПХФУ, 2020.

SUMMARY

Aliev A.R. 2nd year student
St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The process of supplying an exact amount of a substance with increased viscosity is of particular relevance in the fields of bioprinting and additive technologies in pharmacy. The question of designing a portable dosing device for pharmaceutical tasks is studied. The operating conditions and design requirements were determined. Taking into account all the initial parameters, the design was developed and the components for assembly were selected.

Key words: *dispensing device, viscous material dispensing, syringe dispensing, 3D printing, feeding system design.*

REFERENCES

1. Morrow J, Hemleben S. Menguc Y. Directly fabricating soft robotic actuators with an opensource 3-D printer, IEEE Robotics and Automation Letters2017;2(1):277–281. doi:10. 1109/LRA.2016.2598601.

2. Beeker LY, Pringle AM, Pearce JM, Open-source parametric 3-D printed slot die system for thin film semiconductor processing, Additive Manufacturing. 2018;20:90–100. doi:10.1016/j.addma.2017.12.004.

3. Klar V, Pearce JM, Kärki P, & Kuosmanen P. Ystruder: open source multifunction extruder with sensing and monitoring capabilities. HardwareX, e00080. 2019 doi:10.1016/j.ohx.2019.e00080

4. Pair of screw-nut. Motion products. Official distributor of NKE Austria GMBH. Available at: https://www.motion-roducts.ru/upload/iblock/120/1200e7e4989a3810d6c85b6a6cc7d085.pdf (accessed 15.06.2020). (in Russ)

5. Nassar H. Ntagios M,. Navaraj WT, Dahiva R, Multi-Material 3D Printed Bendable Smart Sensing Structures, in: 2018 IEEE SENSORS, IEEE. 2018: 1–4. doi:10.1109/ICSENS.2018.8589625

6. Hinton TJ, Jallerat Q, Palchesko RN, Park JH. et al. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspendedhydrogels, Science Advances. 2015;1(9). e1500758. doi:10.1126/sciadv.1500758.
7. Kondakova JA. 3D printing technology in the production of films: thesis. Saint Petersburg: SPCPU, 2020. (in Russ)

РАЗРАБОТКА ФИЛАМЕНТОВ, СОДЕРЖАЩИХ РАМИПРИЛ, МЕТОДОМ ЭКСТРУЗИИ ГОРЯЧЕГО РАСПЛАВА

Гусев К.А., аспирант 1 года обучения
Руководитель: **Флисюк Е.В.**, профессор, доктор фармацевтических наук
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.14, Российская Федерация
E-mail: konstantin.gusev@pharminnotech.com

Разработка гипотензивных препаратов является актуальной, в ходе выполнения работы была изучена литература и подобраны условия для получения филаментов, содержащих субстанцию рамиприла, методом экструзии горячего расплава, пригодных для трехмерной печати лекарственных форм.

Ключевые слова: *горячая экструзия, рамиприл, влагопоглощение, расплав, полимер-носитель, 3D печать.*

В ходе работы были изучены методики определения физико-химических и технологических свойств субстанции рамиприла, проанализированы ее свойства.

Во время разработки состава и технологии экструдата, пригодного для дальнейшей 3D печати лекарственного препарата для лечения артериальной гипертензии, представляющего собой твердую лекарственную форму (ЛФ) в виде таблетки, была использована активная фармацевтическая субстанция: рамиприл (ингибитор ангитензинпревращающего фермента), и вспомогательные вещества, которые соответствовали требованиям мировых фармакопей и государственной фармакопеи XIV издания.

В ходе исследований по разработке ЛФ были использованы различные группы вспомогательных веществ и полимеров-носителей: разбавители, разрыхлители (Kollidon® CL-F, BASF, Германия), связующие вещества, вещества, способствующие скольжению (Alubra® PG 100, DuPont, США), вещества для образования твердой дисперсной системы (Kollidon® VA 64, BASF, Германия; Soluplus®, BASF, Германия), пластификаторы (Kolliphor® P188, BASF, Германия; Полиэтиленгликоль 1500). Все вещества прошли входной контроль качества.

Для получения филаментов было разработано 8 составов (таблица 1). Активная фармацевтическая субстанция, носители и пластификаторы содержались в различных соотношениях. Вещества смешивали вручную, используя ступку и пестик. Затем смесь экструдировали с использованием двухшнекового экструдера (Thermo Fisher HAAKE Mini CTW) через сопло диаметром 1,6 мм.

Таблица – Составы для получения филаментов

Вещество	Содержание (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Рамиприл	3	3	3	3	3	4	3	3
Kollidon® VA 64	65	70	-	-	56	77	70	77
Soluplus®	-	-	77	82	20	-	-	-
маннитол	10	10	-	-	-	-	-	-
$MgCO_3$	2	2	5	5	-	-	-	-
ПЭГ 1500	20	15	15	10	10	8	15	8
Kollidon® CL-F	-				5	5	5	5
Kolliphor® P 188	-		-	-	3	3	3	3
Na_2CO_3 б/вод	-		-	-	2	2	2	2
Alubra® PG-100	-		-	-	1	1	2	2

В результате оценки технологических свойств подобранных составов пригодным к печати оказался состав №8, содержащий Рамиприл (3%), Kollidon® VA 64 (77%), ПЭГ 1500 (8%), Kollidon® CL-F (5%), Kolliphor® P 188 (3%), Na_2CO_3 б/вод (2%), Alubra® PG-100 (2%).

Для всех составов была оценена распадаемость, особенно следует отметить, что филаменты из состава №8 распались за 2,5 минуты в отличии от чистого Kollidon VA64, время распадаемости филаментов которого составило 6 минут 10 секунд.

Из состава №8 были успешно напечатаны на 3D принтере модельные таблетки различного диаметра:

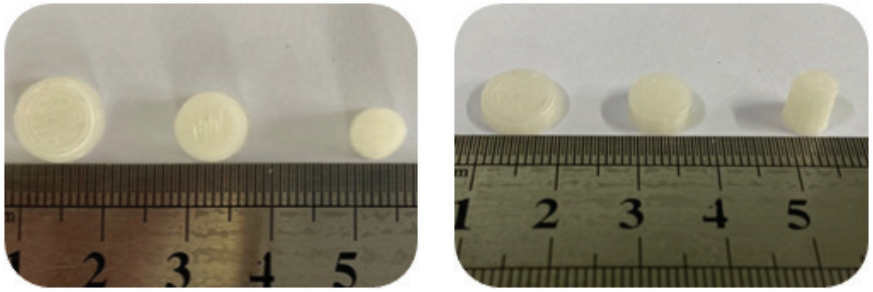


Рисунок. Модельные таблетки субстанции рамиприла

На основании полученных данных были подобраны оптимальные полимерные композиции для получения филаментов. В качестве полимеров носителей использовался ПВП марки Kollidon® VA64 и привитый сополимер ПЭГ 6000, винилкапролактама и винилацетата (13:57:30) марки Soluplus®. При разработке состава было выяснено, что Kollidon® VA64 позволяет филаментам распадаться за более короткий промежуток времени, чем Soluplus®. Для уменьшения температуры плавления и придания филаментам пластичности использовались пластификаторы: Kolliphor® P188 и ПЭГ-1500. Замена карбоната магния на карбонат натрия позволила сохранить должный pH-среды. Применение в разработке такого смазывающего вещества, как Alubra® PG-100 позволяет предотвратить залипание материала в процессе экструзии.

Далее был проведен визуальный осмотр филаментов. Были выбраны филаменты с диаметром 1,6±0,1 мм белого или почти белого цвета, однородные по своей структуре без наличия дефектов и включений. Были изучены методики определения некоторых технологических характеристик полученных филаментов. Тест растворения показал удовлетворительные характеристики филаментов. В ходе термического анализа было выявлено, что лекарственное средство обладает стабильностью и не подвергается деградации в процессе ЭГР.

Также были напечатаны модельные таблетки, чтобы убедиться в том, что данные филаменты пригодны для 3D печати.

ЛИТЕРАУРА

1. Климов АВ, Денисов ЕН, Иванова ОВ. Артериальная гипертензия и ее распространенность среди населения. Молодой ученый. 2018; 50 (236):86-90. Доступно по: https://moluch.ru/archive/236/5.

2. Терентьева ОА, Маймистов ДН, Гусев КА, Флисюк ЕВ, Наркевич ИА. Аддитивные технологии в фармации: монография. Москва: КНОРУС, 2019.

3. BASF products [Электронный ресурс]. Доступно по: https://pharmaceutical.basf.com/global/en/drug-formulation/products.html (дата обращения 15.05.2020).

4. Государственная Фармакопея Российской Федерации. в 3-х т. XIV издание. М.: 2018.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF RAMIPRIL-CONTAINING FILAMENTS BY HOT MELT EXTRUSION

Gusev K.A., 1st year postgraduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The purpose of the development of antihypertensive drugs is very relevant, therefore, in the course of the work, the literature was studied and the conditions were selected for obtaining filaments containing the substance of ramipril by the method of hot melt extrusion, suitable for three-dimensional printing of dosage forms.

Key words: *hot melt extrusion, ramipril, moisture absorption, melt, carrier polymer, 3D printing.*

REFERENCES

1. Klimov AV, Denisov EN, Ivanova OV. Arterial'naya gipertenziya i ee rasprostranennost' sredi naseleniya. Molodoj uchenyj. 2018;50 (236):86-90. – URL: https://moluch.ru/archive/236/5. (in Russ)

2. Terent'eva OA, Majmistov DN, Gusev K.A, Flisyuk EV, Narkevich I.A. Additivnye tekhnologii v farmacii: monografiya Moskva: KNORUS, 2019. (in Russ)

3. BASF products [Elektronnyj resurs]. Available at: https://pharmaceutical.basf.com/global/en/drug-formulation/products.html (data obrashcheniya 15.05.2020).

4. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossijskoj Federacii. v 3-h t. XIV izdanie. Moscow: 2018. (in Russ)

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛИМЕРА НА СВОЙСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПЛЁНОК

Кондакова Ю.А., магистр. 1 курса
Руководитель: **Терентьева О.А.,** канд. фарм. наук, науч. сотрудник
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.14, Российская Федерация
E-mail: kondakova.yuliya@pharminnotech.com

Изучено влияние концентрации раствора ГПМЦ, природы растворителя, параметров полужидкостной печати на технологические характеристики лекарственных плёнок. Выбран состав для

Ключевые слова: *лекарственные плёнки, трёхмерная печать, аддитивные технологии, плёнкообразующие полимеры, полужидкостная печать, персонализированная медицина.*

Качество жизни пациента зачастую обусловлено его приверженностью лечению, предписанному врачом, которое во многом зависит от удобства применения, лекарственной формы и частотой приемов назначенного препарата. Частота возникновения побочных эффектов при приеме лекарственных препаратов зависит от дозировки активного фармакологического и содержания вспомогательных веществ. Однако крупным фармацевтическим предприятиям затруднительно каждый раз менять оборудование или его комплектующие для производства лекарственных препаратов с индивидуальной дозировкой, подходящей конкретному пациенту.

В связи с этим существует необходимость в разработке технологий производства, позволяющих изготавливать индивидуальные препараты по необходимости, отличающиеся составом, геометрической формой, цветом, фармакологической активностью. Одной из таких технологий является трёхмерная печать. Использование данной технологий может быть экономически более выгодным при производстве препаратов, содержащих в своём составе дорогостоящие, наркотические, ядовитые, либо производимые в малых масштабах фармакологически активные вещества [1].

Пристального изучения на данный момент заслуживает лекарственная форма – плёнки, что подтверждается интенсивным ростом количества публикаций и патентов [2].

Поэтому целью данной работы являлось исследование влияния свойств растворов пленкообразующих полимеров и параметров полужидкостной печати на технологические характеристики фармацевтических плёнок.

В качестве пленкообразующего полимера была выбрана гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) фирмы Benecel марки K100M-PH-CR (молекулярная масса 1 000 000 г/моль, вязкость 2% раствора 75 000 – 140 000 мПа*с). В качестве растворителей использовали воду очищенную и 40 % раствор этанола. Печать пленок производилась на универсальной четырёхосевой машине с числовым программным управлением (ЧПУ) с установленным шприцевым дозирующим узлом, разработанной в лаборатории аддитивных технологий СПХФУ (рисунок 1).

Было исследовано влияние диаметра насадки шприца на качество пленок. Корпусы шприцев, поршни, заглушки и крышки для корпусов были предоставлены фирмой Nordson EFD, дозирующие насадки диаметрами: 0,84 мм (внутренний), 1,27 мм (внешний); 1,36 мм (внутренний), 1,65 мм (внешний); 0,61 мм (внутренний), 0,91 мм (внешний) Optimum. Деаэрация производилась на центрифуге ЦЛн-16 и MPW-351 с колебательным ротором на базе GMP-тренинг центра СПХФУ.

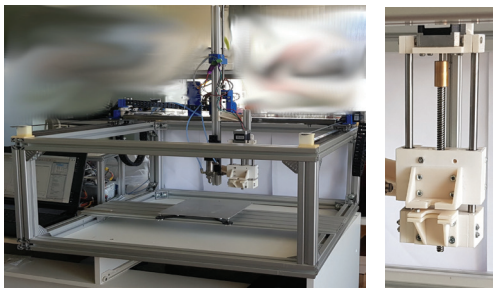


Рисунок 1. Изображение универсальной ЧПУ установки (слева) и шприцевого дозирующего узла (справа)

Использованное программное обеспечение

Компас-3D, версия 18.1 учебная, Аскон, Российская Федерация.
Cura версия 4.3, Ultimaker, Нидерланды.
Repetier-Host, версия 2.1.6, Hot-World GmbH & Co.KG, Германия.

Приготовление растворов ГПМЦ

Навеску ГПМЦ отвешивали на аналитических весах и заливали необходимым объёмом растворителя в соответствие с планом эксперимента, интенсивно перемешивали в течение 20-30 минут и оставляли на 1-2 часа для набухания.

В данной работе сравнивались 8 составов с разными концентрациями ГПМЦ и растворителями, содержание представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Составы фармацевтических плёнок

Компонент / № состава	Масса ГПМЦ, г	Объём воды, мл	Объём 40 % раствора этилового спирта, мл	Масса Твин-80, г	Масса глицерина, г
1	0,1	10	-	-	-
2	0,5	10	-	-	-
3	1,0	10	-	-	-
4	2,1	30	-	-	-
5	3,0	-	30	-	-
6	2,1	-	30	-	-
7	1,5	-	30	-	-
8	0,7	10	-	0,1	0,1
9	0,7	10	-	0,1	0,5
10	0,7	10	-	0,1	1,0

Подготовка растворов к печати пленок

Приготовленными набухшими растворами наполняли шприцы и закрывали заглушками. Шприцы центрифугировали на центрифуге ЦЛн-16 при скорости 6000 об/мин в течение 10 минут.

Полужидкостная печать пленок

Заполненные шприцы устанавливали в дозирующее устройство, фиксируя тело шприца и шток. Трехмерную модель плёнки разрабатывали в программе Компас 3D компании Аскон. В ней в режиме эскиза создали прямоугольник необходимых размеров (20×20 мм) толщиной 1 мм.

Далее файл формата stl открывали в программном обеспечении слайсере Cura, которое делит модель на несколько слоев (слайс) в зависимости от заданных параметров печати – толщины слоя, скорости движения печатающей головки, диаметра сопла принтера, скорости и полноты заполнения и др. После подготовки и проверки всех задаваемых параметров модель сохраняли в виде G-кода. Для плёнок составов 1-5 было выбрано заполнение линиями толщиной 0,6 мм, составов 6-10 выставлен параметр количество линий стенки модели 17, толщина стенки 0,9 мм, при этом пленки печатались единой линией.

Для передачи задания и контроля за процессом была использована программа Repetier-Host, версия 2.1.6, Hot-World GmbH & Co.KG, Германия.

Печать пленок осуществлялась на универсальной ЧПУ установке.

В составах № 1, 2, 4-10 после центрифугирования пузыри воздуха были удалены полностью. Состав № 3 дополнительно центрифугировали при скорости 4000 об/мин в течение 15 минут, так как 10 минутная деаэрация из-за высокой вязкости раствора оказалась не эффективной.

При печати состав № 1 свободно истекал из шприца при отсутствии давления на шток, что вызывало затруднения печати. У составов № 2-10 при отсутствии давления на шток свободное истечение из шприца не наблюдалось, поэтому они были пригодны для полужидкостной печати.

Для печати пленок состава № 3 использовались иглы разных внутренних диаметров – 0,61 мм, 0,84 мм и 1,36 мм. По результатам определения средней массы пленок данного состава и отклонения от средней массы для других составов была выбрана игла с внутренним диаметром 0,61 мм, так как наблюдалось минимальное отклонение в массе и размерах.

После печати плёнки сушили при естественных условиях. Составы, содержащие в качестве растворителя воду, высыхали за 5 часов, в то время как составы, содержащие этиловый спирт, высыхали в среднем за 3 часа. При этом плёнки состава № 10 с содержанием глицерина 10% оставляли на поверхностях маслянистый след и прилипали друг к другу при хранении.

Плёнки состава № 2 не обладали адгезией к рабочей поверхности и были сильно деформированы, плёнки составов № 3-4 и № 8 имели ровную поверхность и не имели каких-либо искажений геометрии. Плёнки составов № 5-7 не имели существенных отклонений от заданной геометрии, однако, была нарушена их целостность (рисунок 2); составов № 9-10 – либо имели искажение геометрии, либо целостности. У пленок без дефектов измеряли размеры и толщину, полученные данные представлены в таблице 2.

После снятия размеров плёнок для каждого состава определяли среднюю массу и отклонение от неё, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры напечатанных плёнок

№ состава	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Средняя масса, г	0,0468± 0,0004	0,0497 ± 0,0010	0,0517 ± 0,0020	0,0342 ± 0,0010	0,0318± 0,0010	0,0254± 0,0006	0,0452± 0,0010	0,0664± 0,0030	0,0890± 0,0030
Средний размер, мм	-	19,48 ± 0,04	19,82 ± 0,03	19,73 ± 0,03	19,95 ± 0,04	20,15 ± 0,04	19,63 ± 0,02	-	-
Средняя толщина, мм	0,0740 ± 0,0002	0,1010 ± 0,0004	0,1200 ± 0,0001	0,1090 ± 0,0003	0,1180 ± 0,0001	0,1110 ± 0,0002	0,0970 ± 0,0001	-	-

Рисунок 2. Плёнки из составов 5-7 после удаления растворителя

Составы № 5-7 имели недостаточные адгезивные свойства, вследствие чего в процессе печати в плёнках образовывались пузыри воздуха, которые оставались и после удаления растворителя (рисунок 3а, 3б).

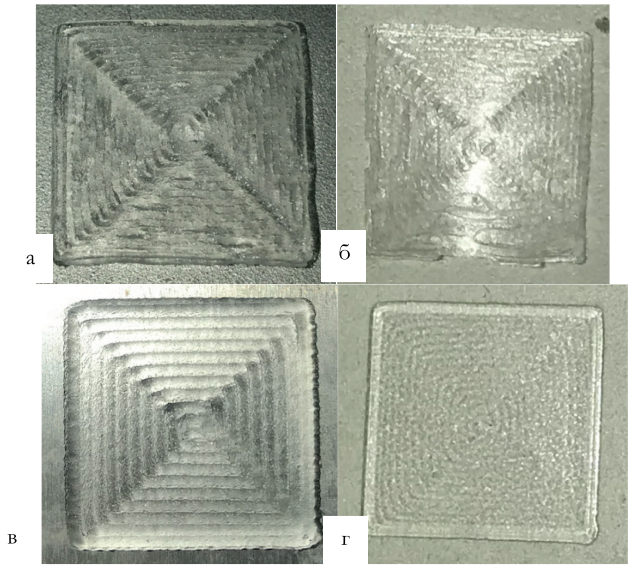


Рисунок 3. Плёнки: состава 7 сразу после печати (а) и после удаления растворителя (б); состава 4 сразу после печати (в) и после удаления растворителя (г)

Для дальнейших исследований был выбран состав № 4, поскольку напечатанные пленки (рисунок 3в, 3г) при удалении растворителя не деформировались и не имели видимых пузырьков воздуха.

Отклонения массы для каждого состава составляет менее 5 %, требуемых для данной лекарственной формы в ОФС.1.4.1.0035.18 «Плёнки» [3], что позволяет сделать вывод о пригодности данного способа изготовления лекарственных плёнок для применения в производстве лекарственных препаратов, содержащих ядовитые, наркотические или сильнодействующие вещества, где необходима высокая точность дозирования.

В ходе выполнения данной работы было изучено свойств растворов пленкообразующих полимеров и параметров полужидкостной печати на технологические характеристики фармацевтических плёнок.

Для дальнейших исследований был выбран состав № 4, поскольку напечатанные из него плёнки не имели видимых пузырьков воздуха, при удалении растворителя не отлипали от поверхности рабочего стола и не лопались и не имели изгибов.

В ходе анализа результатов были сделаны следующие выводы:

• В полужидкостной печати минимальное отклонение от средней массы наблюдается при использовании игл наименьшего диаметра, отклонения массы при использовании игл диаметрами 0,84 мм и 1,36 мм являются сопоставимыми.

• Использование в качестве растворителя раствора этилового спирта 40% нерационально, поскольку вследствие малой адгезии и быстрого испарения растворителя в объёме присутствуют пузыри воздуха.

• Глицерин в концентрации менее 5% проявляет пластифицирующие свойства, обеспечивая необходимую гибкость, и при этом плёнки не прилипают друг к другу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ehtezazi T. et al. The application of 3D printing in the formulation of multilayered fast dissolving oral films. Journal ofpharmaceutical sciences. 2018$107(4):1076-1085. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.02.020.

2. Global Thin Film Drugs Market Research Report. Market Data Forecast. Available at: https://www.marketdataforecast.com/market-reports/thin-film-drugs-market [Дата посещения – 22.02.2022].

3. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.4.1.0035.18 «Пленки» [Электронное издание]. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

SUMMARY

STUDY OF THE EFFECT OF POLYMER CONCENTRATION ON THE PROPERTIES OF PHARMACEUTICAL FILMS

Kondakova Y.A., 1st year master student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

In this study the effect of film-forming polymer concentration, nature of the solvent, and 3D printing parameters on the characteristics of the printed pharmaceutical films, such as mass uniformity and geometric dimensional reproducibility was studied.

Key words: *pharmaceutical films, three-dimensional printing, additive technologies, film-forming polymers, semi-solid printing, personalized medicine.*

REFERENCES

1. Ehtezazi T. et al. The application of 3D printing in the formulation of multilayered fast dissolving oral films. Journal ofpharmaceutical sciences. 2018;107(4):1076-1085. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.02.020.

2. Global Thin Film Drugs Market Research Report. Market Data Forecast. Available at: https://www.marketdataforecast.com/market-reports/thin-film-drugs-market [Accessed 22 February, 2021].

3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 2. GPA.1.4.1.0035.18 «Films» [Electronic Edition]. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (in Russ)

Современные аспекты биотехнологии в медицине и фармации

Биотехнология сегодня – одна из важнейших современных научных дисциплин. Биотехнология является фундаментальной основой для многочисленных исследований не только в медицине и фармации, но и в пищевой и химической промышленности, сельскохозяйственной и экологической деятельности. Биотехнологические методы все более интенсивно проникают в практику диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний. Благодаря достижениям генной и клеточной инженерии наблюдается значительный прогресс в производстве высокоэффективных рекомбинантных препаратов, вакцин, селективных аллергенов и реагентов для современных диагностических методов.

16 апреля 2021 года в рамках XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» состоялось заседание секции «Современные аспекты биотехнологии в медицине и фармации».

Для участия в работе секции было подано 53 заявки молодых ученых. Доклады были заслушаны на первом (отборочном) этапе конференции в подразделениях СПХФУ – кафедры биотехнологии, микробиологии, иммунобиотехнологии, НОЦ МКТ.

По результатам отборочного этапа 14 докладчиков получили возможность выступить на втором этапе. Доклады представили студенты и аспиранты СПХФУ, а также представители сторонних учреждений, таких как Национальный исследовательский университет ИТМО, Пущинский государственный естественнонаучный институт, ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России. Тематики докладов относились к оптимизации биотехнологических процессов, применения отходов янтарного производства для получения БАВ, к сферам геномики, технологии рекомбинантных белков, получения синбиотиков, и стабилизации клеточных линий, а также обучения персонала биотехнологических предприятий. Были затронуты такие актуальные темы, как бактериальные эндотоксины, терапия гемофилии, гипертонии и онкологических заболеваний, а также борьба с нарастающей резистентностью микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Все доклады были представлены на высоком уровне, темы были актуальны и глубоко проработаны, имели научную новизну и практическую значимость, вызвали живой интерес у членов жюри и слушателей. В состав жюри входили преподаватели СПХФУ, университетов ИТМО и ЛЭТИ, ВИЗР, фарм-холдига «Герофарм».

В результате проведения заседания секции были присуждены призовые места следующим докладчикам:

I место – Готовщиц Даниил Романович, магистрант 2-го года обучения ФГБОУ ВО СПХФУ, тема доклада: «Оптимизация инновационного моноклонального антитела для улучшения его физико-химических характеристик»;

II место – Сорокина Надежда Васильевна, магистрант 1-го года обучения Национального исследовательского университета ИТМО, тема доклада: «Создание базы данных рибозимов и рибосвитчей для сравнительной геномики»;

III место – Султанова Регина Фларидовна, магистрант 2-го года обучения ФГБОУ ВО СПХФУ, тема доклада: «Биоэнергетика свежевыделенных митохондрий коркового слоя почек при развитии солечувствительной гипертонии».

Победители секции получили возможность представить доклады на пленарном заседании конференции 23 апреля 2021 года.

В рамках заседания секции с докладами выступили партнеры и спонсоры конференции:

Мадера Дмитрий Александрович – руководитель отдела молекулярной генетики ЗАО БИОКАД;

Рабдано Севастьян – заместитель руководителя центра исследований и разработки СПбНИИВС ФМБА России.

В сборнике материалов конференции в разделе секции «Современные аспекты биотехнологии в медицине и фармации» опубликованы 53 статьи как докладчиков, так и участвовавших в конференции без выступления с докладом.

Мы выражаем благодарность всем участникам конференции, спикерам, спонсорам, членам экспертной комиссии, представителям СПХФУ и сторонних учреждений и надеемся на дальнейшее сотрудничество.

Модератор секции
Вера Анатольевна Колодязная
заведующий кафедрой биотехнологии, ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. биол. наук, доцент

Современные аспекты биотехнологии в медицине и фармации

16 апреля 2021 10:00

Трансляция заседания тематической секции доступна по ссылке и QR-коду

https://spcpu.ru/himfarm_life/events/2487/

Научный редактор секции
Красовицкая Ирина Александровна, ст. преподаватель кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Научно-образовательный центр молекулярных и клеточных технологий (НОЦ МКТ)
Дубровский Ярослав Александрович, и.о. директора научно-образовательного центра молекулярных и клеточных технологий ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд.биол.наук

Кафедра микробиологии
Ананьева Елена Петровна, заведующий кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. биол. наук, доцент

Кафедра биотехнологии
Колодязная Вера Анатольевна, заведующий кафедрой биотехнологии, ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. биол. наук, доцент

Научно-образовательный центр технологии рекомбинантных белков (НОЦ ТРБ)
Гершович Павел Михайлович, директор научно-образовательного центра технологии рекомбинантных белков,канд. биол. наук, доцент

Программа конференции доступна по ссылке и QR-коду

http://www.ypharm.spcpu.ru

ИЗУЧЕНИЕ СОРБЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ НОСИТЕЛЕ (ЯНТАРНОЙ ПУДРЕ)

Брюккель А.Г., студент 4 курса, **Федотова А.А.**, студент 3 курса
Руководитель: **Глазова Н.В.**, канд.хим.наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14 Российская Федерация
E-mail: bryukkel.aleksandra@pharminotech.com

Проведен подбор условий сорбционной иммобилизации различных ферментов на янтарном носителе. Осуществлен анализ гранулометрического состава янтарной пудры и подобраны условия обработки носителя перед сорбционной иммобилизацией ферментов. Изучены условия сорбции протеаз на янтарном носителе в зависимости от гранулометрического состава, pH и получены изотермы сорбции для трех фракций носителя.

***Ключевые слова**: янтарь, янтарная пудра, гранулометрический состав, ферменты, сорбционная иммобилизация, химопсин.*

Янтарная пудра известна своими лечебными свойствами ещё с Древнего мира (первые упоминания об использовании янтаря в медицине принадлежат Гиппократу 370 гг. до н. э.) На настоящий момент янтарная пудра используется в косметологии в качестве скраба для кожи, а также основы косметических масок. Янтарная кислота, входящая в состав янтарной пудры обуславливает антиоксидантные свойства пудры и её тонизирующее воздействие на кожу [1]. Экономически привлекательной янтарную пудру делает тот факт, что она является отходом производства изделий из янтаря, который добывается промышленным способом в месторождениях Калининградской области. Это дает два неоспоримых преимущества – более низкую стоимость янтарной пудры и, соответственно, уменьшает стоимость косметических средств с её содержанием, а также открывает перспективы максимальной локализации экологически чистого производства на территории РФ. Для биотехнологической отрасли янтарная пудра интересна в качестве носителя биологически активных веществ (в т. ч. ферментов). Она может быть использована в косметологических препаратах, включающих иммобилизованные ферменты, в частности в препаратах энзимного пилинга. В состав этих средств наиболее часто вводятся гидролитические ферменты трипсин и химотрипсин, липаза, амилаза, работа с которыми проводится в настоящее время на кафедре биотехнологии. Направление изучения возможностей использования пудры в качестве полимерного носителя биологически активных веществ является актуальным для полимеров на основе янтарной кислоты [2].

Целью данной работы является подбор условий сорбционной иммобилизации различных ферментов на янтарном носителе для создания инновационных косметологических и лекарственных субстанций.

Задачи работы заключаются в следующем:

- подобрать условия обработки носителя;
- осуществить анализ гранулометрического состава янтарной пудры;
- изучить зависимость емкости сорбции ферментов от pH для фракций различного гранулометрического состава носителя;
- построить изотермы сорбции для фракций различного гранулометрического состава носителя.

Объект исследования: янтарная пудра 3-х фракций с приблизительными размерами частиц 50,100,250 мкм (производитель ОА «Мединторг»), протеолитический фермент Химопсин (ООО «Самсон-мед»)

Химопсин – ферментный препарат протеолитического действия, в состав которого входит два фермента класса протеаз: трипсин и химотрипсин. Расщепляет некротическую ткань, не оказывая действия на живую ткань, вследствие наличия в ней специфических антиферментов [3].

В работе были использованы буферные растворы (ацетатные с pH=3; 4; 6 и боратные с pH=7 ; 9), растворы ацетона различной концентрации, 1 М раствор NaOH, 1 М раствор HCl, модельный раствор химопсина (ООО «Самсон-мед»)

Концентрацию общего белка в растворе определяли по методу Лоури с помощью реактива Фолина-Чиокальтеу [4]. В основе определения протеолитической активности лежит модифицированный метод Кунитца [5]. Для изучения размеров фракций была использована электронная микроскопия.

1. Обработка носителя.

Перед проведением процесса сорбции необходимо подготовить носитель посредством очистки его от механических загрязнений, а также от белковых примесей, искажающих результаты анализа. Метод, подобранный для обработки янтарной пудры представлен ниже.

Навески воздушно-сухой янтарной пудры каждой фракции были обработаны ацетоном по схеме смены концентрации растворителя: вначале их промывали 50 % ацетоном, далее погружали в 100% ацетон и оставляли на 30 мин. Затем навески были фильтрованы и высушены. После пудра была подвергнута кислотно-щелочной обработке. Сперва пудру заливали 1 М раствором HCl и оставляли на сутки. По истечении времени её промывали водой очищенной до pH 5-6. Затем была проведена щелочная обработка – пудру погружали в 1 М NaOH на сутки. После также промывали водой очищенной до pH 5-6. Промывная вода проверялась на остаточную концентрацию белка по Лоури с фиксацией фонового значения для учета его в результатах сорбции. Далее навески были отфильтрованы и высушены до постоянной массы. Полученные навески хранились в стеклянных флаконах с плотно прилегающей крышкой.

2. Анализ гранулометрического состава янтарной пудры.

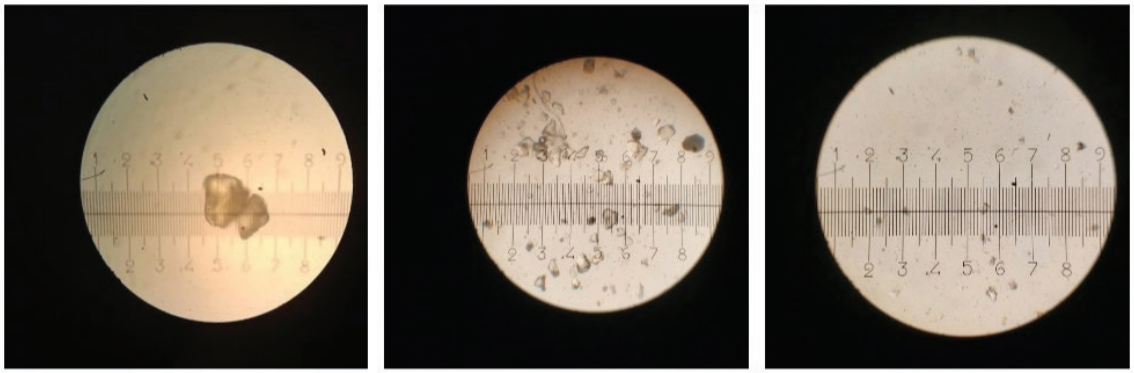
Анализ гранулометрического состава янтарной пудры трех фракций был проведен при помощи микроскопа МБР-1 увеличением 8х0,20. Калибровка шкалы окуляра микроскопа по линейке-микрометру показала, что при этом увеличении 1 деление измерительной шкалы прибора соотв. 18 мкм.

Для проведения измерений от каждой фракции были отобраны три выборки: пудру всех трех фракций в набухшем состоянии (в воде) помещали на стекло и накрывали предметным стеклом. В каждой выборке по измерительной шкале были определены размеры 20 зерен. Далее по полученным данным был определен средний размер частиц каждой фракции.

Средние размеры частиц каждой фракции в набухшем состоянии с учетом средней квадратичной ошибки представлены в таблице.

Таблица 1 – Уточненные размеры 3-х фракций янтарной пудры

Номер фракций	Диаметр частиц сорбента в набухшем состоянии (мкм)
1	285,3±46,8
2	100,26±37,08
3	48,42±16,02



D1 = 285,3±46,8 мкм D2 = 100,26±37,08 мкм D3 = 48,42±16,02 мкм

Рисунок 1. Микрофотографии зерен янтарной пудры различного диаметра

3. Влияние pH на емкость сорбции

Построение зависимости влияния pH на емкость сорбции входит в этап предварительной обработки сорбента. С её помощью выявляется оптимум pH для проведения сорбционных процессов (значение pH, при котором наблюдается наибольшая сорбционная емкость). В случае янтарной пудры целью проведения эксперимента было подтверждение молекулярной природы сорбента и, как следствие, отсутствие зависимости величины сорбционной емкости от pH.

Для определения влияния pH на величину сорбционной емкости были взяты несколько навесок янтарной пудры каждой фракции (по 100 мг). Каждая из навесок была погружена на сутки в буферный раствор с определенным значением pH. По истечении времени навески были отфильтрованы, высушены до постоянной массы и далее залиты 5 мл раствора химопсина. Сорбция проводилась в статических условиях при постоянном перемешивании на шейкере компании Sartorius в течение 2 часов.

По окончании сорбции были измерены концентрации общего белка в исходных и равновесных растворах. По полученным данным рассчитана емкость сорбции и составлена графическая зависимость её величины от значения pH

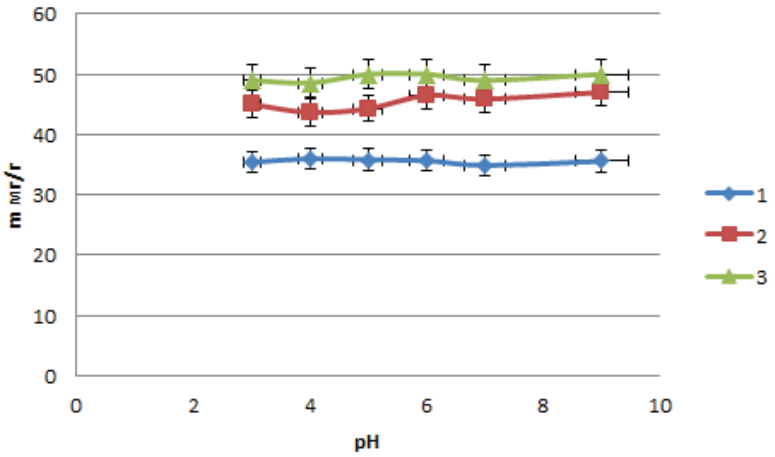


Рисунок 2. Зависимость емкости сорбции 3-х фракций янтарной пудры от значения pH

Представленная выше кривая демонстрирует, что емкость сорбции янтарной пудры не зависит от значения pH. Полученные результаты подтверждают молекулярную природу сорбента (неионогенность). Как видно из рисунка 2, 1-я фракция имеет наименьшую емкость сорбции.

4. Изучение изотермических процессов сорбции химопсина на янтарной пудре.

Изотерма сорбции – это зависимость величины сорбционной емкости (количества сорбированного вещества) от равновесной концентрации раствора при постоянной температуре.

Для изучения изотермических процессов сорбции были взяты несколько навесок янтарной пудры ($m_н$ = 100 мг). Навески были залиты 5 мл растворов химопсина разной концентрации. Во всех полученных разведениях до постановки эксперимента было проведено измерение исходной концентрации и активности. Сорбция велась в статических условиях при постоянном перемешивании на шейкере компании Sartorius в течение суток.

После проведения процесса сорбции были проведены измерения концентрации общего белка и активности в исходных и в равновесных растворах с учетом фонового значения концентрации белка после очистки янтарной пудры. Далее рассчитывалась емкость сорбции янтарной пудры.

По полученным данным были построены изотермы сорбции по равновесной концентрации белка и активности протеазы:

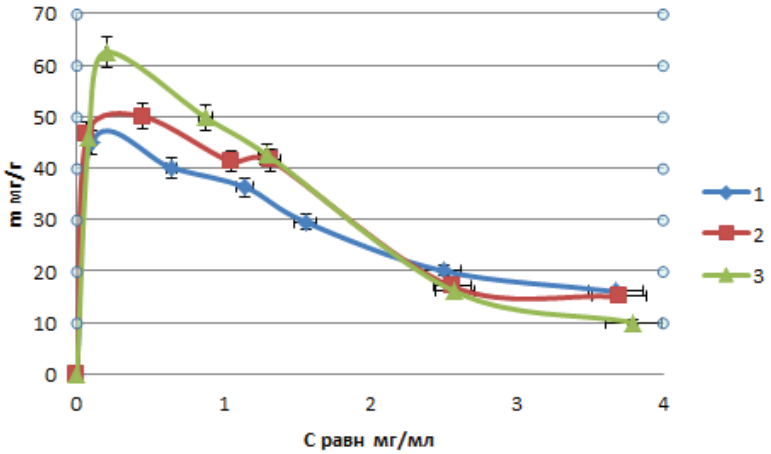


Рисунок 3. Изотермы сорбции для 3-х фракциях янтарной пудры (по белку)

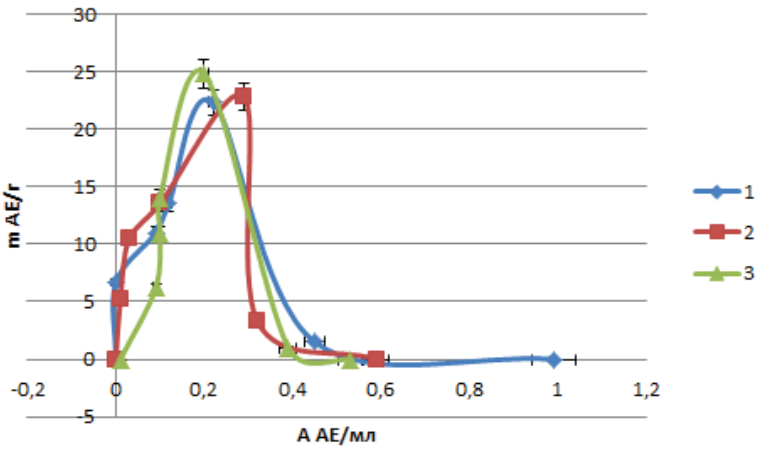


Рисунок 4. Изотермы сорбции для 3-х фракциях янтарной пудры (по активности)

Полученные кривые обладают четко выраженным максимумом, что позволяет отнести их к аномальным изотермам. Это может быть связано с протеканием одновременно процессов ассоциации/диссоциации фермента и сорбции. Белки в концентрации выше критической способны образовывать ассоциаты, которые не могут проникнуть в поры сорбента из-за слишком большого размера. Это, в свою очередь, способствует снижению емкости сорбции [6].

Из полученной изотермы по белку (рис. 3), а также зависимости емкости сорбции от pH (рис. 2) (для этих кривых емкость рассчитана по концентрации белка) видно, что самая маленькая фракция (1-я) имеет наименьшую емкость сорбции. В случае построения изотерм по активности (рис. 4), что зависимости емкости сорбции от активности для всех трех фракций близки по значениям.

Повышенное внимание к 1-ой фракции обусловлено тем, что она является наиболее перспективной для применения в производстве косметологических средств. Тот факт, что несмотря на более низкие значения емкости сорбции по белку, 1-я фракция имеет приблизительно равные более крупным фракциям значения емкости сорбции по активности дает обоснование для её дальнейшего изучения в заданном направлении, поскольку ферментативное действие определяется активностью фермента, а не его концентрацией.

На сегодняшний день работы по изучению сорбционных процессов с различными ферментами на янтарной пудре продолжаются.

Подобраны условия обработки носителя перед сорбционной иммобилизацией ферментов. Проведен анализ гранулометрического состава янтарной пудры, определены средние размеры зерен каждой фракции. Проведены первые эксперименты по изучению сорбционных свойств янтарной пудры для подбора условий сорбционной иммобилизации различных ферментов на янтарном носителе. Установлено, что величина емкости сорбции янтарной пудры не зависит от pH. Получены изотермы сорбции химопсина для 3-х фракций. Выявлено, что фракция меньшего размера имеет наиболее низкую емкость сорбции по белку, но совпадает по емкости сорбции по активности с более крупными фракциями, что дает обоснование для продолжения изучения её сорбционных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко АЛ, Белякова НВ. Янтарная кислота: фармакологическая активность и лекарственные формы. Фармация. 2000;5:40-43

2. Панарин ЕФ, Лавров НА, Соловский МВ, Шальнова ЛИ. Полимеры – носители биологически активных веществ. СПб: ЦОП Профессия, 2014.

3. Большая медицинская энциклопедия под ред. Петровского Б.В.,3-я редакция, Том 26. Химопсин [Электронное издание]. Доступно по: https://бмэ.орг/index.php/ХИМОПСИН

4. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folinphenol reagent : J. Biol. Chem. 1951;193(1):265-275.

5. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin ingibitor.; J. Gen. Phisiol.1974: 291-300.

6. Глазова НВ, Курченко АН, Омельянова АП. Современные технологии выделения, очистки и модификации биотехнологических АФС (ферментов); М: КНОРУС, 2019.

SUMMARY

STUDY OF THE SORPTION IMMOBILIZATION OF ENZYMES ON A MOLECULAR CARRIER (AMBER POWDER)

Brukkel A.G., 4th year student, **Fedotova A.A.**, 3rd year student
St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The conditions of sorption immobilization of various enzymes on an amber carrier have been selected. The granulometric composition of the amber powder has been analyzed and the conditions for processing the carrier before the sorption immobilization of the enzymes have been selected. The conditions of the sorption of proteases on an amber carrier depending on the granulometric composition and pH have been studied, sorption isotherms have been obtained for three fractions of the carrier.

Key words: *amber, amber powder, granulometric composition, enzymes, sorption immobilization, chymopsin.*

REFERENCES

1. Kovalenko AL, Belyakova NV. Succinic acid: pharmacological activity and dosage forms; Pharmacy. 2000;5:40-43. (In Russ)

2. Panarin EF, Lavrov NA., Solovsky MV. Shalnova LI. Polymers-carriers of biologically active substances. Saint Petersburg: PSC Profession; 2014. (In Russ)

3. The Great Medical Encyclopedia, ed. Petrovskogo B. V., 3rd edition, V. 26. Chimopsin [Electronic edition]. Available at: https://бмэ.орг/index.php/ХИМОПСИН (In Russ)

4. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folinphenol reagent : J. Biol. Chem. 1951;193(1):265-275.

5. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin ingibitor.; J. Gen. Phisiol. 1974: 291-300.

6. Glazova NV, Kurchenko AN, Omelyanova AP. Modern technologies of isolation, purification and modification of biotechnological AFS (enzymes); Moscow: KNORUS, 2019. (In Russ)

СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ КСАНТОГЕНГИДРАЗИДОВ

Бутомо Т.В., студ. 4 курса
Руководители: **Ананьева Е.П.**, канд. биол. наук, доцент, **Яковлев И.П.**, докт. хим. наук, проф.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: butomo.timur@pharminnotech.com

С целью получения соединений, потенциально пригодных для введения в медицинскую практику, была разработана методика синтеза новых соединений ряда ксантогенгидразидов. Исследована структура и физико-химические характеристики данных соединений, а также их антибактериальная и противогрибковая активность.

Ключевые слова: *ксантогенгидразиды, противогрибковая активность, антибактериальная активность, Staphylococcus, Escherichia, Candida.*

Создание лекарственных препаратов, обладающих антимикробным действием, является актуальной проблемой на сегодняшней день. Активное применение антимикробных препаратов, а также нерациональная антибиотикотерапия сопровождается увеличением количества устойчивых штаммов микроорганизмов и, как следствие, уменьшением эффективности терапии соответствующих инфекционных заболеваний.

В связи с этим, серьёзное значение приобретает задача поиска новых препаратов с выраженным антимикробным действием. Целью данной работы были постановка синтеза и определение антибактериальной и противогрибковой активности одних из таких потенциально активных соединений – ксантогенгидразидов.

Синтез исследуемых соединений осуществляется в две стадии. На первой стадии к алкилксантогенату калия в водном растворе при постоянном перемешивании постепенно приливают раствор калиевой соли хлоруксусной кислоты, в результате чего образуется светло-желтый прозрачный раствор, содержащий полупродукт – производное ксантогената. На второй стадии к полученному раствору добавляют производное гидразина, в результате чего образуется осадок соединения искомой структуры. Схема синтеза ксантогенгидразидов представлена на рисунке 1. Очистка искомого продукта осуществляется путём фильтрования с промывкой осадка и перекристаллизации его из гептана.

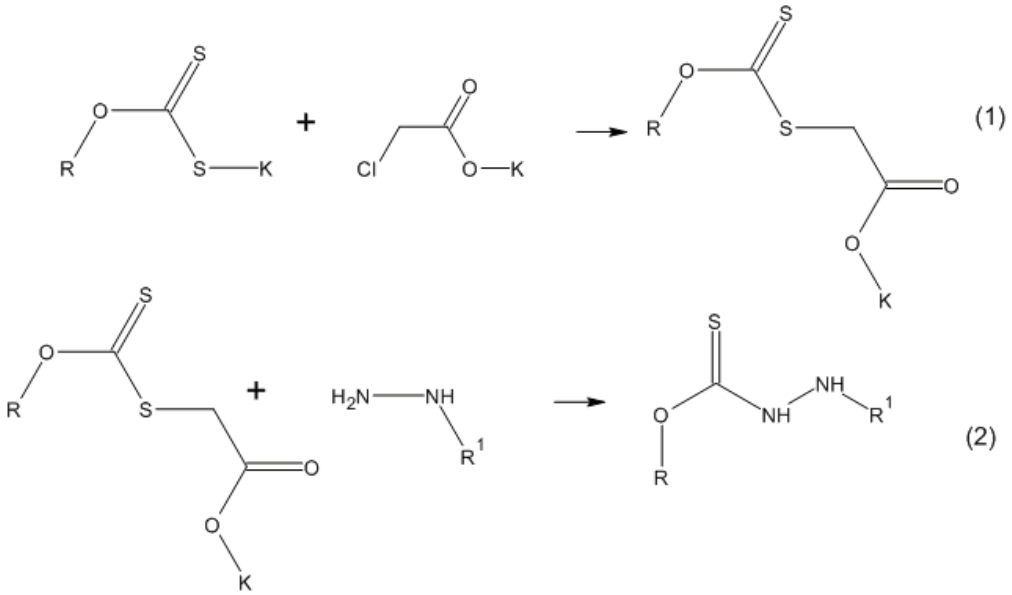


Рисунок 1. Общая схема синтез ксантогенгидразидов

Используя данную методику, был получен ряд соединений, структурные формулы которых представлены на рисунке 2.

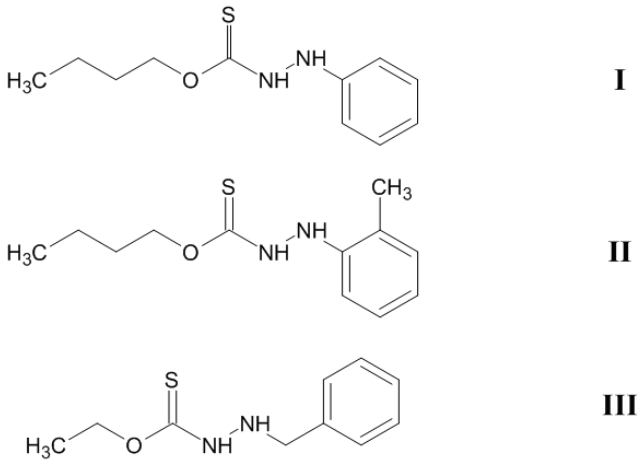


Рисунок 2. Структурные формулы исследуемых соединений

Подтверждение структуры исследуемых веществ проводилось методами ЯМР ^{1}H ЯМР ^{13}C-спектроскопией. Состав синтезированных соединений подтверждён элементным анализом. Некоторые физико-химические свойства полученных соединений представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика исследуемых соединений

№	Название по номенклатуре ИЮПАК	Выход, %	$T_{пл.}$, °C	Фактор удерживания R_f
I	О-бутил-2-фенилгидразинкарботиоат	89	71-72	0,50
II	О-бутил-2-(2-метилфенил)гидразинкарбтиоат	87	76-77	0,51
III	О-этил-2-фенилгидразинкарботиоат	87%	70-71	0,45

Антимикробная активность данных соединений была исследована относительно Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans.

Исследование минимальной ингибирующей концентрации (МИК) проводилось методом серийных разведений в жидкой питательной среде (бульон Сабуро – для грибов, мясопептонный бульон – для бактерий). Поскольку соединения нерастворимы в воде, их предварительно растворяли в 50%-ном водном растворе диметилсульфоксида. Исходная суспензия микроорганизмов готовилась в водном растворе по стандарту мутности $1 \cdot 10^9$ ЕД, после чего последовательными разведениями получали требуемую концентрацию клеток. Микробная нагрузка в каждой пробирке составила $1 \cdot 10^4$ клеток/мл. После термостатирования пробирки сравнивали с контролем – пробиркой, не содержащей исследуемого вещества – и визуально определяли наличие или отсутствие роста микроорганизмов.

Для определения минимальной цидной концентрации (МЦК) производился высев из пробирок, в которых не наблюдался рост микроорганизмов, на плотную питательную среду в чашках Петри (мясопептонный агар), после чего их термостатриовали при температуре 36-37°С. Определение МЦК проводилось визуально, определяя наличие или отсутствие роста микроорганизмов в месте высева.

Результаты исследований антимикробной активности соединений I и II приведены в таблице 2. Анализируя данные, можно сделать вывод, что наибольшим антимикробным действием обладает соединение I.

Таблица 2 – Антимикробная активность соединений I – III

Соединение	S. aureus		E. coli		C. albicans	
	МИК, мкг/мл	МЦК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МЦК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МЦК, мкг/мл
I	8	31	125	125	16	16
II	8	31	250	250	62,5	62,5
III	31	62,5	125	250	125	125

Показано, что исследуемые вещества, проявляют выраженную антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий, и незначительное действие на грамотрицательные (E. coli). Следует отметить эффективность соединения I в отношении дрожжей рода Candida. Активность данного соединения сопоставима с антифунгальной активностью широко применяемого в медицинской практике препарата флуконазола, чья минимальная ингибирующая концентрация в отношении дрожжей рода Candida составляет 16 мкг/мл. Соединения II и III обладали менее выраженным противогрибковым действием, что отражено в рисунке 3.

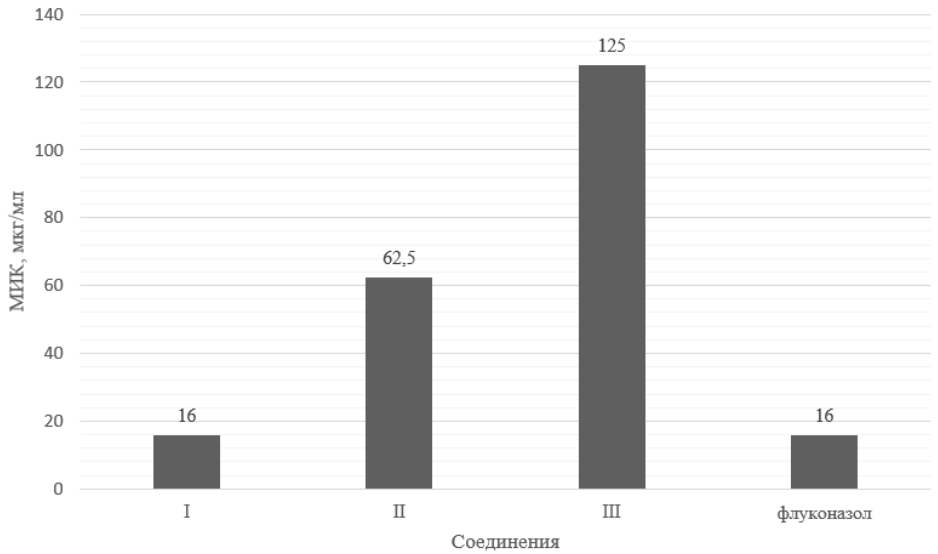


Рисунок 3. Диаграмма активности соединений в отношении C. albicans

Наибольшую антимикробную активность в общем проявляет соединение I, чья минимальная ингибирующая концентрация в отношении Staphylococcus aureus и Candida albicans оказалась равна 8 мкг/мл и 16 мкг/мл соответственно, а минимальная цидная концентрация в отношении Staphylococcus aureus и Candida albicans – 16 мкг/мл.

Анализируя структуру исследуемых соединений, стоит отметить, что наличие радикала о-толила при атоме азота существенно снижает антимикробную активность

В рамках проведённой работы были получены новые химические соединения ряда ксантогенгидразидов, была исследована их структура, физико-химические свойства и антимикробная активность.
Согласно полученным результатам, рассматриваемые соединения, в особенности соединение I, являются перспективными для дальнейшего исследования и могут найти применение в медицине и фармации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуревич ПА, Энлюськин ВП, Ефремов АИ, Липин КВ, Лукин ПМ, Черкашина ЮА. Оптимизация процесса получения бутилксантогената калия. Вестник технологического университета. 2015;18(4):172–174.

2. Казунин МС, Прийменко БА. Синтез и биологическая активность производных 3-(3-метил-2,6-диоксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-8-ил)пропановой кислоты. 2013;25:226–231.

SUMMARY

SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF XANTHATE HYDAZIDES

Butomo T.V., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A method of synthesis of xanthate hydrazides was developed for the purpose of obtaining new chemical compounds suitable for medical application. Series of experiments were conducted in order to investigate structure, antibacterial and antifungal activity of said compounds.

Key words: *xanthate hydrazides, antifungal activity, antibacterial activity, Staphylococcus, Escherichia, Candida.*

REFERENCES

1. Gurevich PA, Enluskin VP, Efremov AI, Lipin KV, Lukin PM. Cherkashina UA. Optimizaciya processa polucheniya butilksantogenata kaliya. Vestnik tehnologicheskogo universiteta. 2015;18(4):172-174 (in Russ).

2. Kazunin MS, Priymenko BA. Sintez I biologicheskaya aktivnost proizvodnih 3-(3-metil-2,6-diokso-2,3,6,7-tetragidro-1H-purin-8-il)propanovoy kisloti. 2013;25:226–231 (in Russ).

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИИ ЭНДОТОКСИНА НА РАЗЛИЧНЫХ СОРБЕНТАХ

Галина З.Р., маг. 2 года обучения, **Храменкова В.А.**, студ. 4 курса
Руководители: **Котова Н.В.**, доц. кафедры биотехнологии; **Красовицкая И.А.**, ст. преп. кафедры биотехнологии
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: zulfiya.galina@spcpu.ru

В статье представлены результаты исследований по выбору оптимальных условий проведения процесса сорбции эндотоксина на полимерных сорбентах «А-100» и «MN-02», изучены равновесные параметры процесса сорбции эндотоксина на данных сорбентах.

Ключевые слова: *эндотоксин, сорбент, липополисахарид, Пирогенал.*

Присутствующие во внешней мембране всех грамотрицательных бактерий липополисахариды (ЛПС, бактериальные эндотоксины, БЭ) при попадании в кровеносную систему человека способны вызвать сильный воспалительный ответ, в тяжелых случаях приводящий к развитию септического шока с высокой вероятностью летального исхода [1]. Своевременность количественного или полуколичественного определения БЭ в крови и других физиологических жидкостях организма в настоящее время относятся к ключевым факторам ранней диагностики сепсиса и условиям назначения более «точного» лечения [2]. Контроль содержания эндотоксинов также необходим на различных этапах производства парентеральных лекарственных форм [3], так как присутствие эндотоксина в продуктах для инъекций может привести к пирогенным реакциям, варьирующимся от лихорадки и озноба до необратимого и смертельного септического шока.

Наиболее часто для определения содержания эндотоксинов используют ЛАЛ-тест. Он основан на применении ЛАЛ-реагента – лизата амебоцитов мечехвостов *Limulus polyphemus*. В результате специфической реакции ЛАЛ-реагента с эндотоксинами, образуется гель, либо окрашенный продукт реакции (в зависимости от модификации метода), по которому можно судить о качественном или количественном содержании БЭ в исследуемом растворе.

Помимо ЛАЛ-реагента для проведения ЛАЛ-теста необходим раствор стандарта эндотоксина. В качестве контрольного стандарта, как правило, используются эндотоксины *E. coli* двух штаммов: 0113:H10 и 055:B5. Существует несколько типов стандартов эндотоксина:

1. Эталонный стандарт эндотоксина (ЭСЭ, RSE, Referense Standart Endotoxin), который представляет собой липополисахарид, выделенный из Escherichia coli 055: B6 и оттитрованный по Американскому национальному стандарту (USP RSE) EC-6;

2. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ, CSE, Control Standart Endotoxin), активность которого определяется путём сравнения активности CSE и RSE по ЛАЛ-тесту;

3. Рабочий стандарт эндотоксина, который готовится непосредственно перед определением из КСЭ.

В отечественной практике используется контрольный стандарт зарубежного производства, имеющий весьма высокую стоимость [4].

Более 10 лет одним из направлений научно-исследовательской деятельности кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России является разработка отечественной технологии производства эндотоксинов. На одной из стадий очистки эндотоксинов было предложено использовать сорбционно-хроматографический метод. Проведены исследования сорбции эндотоксинов на следующих сорбентах: АЛОС, СКН-4М, Полисорб и Полисорб, модифицированный катамином АБ. Наилучшими характеристиками по емкости, избирательности и скорости сорбции обладал Полисорб с модифицированной поверхностью[5]. Полисорб относится к классу неионогенных полимерных сорбентов и представляет собой сильносшитый макропористый сополимер стирола и дивинилбензола. Сорбент Полисорб отличается высокой набухаемостью и обладает хорошим сродством к органическим соединениям. Он подходит для сорбции высокомолекулярных биологически активных веществ (БАВ), а также для выделения нейтральных веществ из ионных растворов.

В настоящее время сорбционные методы признаны одними из наиболее эффективных и широко применяются для выделения очистки разнообразных веществ. Интенсивно ведутся разработки новых сорбентов с улучшенными свойствами. В связи с этим перспективными являются исследования сорбции эндотоксинов на сорбентах более эффективных, чем Полисорб.

Целью данной работы является исследование сорбции эндотоксина на сорбентах различной структуры для разработки эффективной сорбционной технологии. В задачи работы входит подбор условий проведения, а также изучение равновесных параметров сорбции эндотоксина.

Объектами исследования являются полимерные сорбенты А-100 и MN-202.

Сорбент А-100 представляет собой слабоосновный анионит с третичной аминогруппой макропористого типа с полистирол-дивинилбензольной матрицей. Благодаря своей структуре, А-100 обладает отличным сродством к органическим соединениям, также показывает хорошие отмывочные характеристики и весьма высокую рабочую емкость. Основные характеристики сорбента А-100 представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные характеристики сорбента А-100

Показатели	А-100
Средний размер гранул, мм	0,3 – 1,2
Полная обменная емкость, г-экв/л	1,3
Адсорбционная поверхность, $м^2/г$	845

Сорбент MN-202 – нейтральный бипористый сорбент фирмы «Purolite», представляющий собой сверхсшитые полистирольные гранулы с высокой удельной площадью поверхности. Основные характеристики сорбента MN-202 представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные характеристики сорбента MN-202

Показатели	MN-202
Средний размер гранул, мм	0,3 – 1,2
Средний диаметр пор, Å	220
Адсорбционная поверхность, $м^2/г$	950

Исследования проводили на модельном растворе эндотоксина, полученном из лекарственного препарата «Пирогенал». «Пирогенал» представляет собой эндотоксин, выделенный из клеток *Salmonella typhi*.

Подбор условий статической сорбции проводили при варьировании значения pH раствора (от 1 до 12), а также количества сорбента (1, 2, 5, 7, 10 мг на 1 мл раствора). Сорбцию проводили в течение 24 ч при постоянном перемешивании на качалочной платформе с частотой 170 об/мин. Концентрация эндотоксинов в исходном растворе составляла 20 мкг/мл.

Для исследования равновесных параметров сорбцию эндотоксинов на А-100 и MN-202 проводили в статических условиях в течение 24 ч при количестве сорбента 2 мг на 1 мл раствора и различной концентрации исходных растворов (от 10 до 100 мкг/мг). По окончании процесса определяли равновесную концентрацию эндотоксина в растворе, рассчитывали емкость сорбции и строили изотермы сорбции.

В качестве метода определения концентрации эндотоксина в растворах была выбрана спектроскопия в ультрафиолетовой области. В основе метода лежит цветная реакция, которую дают моно- и олигосахара с фенолом и концентриро-

ванной серной кислотой. На спектрофотометре СФ-2000 измеряли оптические плотности растворов при длине волны 490 нм. Для определения концентрации полисахаридов был построен калибровочный график.

Для подбора условий проведения процесса сорбции эндотоксина на А-100 и MN-202 проводили исследования зависимости емкости сорбции от pH и количества сорбента. Результаты исследований представлены на рисунках 1 и 2.

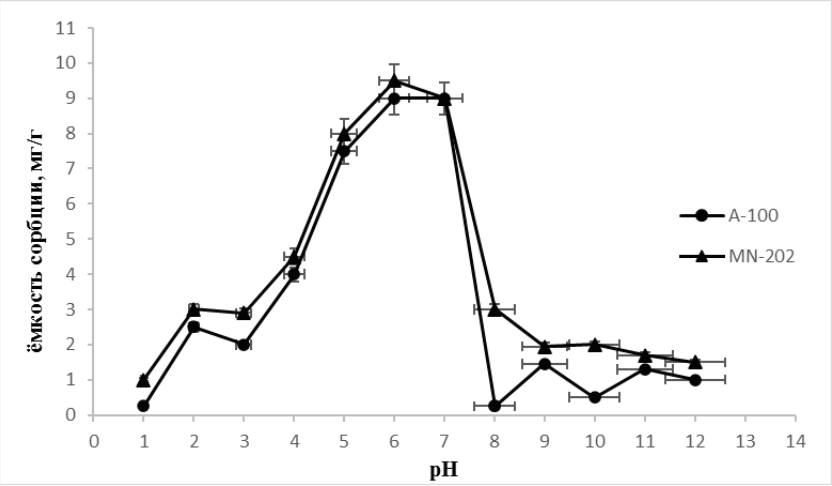


Рисунок 1. Зависимость емкости сорбции эндотоксина от pH раствора

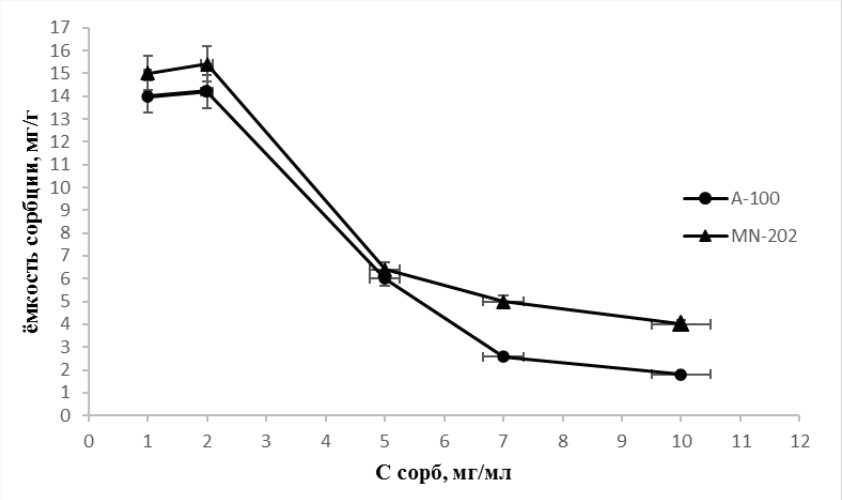


Рисунок 2. Зависимость емкости сорбции эндотоксина от количества сорбента

Из рисунков видно, что максимальная емкость сорбции наблюдается при значении pH в области 6.0-7.0 и концентрации сорбента 1-2 мг на 1 мл раствора. Дальнейшие эксперименты проводили при pH = 7,0 и количестве сорбента 2 мг на 1 мл раствора.

Для изучения равновесных параметров сорбции эндотоксина на сорбентах А-100 и MN-202 статический процесс проводили при варьировании концентрации исходного раствора. Были построены изотермы сорбции, приведенные на рисунках 3 и 4.

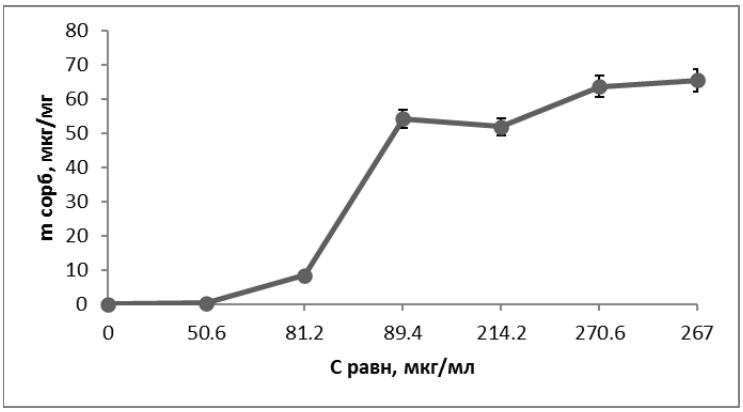


Рисунок 3. Изотерма сорбции эндотоксина на сорбенте А-100

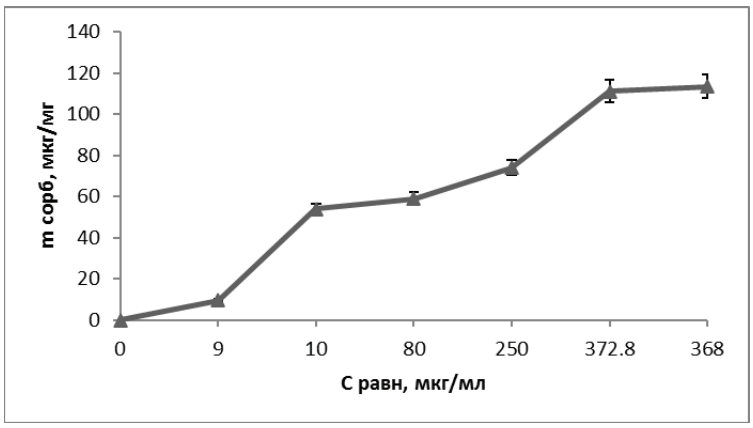


Рисунок 4. Изотерма сорбции эндотоксина на сорбенте MN-202

Согласно полученным данным, изотермы сорбции эндотоксина на обоих сорбентах имеют вид изотермы БЭТ, что говорит о статистическом распределении молекул на сорбционных центрах в присутствии капиллярного эффекта. При одинаковых концентрациях исходного раствора емкость сорбции молекулярного сорбента MN-202 выше, чем анионита А-100.

По изотермам сорбции рассчитаны коэффициенты распределения, представленные в таблице.

Таблица 3 – Показатели процесса сорбции на исследуемых сорбентах

Сорбент	Коэффициент распределения Kd, мл/г	Ёмкость сорбции, мкг/мг
А-100	236,5±0,1	64,0 ± 0,5
MN-202	299,1±0,1	111,5±0,5

Из таблицы видно, что наибольшей избирательностью и ёмкостью сорбции обладает анионит MN-202, о чём свидетельствует высокий коэффициент распределения, который составил 299,1±0,1 мл/г и сорбционная емкость 111,5±0,5 мкг/мг.

Подобраны оптимальные условия проведения процесса сорбции эндотоксина на полимерных сорбентах «А-100» и «MN-02».

Изучены равновесные параметры процесса сорбции эндотоксина на данных сорбентах. Показано, что наибольшей избирательностью и емкостью сорбции обладает молекулярный сорбент MN-202.

Также показано, что сорбция на данных сорбентах протекает по одинаковым закономерностям, но MN-202 обладает большей ёмкостью. В дальнейшем планируется изучение равновесных параметров сорбции эндотоксинов на сильных анионитах типа А-847 и молекулярных сорбентах типа MN-200 для получения более полной картины, а также расчёт коэффициентов распределения, исследование кинетических параметров и проведение процесса в динамических условиях для разработки сорбционно-хроматографического метода очистки растворов в составе технологии производства эндотоксина. Полученная по данной технологии субстанция эндотоксина после стандартизации может быть использована в качестве отечественного стандарта эндотоксина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. Clin. Microbiol. Rev. 1993;6 (1):57-68. DOI: 10.1128/cmr.6.1.57. PMID: 8457980.

2. Vaara M, Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel E.T. (ed.). Handbook of endotoxin. Amsterdam: Elsevier, 1984: 1-45.

3. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины». [Электронный ресурс]. Доступно по: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny/

4. Красовицкая ИА, Глазова НВ, Котова НВ. Получение стандарта эндотоксина методом глубинного культивирования Pseudomonas putida и сорбционно-хроматографической очистки нативного раствора. СПб.: Изд-во СПХФУ, 2019.

5. Кадолина ИБ, Разработка методов выделения и очистки бактериальных эндотоксинов. СПб, 1995.

SUMMARY

STUDY OF ENDOTOXIN SORPTION ON VARIOUS SORBENTS

Galina Z.R., 2nd year mag; **Kramenkova V.A.**, 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The article presents the results of research on the choice of optimal conditions for the endotoxin sorption process on polymer sorbents “A-100” and “MN-02” and studies the equilibrium parameters of the endotoxin sorption process on these sorbents.

Key words: *endotoxin, sorbent, lipopolysaccharide, Pyrogenal.*

REFERENCES

1. Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. Clin. Microbiol. Rev. 1993; 6 (1): 57-68. DOI: 10.1128/cmr.6.1.57. PMID: 8457980.
2. Vaara M, Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel E.T. (ed.). Handbook of endotoxin. Amsterdam: Elsevier; 1984: 1-45.
3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 2. OFS.1.2.4.0006.15 «Bacterial endotoxins». [Electronic resource]. Available at: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny/ (in Russ)
4. Krasovitskaya IA, Glasova NV, Kotova NV, Preparation of endotoxin standard by submerged cultivation of Pseudomonas putida and sorption chromatographic purification of the native solution. Spb, SPCPU Publishing House, 2019. (in Russ)
5. Kadolina IB. Development of methods for the isolation and purification of bacterial endotoxins. Spb, 1995. (in Russ)

МИНИМИКРОБИОРЕАКТОР ДЛЯ НАРАБОТКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НЕПОСРЕДСТВЕННО В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

Головина Л.А., студ. 3 курса, **Останина А.А.**, студ. 3 курса
Руководитель: **Арсениев Н.А.**, к.б.н., доц., **Вопиловский П.Н.**, вед. инженер
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, дом 29., Российская Федерация
E-mail: lidiya.golovina@spcpu.ru

Разработана и создана экспериментальная модель минимикробиореактора широкого спектра действия с определенным продуцентом БАВ.

Ключевые слова: *микробиореактор, таргетная доставка лекарств, продуцент БАВ.*

Доставка и устойчивое поддержание терапевтической дозы лекарств в просвете определенного отдела желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) остается крайне сложной задачей современной медицины и фармацевтики. При «традиционных» видах доставки лекарственных препаратов в отделы желудочно-кишечного тракта (пероральные и др.) большинство химических соединений интенсивно разрушаются пищеварительными ферментами, а при увеличении дозы они начинают оказывать токсическое влияние на функции сердца, почек и печени. При некоторых видах патологии, например, при дисбиозе, требуется присутствие не моно-, но многофакторных лекарственных агентов, работающих только в определенном отделе ЖКТ. Для реализации идеи устойчивого поддержания концентрации сложных биотехнологических лекарственных композиций в просвете определенных отделов ЖКТ родилась идея создания внутрикишечных минимикробиореакторов (ММБР). Такие устройства, находясь в определенном месте просвета пищеварительной трубки, должны устойчиво выделять биологически активные вещества (БАВ), которые необходимы для лечения заболевания ЖКТ, а также использовать питательные вещества кишечника в качестве субстратов для продуцентов БАВ. В этом направлении уже начаты разработки в ряде зарубежных биофармацевтических компаний (Anal & Stevens; Anal, Stevens & Reminan-Lopez и др.).

Цель работы: разработать и создать рабочую модель минимикробиореактора широкого спектра действия с определенным продуцентом БАВ.

Задачи:

1. Разработать, выбрать, сконструировать и напечатать первые масштабированные образцы минимикробиореактора с наиболее выгодной формой и внутренней архитектурой.
2. Подобрать экспериментально продуцент БАВ, загружаемый в минимикробиореактор.
3. Подобрать и освоить подходящую методику модификации выбранного продуцента с целью улучшения его производительности.

Культивирование продуцентов БАВ, работающих в желудочно-кишечном тракте, культуральный бокс, термостат, микроскопия, 3D биопечать металлом (титан) (аддитивные технологии) модели микробиореактора, методика модификации культуры пролуцента - системой CRISPR/CAS.

Разработаны, сконструированы и напечатаны первые масштабированные образцы минимикробиореактора (из полимерных материалов). Разработана внутренняя архитектура (рис. 1, 2, 3, 4) - вариант расположения ячеек с культурой продуцентом, форма в виде сферы, состоящей из двух половинок с защелкой якорного типа, и материал микробиореактора – металл совместимый с внутренней средой организма, с продуцентом и удобный для использования при 3D-печати. Выбрана культура-продуцент БАВ - пробиотический штамм Enterococcus faecium L3 (отдел молекулярной микробиологии ИЭМ). Выбрана технология модификации культуры – с помощью системы CRISPR/CAS.

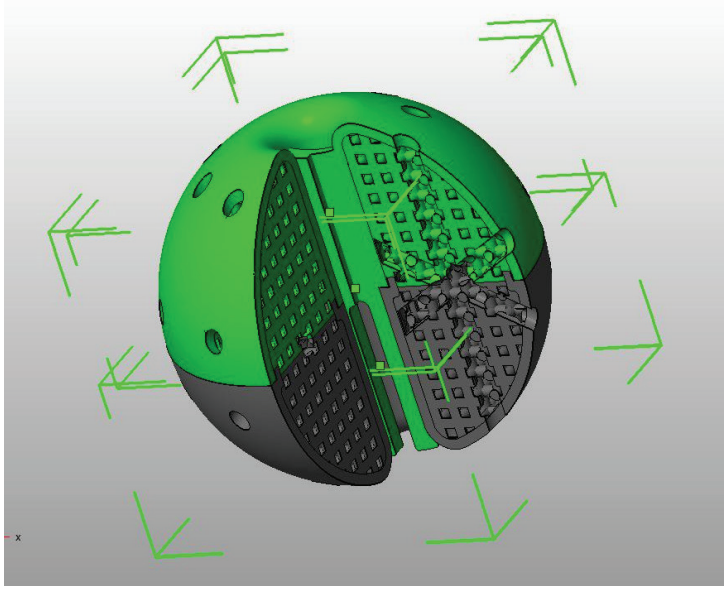


Рисунок 1. Микробиореактор в сборке

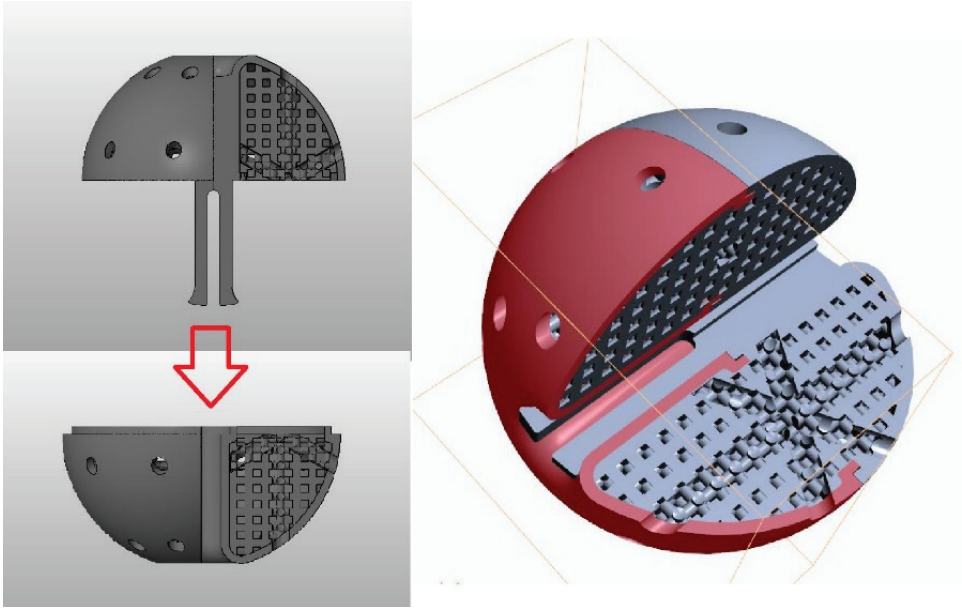


Рисунок 2. Схема сборки микробиореактора

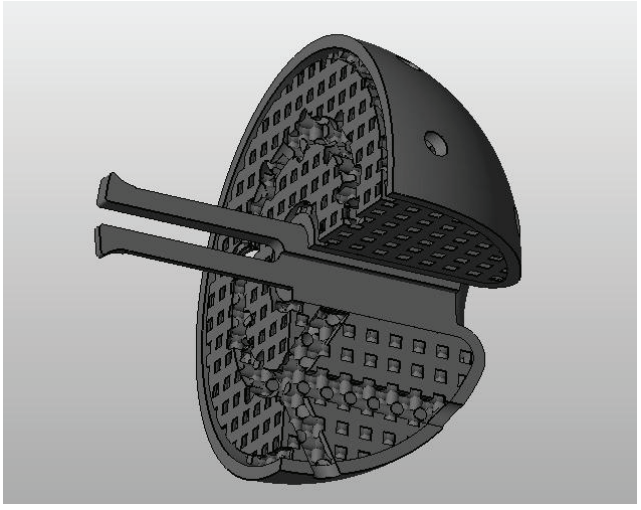


Рисунок 3. Верхняя часть микробиореактора

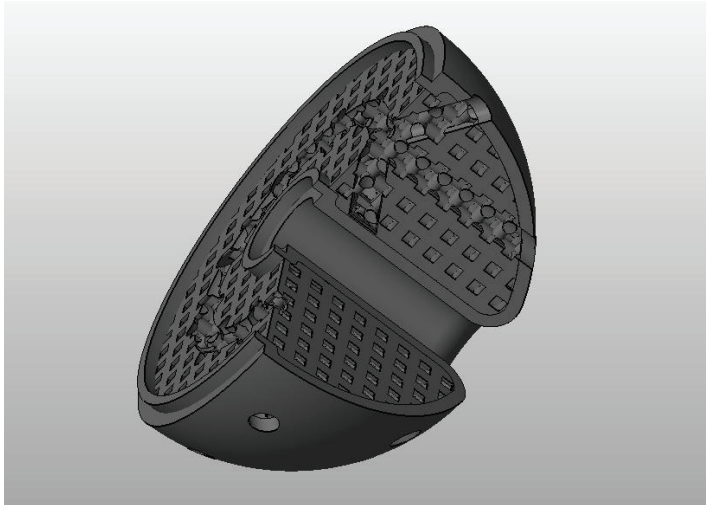


Рисунок 4. Нижняя часть микробиореактора

Создание ММБР выделяющего в просвет кишечника БАВ для коррекции нарушения микробиоты является одним из перспективных направлений лечения заболеваний ЖКТ. Для получения продуцентов БАВ возможно использование пробиотических штаммов микроорганизмов. Для повышения устойчивости к действию факторов окружающей среды и биотехнологической эффективности микроорганизмы – продуценты БАВ, должны подвергаться генной модификации с помощью системы CRISPR/CAS.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alena Karaseva, Anna Tsapieva, Justin Pachebat, Alexander Suvorov. Draft Genome Sequence of Probiotic Enterococcus faecium Strain L-3. American Society for Microbiology Journals. Microbiology Resource Announcements. 2016. 4(1). DOI: 10.1128/genomeA.01622-15.

2. МЛ Занавескин, АА Миронова, АМ Попов. Микрофлюидика и ее перспективы в медицине. Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», НБИКС-Центр, Москва. 2012 УДК 61:]532.5:001.895.

3. Гончар НВ, Алехина ЛА, Суворов АН. Пробиотические штаммы энтерококков как средства терапии и профилактики заболеваний кишечника детей. ВМА им.С.М. Кирова, ГБУЗ «Детская городская больница № 1», ФГБУ «НИИЭМ, Северо-Западное отделение» РАМН, Санкт-Петербург, 2013.

4. Красная ЮВ, Нестеров АС, Потатуркина-Нестерова НИ. Значение бактерий рода Enterococcus в жизнедеятельности человека. Современные проблемы науки и образования. 2014;6. УДК 579.61:616.9-616.3

SUMMARY

MICROBIOREACTOR FOR PRODUCING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES DIRECTLY IN THE GASTROINTESTINAL TRACT

Golovina L.A., 3rd year student, **Ostanina A.A.**, 3rd year student
Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
197376, St. Petersburg, Prof. Popova st., 14, Russian Federation
Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University,
195251, St. Petersburg, Polytechnicheskaya st., 29, Russian Federation

An experimental model of broad spectrum microbioreactor has been producing. The microbioreactor contains certain producer of biologically active substances.

Key words: *microbioreactor, targeted drug delivery, producer BAS*.

REFERENCES

1. Alena Karaseva, Anna Tsapieva, Justin Pachebat, Alexander Suvorov. Draft Genome Sequence of Probiotic Enterococcus faecium Strain L-3. American Society for Microbiology Journals. Microbiology Resource Announcements. 2016. 4(1). DOI: 10.1128/genomeA.01622-15.

2. ML Zanaveskin, AA Mironova, AM Popov. MICROFLUIDICS AND ITS PERSPECTIVES IN MEDICINE. Nano-, Bio-, Information and Cognitive Technologies (NBICS) Centre, Moscow, The National Research Centre «Kurchatov Institute». 2012, 61:]532.5:001.895.

3. Gonchar NV, Alehina LA, Suvorov AN. Probiotic strains of enterococci as a means of therapy and prophylaxis of intestinal diseases in children. Saint-Petersburg, 2013.

4. Krasnaya EV, Nesterov AS. Potaturkina-Nesterova NI. The relevance of bacteria of the genus Enterococcus in human life activity. Mag/ Modern problems of science and education. 2014;6, 579.61:616.9-616.3.

ОПТИМИЗАЦИЯ ИННОВАЦИОННОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Готовщиц Д.Р., маг. 2 года обучения
Руководитель: **Гершович П.М.**, к.б.н, и.о. директора НОЦ ТРБ.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: daniil.gotovshchic@spcpu.com

Проведено исследование влияния гуманизации аминокислотной последовательности антитела-кандидата, связывающегося с CD47 антигеном, на его ключевые физико-химические характеристики: продуктивность белков, их чистота после очистки, значения констант аффинности и наличие кросс-реактивности на панели антигенов. Получены высокоаффинные кандидаты (опт. 1 и опт. 2).

Ключевые слова: *моноклональные антитела, оптимизация, гуманизация, аффинность, транзиентная трансфекция, кинетические измерения, эффективность экспрессии, константа диссоциации, константа ассоциации, продуктивность.*

Антиген связывающий центр антитела по гипотезе будет ингибировать взаимодействие CD47-рецептора и SIRPα лиганда. Таким образом, моноклональные антитело может быть использовано для терапии заболеваний, опосредованных связью с CD47 [1]. Например, множество типов гистологических опухолей экспрессируют на своей поверхности CD47-рецептор, чтобы стать незаметной для иммунной системы [2]. Блокада при помощи моноклональных антител данного рецептора позволит не только способствовать фагоцитозу раковой опухоли, но и инициировать Т-клеточный иммунный ответ. Недавние и продолжающиеся клинические испытания показывают, что блокада CD47 в сочетании с другими моноклональными антителами или химиотерапией в необходимой степени безопасна и эффективна в терапии гистологической онкологии взрослых [3].

Целью исследования являлось провести гуманизацию антитела, полученного в результате иммунизации ламы экстраклеточным доменом CD47-рецептора, и проверить физико-химические характеристики по сравнению с исходным антителом. Поставленная цель достигалась выполнением следующих задач: провести оптимизацию аминокислотной последовательности антител в сторону их гуманизации (степень гомологии человеческой не менее 85%), провести сбор кодирующей генетической конструкции и провести транзиентную трансфекцию клеток-продуцентов для наработки целевого белка, а затем провести выделение и очистку, после чего определить изменение физико-химических параметров полученных кандидатов.

Объектом исследования служило исходное моноклональное антитело, полученное из иммунной библиотеки, которую сформировали путем иммунизации ламы экстраклеточным доменом CD47. После селекции и скрининга иммунной библиотеки было получено одно антитело, имевшее приемлемые значения продуктивности, чистоты белка, а также степени аффинности. Это лучшее антитело-кандидат подверглось бионформатической оптимизации, в ходе которой специальное ПО проводит сравнение аминокислотной последовательности исходного антитела с имеющимися в базе данных донорскими антителами здоровых людей. После выполнения программы, было получено 5 гуманизированных кандидатов (таблица 1), в которых FR-участки антител были заменены на имевшиеся ближайшие по гомологии в библиотеке доноров, а CDR остались нетронутыми. После этого, также при помощи биоинформатического ПО повели кодон-оптимизацию 5-и кандидатов с целью улучшения экспрессии целевого белка.

Таблица 1 – Основные параметры антител-кандидатов в проводимом исследовании

Кандидат	*Молекулярная масса, kDa*	*Изоточка*	*Коэффициент экстинкции*
Исходный	148,04	7,872	1,517
Опт. 1	148,07	7,213	1,537
Опт. 2	148,10	7,213	1,536
Опт. 3	147,72	7,214	1,446
Опт. 4	147,66	7,851	1,446
Опт. 5	147,77	7,214	1,445

Генетические конструкции, являвшиеся матрицей экспрессии тяжелой и легкой цепей моноклональных антител, являлись плазмиды с указанным в таблице 2 элементами. Сборка *de novo* осуществлялась для вариабельной вставки тяжелой и легкой цепей, остальной участок плазмиды был коровый и использовался как вектор, в который по специфическим сайтам рестрикции клонировалась вариабельная вставка. Корректность сборки конструкции проверяли секвенированием по Сэнгеру.

Таблица 2 – Функциональные элементы плазмид для экспрессии тяжелых и легких цепей исследуемых антител

Название элемента	*Функция*
EBV origin	*Точка начала репликации EBV (oriP)*
AmpR	*Ген bla, обеспечивающий устойчивость к ампициллину*
pUC origin	*Точка начала репликации pUC. Функционирует в клетках E.coli*
CMV promoter	*CMV промотор*
Kozak	*Консенсусная последовательность Козак*
START	*Старт-кодон*
Leader IgGK	*Лидерный пептид легкой цепи каппа IgG мыши*
STOP	*Стоп-кодоны*
PolyA	*Сигнал полиаденилирования*
CH1	*CH1 домен тяжелой цепи IgG1*
Hinge	*Шарнирный участок тяжелой цепи IgG1*
CH2	*CH2 домен тяжелой цепи IgG1*
CH3	*CH3 домен тяжелой цепи IgG1*
CK	*CK-домен легкой цепи антитела*
VH/VL	*Кодирующая последовательность вариабельного фрагмента цепи антитела*

Для экспрессии целевых белков использовалась клеточная линия, созданная на основе клеток яичников китайского хомяка CHO-T. Метод наработки белков – транзиентная трансфекция клеток комплексом PEI-плазмида, съем белков осуществляли на 7-й день после трансфекции. Очистка антител из культуральной жидкости заключалась в центрифугировании для осаждения клеточной массы и следовавшей затем фильтрации супернатанта и хроматографической очистки фильтрата при помощи аффинного сорбента с Protein A связывающим агентом. Полученный очищенный белок подвергался диализной очистке от низкомолекулярных примесей и замене буфера, после чего проводился анализ при помощи ВЭЖХ, гель-электрофореза и кинетических измерений на ForteBio Octet.

В таблице 3 представлены показатели продуктивности клеток по целевому белку и его выход после диализа.

Таблица 3 – Значения продуктивности и выхода белков

Кандидат	*Продуктивность, мг/л*	*Концентрация очищенного белка, мг/мл*	*Количество, мг*
Исходный	295,367	4,48	6,2755
Опт. 1	312,7	5,01	7,0118
Опт. 2	300,633	4,70	6,5853
Опт. 3	315,6	4,83	6,7642
Опт. 4	302,333	4,80	6,7163
Опт. 5	320,833	4,87	6,8208

По результатам, представленным в таблице, можно заключить, что внесенные в исходный кандидат аминокислотные замены и кодом оптимизация нуклеотидной последовательности негативно не сказались на продуктивности белка. Для подтверждения увеличения продуктивности и общего выхода белка в будущем следует поставить серию экспериментов, повторяющих данную наработку.

В таблице 4 представлены результаты оценки чистоты белков, полученные после обработки прошедшего электрофореза в ПААГ (нередуцирующие условия) при помощи специального компьютерного ПО.

Таблица 4 – Результаты обработки снимка окрашенного ПААГ (нередуцирующие условия)

Кандидат	*Белковые агрегаты, %*	*Мономер антитела, %*	*Низкомолекулярные фрагменты, %*
Исходный	1,0	84,6	14,4
Опт. 1	1,5	83,0	15,6
Опт. 2	1,6	82,5	16,0
Опт. 3	1,8	81,6	16,6
Опт. 4	1,7	83,0	15,3
Опт. 5	2,1	84,9	13,0

По результатам обработки снимка окрашенного геля можно заключить, что изменение аминокислотной последовательности повлияло стабильность молекулы, что привело к незначительному, но увеличению доли белковых агрегатов и низкомолекулярных фрагментов.

В таблице 5 представлены результаты аналитической ВЭЖХ антител-кандидатов.

Таблица 5 – Значения чистоты растворов антител, измеренные при помощи ВЭЖХ

Кандидат	*Белковые агрегаты, %*	*Мономер антитела, %*	*Низкомолекулярные фрагменты, %*
Исходный	1,032	98,968	-
Опт. 1	2,864	97,136	-
Опт. 2	2,328	97,672	-
Опт. 3	1,76	98,24	-
Опт. 4	1,744	98,256	-
Опт. 5	2,32	97,68	-

Данные, полученные после ВЭЖХ, подтверждают результаты электрофореза, что оптимизация молекул привела к увеличению склонности к агрегации исследуемых антител. Отсутствие значений в столбце низкомолекулярных примесей обусловлено чувствительностью детектора, который не может их уловить.

Ниже представлены результаты кинетических измерений кандидатов, целью которых было определить их степень аффинности по отношению к целевому антигену, а также к панели самых распространенных человеческих антигенов для оценки кросс-реактивного потенциала. На рисунке 1 изображены графики измерений ассоциации и диссоциации антител на AR2G сенсорах (ForteBio Octet).

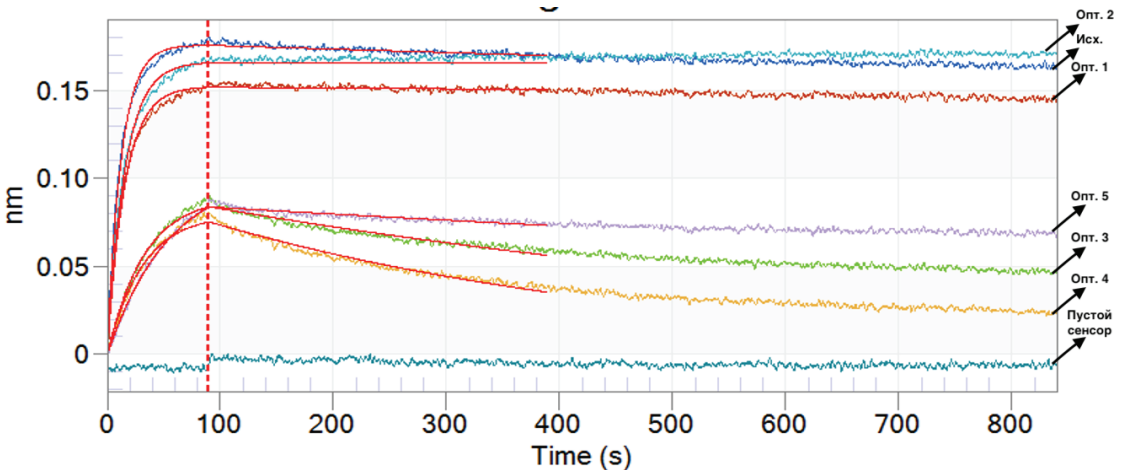


Рисунок 1. Кривые ассоциации и диссоциации исследуемых кандидатов, построенные в результате анализа связывания антител с иммобилизованным на сенсорах антигеном CD47

На основе построенного графика специальное ПО провело расчет константы ассоциации (kon(1/Ms)), диссоциации (kdis(1/s)) и равновесного значения константы диссоциации (KD) (таблица 6).

Таблица 6 – Значения констант аффинности исследуемых кандидатов

Кандидат	*KD*	*kon(1/Ms)*	*kdis(1/s)*
Исходный	$4{,}70*10^{-11}$	$2{,}39*10^{6}$	$1{,}12*10^{-4}$
Опт. 1	$1{,}49*10^{-11}$	$1{,}89*10^{6}$	$2{,}81*10^{-5}$
Опт. 2	$<1.0*10^{-12}$	$1{,}89*10^{6}$	$<1.0*10^{-7}$
Опт. 3	$1{,}55*10^{-9}$	$8{,}62*10^{5}$	$1{,}34*10^{-3}$
Опт. 4	$2{,}90*10^{-9}$	$8{,}72*10^{5}$	$2{,}53*10^{-3}$
Опт. 5	$8{,}45*10^{-10}$	$5{,}30*10^{5}$	$4{,}48*10^{-4}$

На основе результатов измерения констант можно заключить, что первые два оптимизированных кандидата обладают высокой степенью аффинности к целевому антигену и практически отсутствующей диссоциацией комплекса с антигеном. Против этого, изменения аминокислотной последовательности у оптимизированных вариантов 3, 4 и 5 привели к уменьшению силы связывания антитела с антигеном и более быстрой диссоциации их комплекса.

Следующий эксперимент был поставлен для проверки кросс-реактивности исследуемых антител с другими антигенами. Результаты измерений неспецифичного связывания представлены на рисунке 2. Как видно из графика,

ответ сенсоров находится на уровне шума, что свидетельствует об отсутствии связывания со неспецифическими антигенами. Положительным контролем являлся пролголимаб, специфично связывающийся с антигеном N1N2-PDL1-H6F.

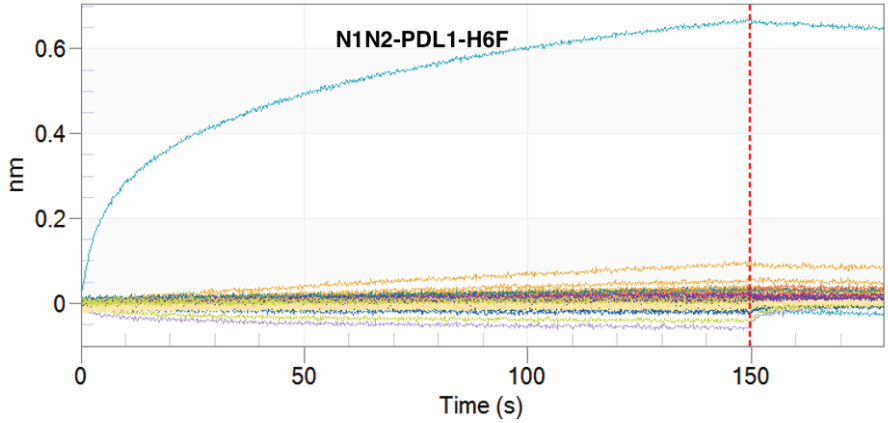


Рисунок 2. Измерение ответа сенсоров с иммобилизованными антителами на связывание антигенов

Общая панель исследованных антигенов была следующая:
1. hAng_H6F
2. hPD1ex-H6F
3. hCSF1R_His
4. IL5R-His
5. hIL4R-His
6. hCD38-Avi
7. N1N2-PDL1-H6F
8. GNR001-00_C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA
9. Her3-H6F
10. hisOX40
11. Macaca CSF1R

Проведено исследование изменения физико-химических характеристик оптимизированных анти-CD47 антител: аффинности, константы диссоциации и ассоциации, а также продуктивности и чистоты полученных белков. Кандидаты показали отсутствие кросс-реактивности на панели антигенов, хорошие показатели чистоты и продуктивности, а кандидаты 1 и 2 – выраженную аффинность по отношению к целевому антигену CD 47 и низкую степень диссоциации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gupta A, Taslim C, Tullisus Br et al. Therapeutic modulation of the CD47-SIRPa axis in the pediatric tumor microenvironment: working up an appetite. Cancer Drug Resist. 2020;3:550–561. DOI: 10.20517/cdr.2020.12.

2. Gardai Sh, McPhillips K, Frasch S et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. Cell. 2005;123:321–334. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.032.

3. Lu Q, Chen X, Wang Sh et al. Potential new cancer immunotherapy: anti-CD47-SIRPa antibodies. Onco Targets and Therapy. 2020; 13:9323–9331. DOI: 10.2147/ott.S249822.

SUMMARY

INNOVATIVE MONOCLONAL ANTIBODY OPTIMIZATION IN ORDER TO IMPROVE ITS PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS

Gotovshchits D.R., 2nd year master student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

At this article have been studied the influence of humanization of anti-CD47 antibody on its key physical and chemical characteristics: productivity, purity after isolation, affinity constants, and cross-reactivity with antigen panel. High-affinity candidates were obtained (opt. 1 and opt. 2).

Key words: *monoclonal antibodies, optimization, humanization, affinity, transient transfection, kinetic measurements, expression efficiency, dissociation constant, association constant, productivity.*

REFERENCES

1. Gupta A, Taslim C, Tullisus Br et al. Therapeutic modulation of the CD47-SIRPa axis in the pediatric tumor microenvironment: working up an appetite. Cancer Drug Resist. 2020;3:550–561. DOI: 10.20517/cdr.2020.12.

2. Gardai Sh, McPhillips K, Frasch S et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. Cell. 2005;123:321–334. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.032.

3. Lu Q, Chen X, Wang Sh et al. Potential new cancer immunotherapy: anti-CD47-SIRPa antibodies. Onco Targets and Therapy. 2020;13:9323–9331. DOI: 10.2147/ott.S249822.

МИКРОКАПСУЛЯЦИЯ ФУЛЛЕРЕНОЛА В ЛИПОСОМЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТДИЛХОЛИНА

Данилкина Е.А., студ. 3 курса

Руководитель: **Дмитриева И.Б.**, докт. хим. наук, доц.; **Жидкова Н.В.**, старший преподаватель

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация

E-mail: katyadanilkina2010@gmail.com

Основная цель данной работы – выявление влияния способа введения лекарственного препарата «Фуллеренол», который используется в качестве ранозаживляющих и противоожоговых препартов, в дисперсионную среду на размер липосом, что было подтверждено экспериментально серией опытов.

Ключевые слова: *фуллеренол, липосомы, фосфатидилхолин, биохимия, транспорт, растворы.*

Липосомы – небольшие искусственные везикулы сферической формы. Они могут быть образованы из холестерина или природных нетоксичных фосфолипидов – амфифильных сложных липидов, в которых содержатся жирные кислоты, фосфорная кислота и дополнительная группа атомов, во многих случаях содержащая азот. [3] Благодаря своим размерам, дифильному строению, а также биосовместимости, липосомы являются перспективными системами доставки фармакологически активных соединений к клеткам-мишеням в организме. [4] В ядро липосомы можно включать различные радиоактивные, рентгеноконтрастные, парамагнитные вещества, а также вещества, отражающие ультразвук, улучшающие качество изображений в таких распространенных методах диагностики, как компьютерная томография, рентгенография и ультразвуковое зондирование. [5] В настоящее время липосомы активно используются в изучении свойств биологических мембран, для транспорта веществ, в качестве реакционных систем в биохимии, фармации, иммунологии и биотехнологии.

Фуллеренол обладает высокой антиоксидантной активностью, превышает действие других известных антиоксидантов, таких как витамины Е и С, каротиноиды, флавоноиды и др. в 100-1000 раз. [1] Фуллеренол С60 применяется как противовирусные препараты с отсутствием цитотоксичности, антиоксиданты, ранозаживляющие и ожогозаживляющие препараты, в косметологии, в растениеводстве и животноводстве в качестве стимуляторы роста растений, антивирусных и противогрибковых препаратов. [2]

Целью данной работы является изучение влияния способа введения фуллеренола в дисперсионную среду на размер липосом.

Практическая часть работы представляет собой решение экспериментальных задач в области физико-химических анализов растворов липосом и растворов липосом с введенным различными способами лекарственного препарата «Фуллеренол».

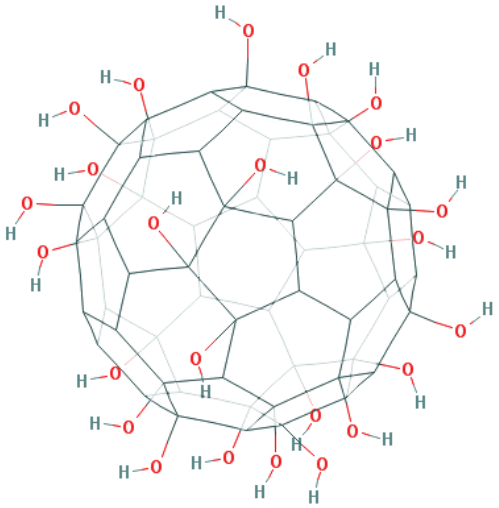


Рисунок 1. Молекула фуллеренола

Объектами исследования служили: спиртовые растворы фосфолипида-фосфатидилхолина, и водный раствор фуллернола. Готовились два насыщенных раствора фосфатидилхолина в изопропиловом спирте, затем в одну из колб объемом 100 мл добавлялось 5 мг фуллереннола, после чего растворы выпаривались на плитке под вытяжным шкафом. Оставшийся осадок разбавлялся 25 мл дистиллированной воды и подвергали ультразвуковым диспергированием. В первую пробу фуллеренол вводился в спиртовой раствор до испарения спирта, а во вторую пробу вводился после испарения спирта и добавления воды. Затем, пробы диспергировались на ультразвуковой установке в течение 5 минут. Далее определялся размер образовавшихся липосом. Для этого измерялась оптическая плотность на ФЭК-3 при разных длинах волн, затем рассчитывался размер частиц, используя уравнение Рэлея для рассеяния света при прохождении через дисперсионные среды и кривую Геллера.

Методы исследования:

- Ультразвуковое диспергирование. Тонкое размельчение частиц, то есть переход веществ раствора в дисперсное состояние с образованием золей осуществляли с помощью диспергирования ультразвуком на приборе диспергатор ультразвуковой УЗД1-0.0663/22 в течение 5 минут и последующем охлаждении.
- Фотоколориметрический количественный анализ. Измерение оптической плотности растворов проводили на фотоколориметре КФК-3. Использовались кюветы с длиной 1 см.

Результаты расчетов размера липосом:

- Радиус липосом без фуллеренола составляет ≈ 40 нм;
- Радиус липосом с фуллеренолом введенный в спиртовой раствор фосфатидилхолина до выпаривания составил ≈ 65 нм;
- Радиус липосом с фуллеренолом введенный в водный раствор после выпаривания фосфатидилхолина превышает 85 нм.

Проведенные исследования показали, что при введении фуллеренола размер липосом увеличивается и зависит от способа введения, что согласуется с работой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотухин ИВ. Фуллерен – новая форма углерода. Соросовский образовательный журнал. 1996;2:51-56. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.08.019 https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.08.019

2. Хирш А. Принципы реакционной способности фуллерена. Вопросы современной химии. 1999;199:1–65. DOI: 10.1007/3-540-68117-5_1 https://doi.org/10.1007/3-540-68117-5_1

3. Дмитриева ИБ, Тихомолова КП, Чухно АС, Прокопович ПП, Старов ВМ. Исследование электроповерхностных свойств NiO и Fe2O3 в азольных растворах. Коллоиды и поверхности A: Physicochem. Англ. Аспекты. 2007;241(3):45-59. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.01.046 https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.01.046

4. Чухно АС. и др. Электроповерхностные свойства оксидов никеля (II) и железа (III) в водных растворах 1,2,4 триазола. Журнал прикладной химии. 2010;83(7):1119-1123. DOI: 10.1134/s1070427210070116 https://doi.org/10.1134/s1070427210070116

5. Кацай АГ, Рубан ЕА, Краснопольский ЮМ. Влияние состава липосом на степень инкапсуляции и размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома с. Scientific journal «sciencerise: pharmaceutical science». 2017;4(8):32-36. DOI: 10.15587/2519-4852.2017.109003 https://doi.org/10.15587/2519-4852.2017.109003

SUMMARY

MICROCAPSULATION OF FULLERENOL IN LIPOSOMES BASED ON PHOSPHATDYLCHOLINE

Danilkina E.A., 3rd year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The main goal of this work is to reveal the effect of injection method of "Fullerenol", which is used as wound healing and anti-burn drugs, into a dispersion medium on the size of liposomes, which was confirmed experimentally by a series of experiments.

Key words: *fullerenol, liposomes, phosphatidylcholine, biochemistry, transport, solutions.*

REFERENCES

1. Zolotukhin, IV. Fullerene – a new form of carbon. Soros educational journal. 1996;2;51-56. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.08.019 https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.08.019 (In Russ)

2. Hirsch A. Principles of Fullerene Reactivity. Topics in Current Chemistry. 1999;199:1–65. DOI: 10.1007/3-540-68117-5_1 https://doi.org/10.1007/3-540-68117-5_1 (In Russ)

3. Dmitriyeva IB, Tikhomolova KP, Chukhno AS, Prokopovich PP, Starov VM. Investigation of the electrosurface properties of NiO and Fe_2O_3 in azole solutions. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2007;241(1-3):45-59. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.01.046 https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.01.046 (In Russ)

4. Chukhno, AS et al. Electrosurface properties of nickel (II) and iron (III) oxides in aqueous solutions of 1,2,4 triazole. Journal of Applied Chemistry. 2010;83(7):1119-1123. DOI: 10.1134 / s1070427210070116 https://doi.org/10.1134/s1070427210070116 (In Russ)

5. Katsai G, Ruban EA, Krasnopolsky YuM. Influence of liposome composition on the degree of encapsulation and particle size during the creation of an iposomal form of cytochrome c. Scientific journal "sciencerise: pharmaceutical science". 2017;4(8):32-36. DOI: 10.15587 / 2519-4852.2017.109003 https://doi.org/10.15587/2519-4852.2017.109003 (In Russ)

РАЗРАБОТКА СОРБЦИОННОГО МЕТОДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЛИПАЗЫ ИЗ ЭКСТРАКТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

Ескенова С.Ж., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Глазова Н.В.**, канд.хим.наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14 Российская Федерация
E-mail: sandi.eskenova@spcpu.ru

Целью данной работы является разработка сорбционного метода выделения и очистки липазы из экстракта поджелудочной железы северного оленя.

Проведен гель-хроматографический анализ экстракта поджелудочной железы северного оленя. Показано, что в экстракте поджелудочной железы северного оленя находятся гидролитические ферменты (протеаза, амилаза, липаза) в активной форме. Изучены процессы сорбции липазы с помощью модельного раствора на сорбентах различной структуры: сульфокатиониты, карбоксильный катионит, анионит, неионогенный сорбент. Определены эффективные параметры сорбции и десорбции. Подобран эффективный сорбент (карбоксильный катионит) для выделения липазы из экстракта поджелудочной железы северного оленя.

Ключевые слова: *экстракт поджелудочной железы, липаза, модельный раствор, препарат Lipopan, сорбенты, сорбционно-хроматографическая очистка.*

В современной биотехнологии производство ферментных препаратов занимает одну из лидирующих позиций. Терапевтическое действие данных препаратов обусловлено входящими в их состав гидролитическими ферментами. Одним из таких ферментов является липаза. В настоящее время, одно из важнейших направлений использования липаз для нужд человека представляют различные области медицины, включающие терапию заболеваний пищеварительного тракта, лечение от избыточного веса, диагностику многих болезней, получение хорошо усваиваемых диетических триглицеридов, а также в косметологии. Микробная липаза в комплексе с амилазой может способствовать пищеварению, при этом для гидролиза жиров в желудке и кишечнике препарат должен проявлять активность в широком диапазоне pH. Полученный во Франции пенообразующий ферментный комплекс, содержащий липазу, применяется при профилактике и лечении нарушений функции пищеварительного тракта. В особенности данный препарат используется при диспепсии, гастритах, колитах, последствий гастро- и холециститэктомии. [1] В настоящее время, в качестве сырья для получения ферментных препаратов используют преимущественно органы крупного рогатого скота. Показано [2], что в поджелудочной железе северного оленя ферменты содержатся не в виде зимогенов, а в активном виде, в отличие от поджелудочной железы крупного рогатого скота. Благодаря этому процесс выделения и очистки липазы можно провести с минимальными потерями и затратами, т. к. будет исключена стадия активации фермента. Поэтому на кафедре проводятся работы по изучению процессов выделения липазы из экстракта поджелудочной железы северного оленя.

Целью настоящей работы является подбор эффективных сорбентов для выделения липазы из экстракта поджелудочной железы северного оленя. Так как в экстракте возможно содержание большого количества примесных компонентов, то первый этап работы по выбору сорбентов проводился на модельном растворе липазы.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

- определить оптимальные условия сорбции липазы из модельного раствора;
- подобрать условия сорбции и десорбции липазы на различных сорбентах;
- выбрать наиболее эффективный сорбент для проведении сорбционно-хроматографичекой очистки липазы.

Липаза – фермент подкласса эстераз, получаемая из поджелудочной железы, катализирует расщепление жиров (триглицеридов) на глицерин и жирные кислоты, которые являются энергетическим и пластическим материалом для организма. Характерным отличием липазы от других известных ферментов является присутствие в структуре полипептидной цепи липофильного α-спирального домена петли, выполняющей роль "крышки" для активного центра. Этот домен открывает активный центр (каталитическую триаду) только при связывании фермента с поверхностью раздела вода–липид (феномен, называемый интерфазной активацией). Липаза имеет молекулярную массу 48 000 единиц и оптимум каталитической активности pH 8–9. Изоэлектрическая точка липазы 3,7.[3]

Объектами исследования служили: модельный раствор липазы, полученный из препарата Lipopan 100L (Novozymes, Дания). Модельный раствор готовился таким образом, чтобы концентрация липазы в модельном растворе соответствовал концентрации липазы в экстракте.

Для изучения параметров сорбции гидролитических ферментов использовались сорбенты различных структур:

- Сульфокатиониты: КУ-23 (ООО «Химимпэкс», Россия), Purolite-C150, (PUROLITE international limited, Великобритания);
- Карбоксильный катионит Purolite-C115EC, (PUROLITE international limited, Великобритания);
- Анионит PUROLITE A400MBOH, (PUROLITE international limited, Великобритания);
- Неионогенный сорбент PURASORB AP 500 (Corbion, Нидерланды).

В выполнения данной работы были использованы следующие методы:

- определение концентрации общего белка по методу Лоури;
- определение липолитической активности по модифицированному методу Shihabi и Bishop.

Эффективность сорбционно-хроматографического процесса сорбции определяется условиями проведения процесса. Важно подобрать такие параметры сорбции, чтобы очистка целевого продукта от примесей стала наиболее результативной. Согласно теории неравновесной динамики сорбции, важнейший параметр сорбционного процесса в динамических условиях – так называемый критерий регулярности λ.[4]

Данный параметр определяет вклад и равновесного, и кинетического факторов сорбции. Кроме того, он зависит и от технологических параметров сорбции, и от природы разделяемых веществ. Рассчитывается критериальный параметр λ по формуле:

$$\lambda = 12 \cdot (1 - \varepsilon) \cdot K_d \cdot \frac{\overline{D}_{эф}}{W_p \cdot d^2_{ч}} \cdot H_0 \qquad (1)$$

где ε – порозность слоя сорбента;

K_d – коэффициент распределения, мл/г;

$\overline{D}_{эф}$ – коэффициент диффузии, м²/с;

W_p – рабочая скорость протекания процесса, м/с;

$d_ч$ – средний диаметр зерен сорбента, м;

H_0 – высота слоя сорбента, м;

При λ > 0,35 протекает регулярный режим сорбции (близкий к равновесному);

При λ < 0,35 протекает нерегулярный режим сорбции, эффективность разделения снижается, уменьшается выход целевого продукта.

Изучение процессов сорбции липазы на модельном растворе проводилось на сорбентах различной структуры. Предварительно была проведена оптимизация процессов сорбции. Оптимальные процессы сорбции и десорбции представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективные параметры сорбции и десорбции

Параметры сорбции	КУ-23	Purasorb-500	Purolite-A400MBOH	Purolite-C115EC	Purolite-C150
Высота слоя сорбента, м	0,035	0,025	0,025	0,045	0,05
Скорость элюции при сорбции	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25
Скорость элюции при десорбции	0,125	0,125	0,25	0,125	0,125
Элюат для десорбции	раствор аммиака pH=9-10	раствор аммиака pH=9-10	раствор аммиака pH=9-10	раствор аммиака pH=9-10	раствор аммиака pH=9-10 + ацетон безводный
λ	0,36	0,36	0,40	0,36	0,37

Сорбцию липазы из модельный раствора проводили с использованием фронтального метода, для этого раствор пропускали через слой сорбента со скоростью, приведенной с таблиц 1. После окончания сорбции проводили промывку сорбента и затем, десорбцию фермента, с каждого выбранного сорбента элюатами выбранным, согласно таблице 1. После окончания процесса десорбции сорбент регенерировали подачей на колонку раствора 1н NaOH.

На выходе из колонки собирали фракции по 0,5 мл, в каждой из которых проверяли содержание общего белка и ферментативную активность.

На основании полученных экспериментальных данных строили выходные кривые в координатах:

$$\frac{A_i}{A_0} = f\left(\frac{V_e}{V_k}\right)$$

$$\frac{C_i}{C_0} = f\left(\frac{V_e}{V_k}\right)$$

где A_i – ферментативная активность в исследуемой пробе, АЕ(ПЕ)/мл;

A_0 – ферментативная активность в исходном растворе, АЕ(ПЕ)/мл;

C_i – концентрация общего белка в исследуемой пробе, мг/мл;
C_0 – концентрация общего белка в исходном растворе, мг/мл;
V_e – объем элюции, мл;
V_k – объем колонки, мл;

$$V_k = \pi \cdot R^2 \cdot h \qquad (2)$$

где R – радиус лабораторной колонки, см (R=0.5 см); h – высота сорбента, см (h= 5 см);

$$V_k = 3{,}9 \text{ мл}$$

Выходные кривые процесса сорбции и десорбции представлены на рисунках 1-5.

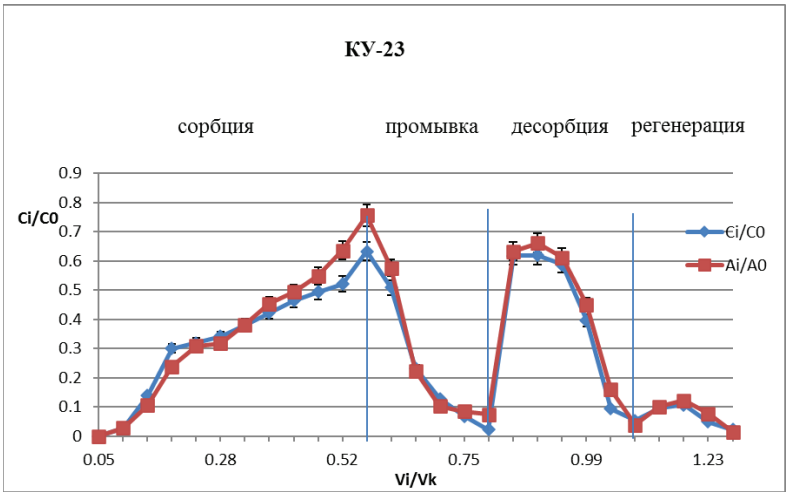


Рисунок 1. Выходная кривая сорбции и десорбции липазы на сорбенте КУ-23

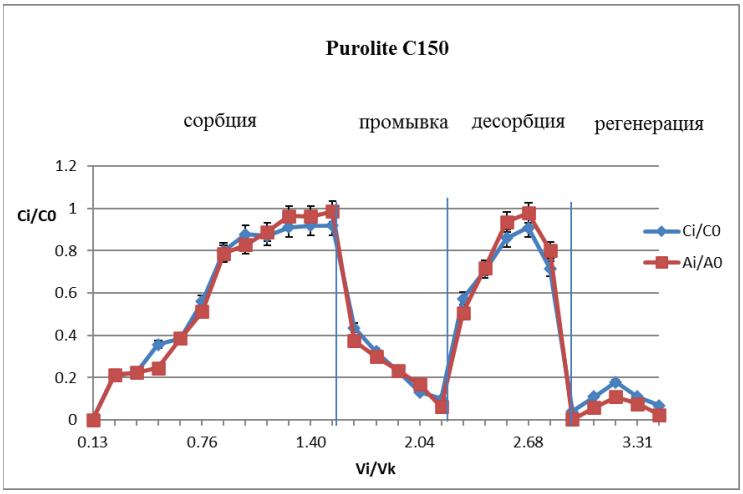


Рисунок 2. Выходная кривая сорбции и десорбции липазы на сорбенте Purolite C150

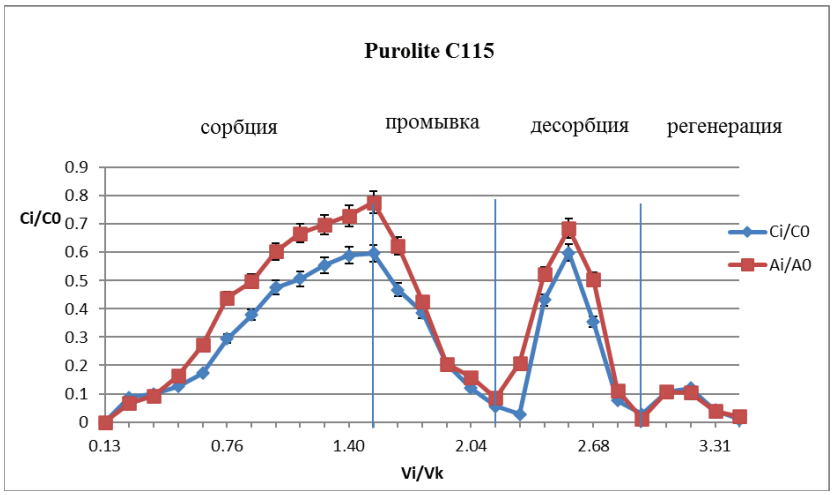


Рисунок 3. Выходная кривая сорбции и десорбции липазы на сорбенте Purolite C115 EC

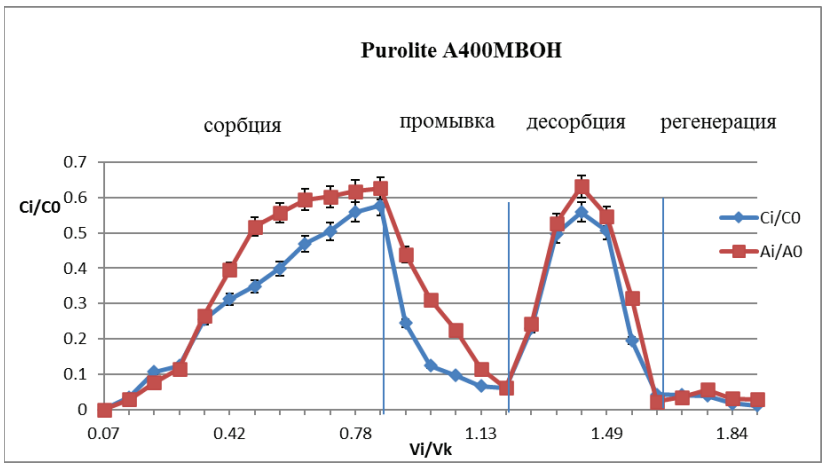


Рисунок 4. Выходная кривая сорбции и десорбции липазы на сорбенте Purolite A400MBOH

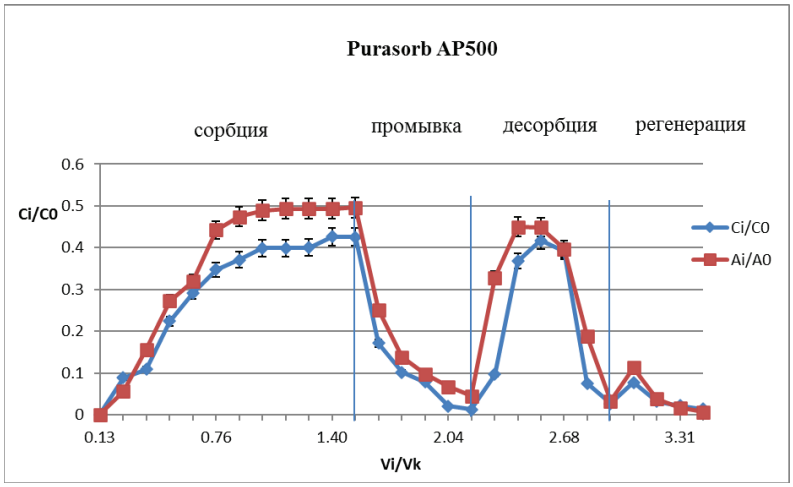


Рисунок 5. Выходная кривая сорбции и десорбции липазы на сорбенте Purasorb AP500

По полученным графикам (рис. 1-5) были рассчитаны выходы на стадии десорбции.

Расчет выхода по стадии десорбции проводился по следующей формуле:

$$\eta = \frac{S1}{S2} \cdot 100\%, \qquad (3)$$

где η – выход на стадии десорбции;

S1 – площадь фигуры, ограниченной кривой сорбции и касательной, параллельной оси Vi/Vк;

S2 – площадь фигуры, ограниченной кривой десорбции и осью оси Vi/Vк.

Экспериментальный данные, полученные по сорбционно-хроматографическому выделению липазы, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Выходы на стадии десорбции

Сорбент	λ	Выход на стадии десорбции, %
Purolite-A400MBOH	0,40	85
Purolite-C150	0,37	80
Purolite-C115EC	0,36	93
КУ-23	0,36	75
Purasorb-AP500	0,36	72

Как видно из таблицы 2 наиболее эффективным сорбентом для выделения и очистки липазы является карбоксильный катионит Purolite-C115EC, на котором выход на стадии десорбции составил 93 %.

Определены оптимальные условия сорбции липазы из модельного раствора. Подобраны условия сорбции и десорбции липазы на различных сорбентах и рассчитан выход по стадии десорбции. Наиболее эффективным сорбентом для проведении сорбционно-хроматографичекой очистки липазы является карбоксильный катионит Purolite-C115EC. Выход на стадии десорбции для данного сорбента составил 93 %. Поэтому, дальнейшая работа по выделению липаза из экстракта поджелудочной железы северного оленя будет продолжена с использованием катионита Purolite-C115EC.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рубан ЕЛ. Микробные липиды и липазы. АН СССР, М. : Наука, 1977: 192-196.

2. Караваева ЛИ. Подбор Сорбентов для разработки сорбционного метода для выделения и очистки комплекса протеаз из поджелудочной железы северного оленя. Сборник материалов IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием конф. «Молодая Фармация – Потенциал будущего»; 22-23 апреля 2019 г. СПб; СПХФУ. Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2019:403-406.

3. Ескенова СЖ. Разработка сорбционно-хроматографического метода выделения и очистки липазы из животного сырья. Сборник материалов X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». Санкт-Петербург, 2020 г. Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2020:669-672.

4. Елькин ГЭ. Концепция регулярности режима сорбции в теории и практике ионного обмена органических ионов. Межвузовский сборник: Ионный обмен и ионометрия. 1990;7:3-15.

5. Глазова НВ. Сорбционное разделение смесей БАВ в квазиравновесных и неравновесных условиях. Тезисы докладов Всерос. симпозиума «Биосепарация-96». СПб; 1996:11.

6. Глазова НВ, Кучеренко АН, Омельянова АП. Современные технологии выделения, очистки и модификации АФС (ферментов). М. : КНОРУС, 2019.

SUMMARY

THE DEVELOPMENT OF A SORPTION METHOD FOR THE DOWNSTREAM OF LIPASE FROM THE PANCREAS OF REINDEER.

Yeskenova S.Z., 2nd year master student
St. Petersburg State Chemistry and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The purpose of this work is to develop a sorption method for isolation and purification of lipase from reindeer pancreatic extract.

Gel-chromatographic analysis of reindeer pancreatic extract was carried out. It has been shown that reindeer pancreas extract contains hydrolytic enzymes (protease, amylase, lipase) in active form. The processes of lipase sorption by means of model solution on sorbents of different structure: sulfocation cations, carboxylic cationite, anionite, nonionic sorbent have been studied. Effective sorption and desorption parameters were determined. An effective sorbent (carboxyl cationite) for lipase isolation from reindeer pancreatic extract was selected.

Key words: *pancreatic extract, lipase, model solution, Lipopan, sorbents, sorption-chromatographic purification.*

REFERENCES

1. Ruban EL. Mikrobniye lipidy i lipazy. AN SSSR. Moscow: Nauka, 1977:192-196. (in Russ)

2. Karavaeva LI. Podbor Sorbentov dlya razrabotki sorbcionnogo metoda dlya vydeleniya i ochistki kompleksa proteaz iz podzheludochnoj zhelezy severnogo olenya. Sbornik materialov IX Vserossijskoj nauchnoj konferencii studentov i aspirantov s mezhdunarodnym uchastiem konf. «Molodaya Farmaciya – Potencial budushchego»; 22-23 aprelya 2019 g. Saint Petersburg; SPHFU, 2019:. 403 – 406. (in Russ)

3. Eskenova SZ. Razrabotka sorbcionno-hromatograficheskogo metoda vydeleniya i ochistki lipazy iz zhivotnogo syr'ya. Sbornik materialov X Vserossiyskoy nauchnoy konferencii studentov i aspirantov s mezhdunarodnym uchastiem «Molodaya farmaciya – potencial budushchego». Sankt-Peterburg, 2020. Sankt-Peterburg: SPHFU, 2020: 669-672. (in Russ)

4. Elkin GE. Koncepciya regulyarnosti rezhima sorbcii v teorii i praktike ionnogo obmena organicheskih ionov. Mezhvuzovskij sbornik: Ionnyj obmen i ionometriya. 1990;7:3-15. (in Russ)

5. Glazova NV. Sorbcionnoe razdelenie smesej BAV v kvaziravnovesnyh i neravnovesnyh usloviyah. Tezisy dokladov Vseros. simpoziuma «Bioseparaciya-96». Saint Petersburg, 1996:11. (in Russian)

6. Glazova NV, Kucherenko AN, Omel'yanova AP. Sovremennye tekhnologii vydeleniya, ochistki i modifikacii AFS (fermentov). Moscow: KNORUS, 2019.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЛИДЕРНЫХ ПЕПТИДОВ НА СЕКРЕЦИЮ БЕЛКА FVIII

Зельманчук И.С., маг. 2 года обучения ФПТЛ
Руководитель: **Ломунова М.А.**, к.б.н., доцент НОЦ ТРБ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: irina.zelmanchuk@spcpu.ru

Множественные литературные данные говорят о том, что с помощью модификации лидерного пептида можно повысить секрецию белка. В рамках данной работы проведено сравнение конструкций с измененными лидерными пепти-

дами. По результатам трансдукции клеточной линии Huh7 выбраны 2 варианта плазмид с заменой лидерного пептида №2 и №4.

Ключевые слова: *гемофилия А, фактор VIII, генная терапия, аденоассоциированные вирусные векторы, лидерные пептиды, плазмиды.*

Последнее десятилетие мы наблюдаем значительный терапевтический прогресс в лечении гемофилии в виде доступности препаратов с длительным периодом полувыведения, что позволяет увеличить интервалы между инъекциями. Более того, становится доступной нефакторная заместительная терапия на основе биспецифического антитела (эмицизумаб), а также препараты генной терапии уже находятся на стадии разработки. В настоящее время, идет бурное развитие технологий генной терапии. Генотерапевтические препараты с безопасными векторами доставки и передовыми биотехнологиями будут играть важную роль в профилактике и лечении заболеваний человека в будущем, а также существенно повысят уровень жизни пациентов, избавив от необходимости регулярных инъекций.

Несмотря на то, что уже предприняты значительные усилия для улучшения векторных систем доставки на основе AAV, мы все еще сталкиваемся с проблемой низкой секреции целевого белка.

Цель исследования – сравнить эффективность экспрессии и секреции белка FVIII в составе генетических конструкций с различными лидерными пептидами.

На этапе ранней разработки генотерапевтического препарата против гемофилии А проводятся различные модификации кДНК человеческого фактора свёртывания крови VIII (FVIII): кодон-оптимизация кДНК FVIII, замена B-домена, добавление специфичного промотора и др. [1]. Данная работа направлена на изучение того, как модификация лидерной последовательности гена FVIII, влияет на секрецию белка FVIII.

Лидерный пептид, или лидерная последовательность пептида – N-концевая последовательность некоторых мембранных и секреторных белков, которая определяет их конечную локализацию. Лидерные последовательности необходимы для белков, которые предназначены для транслокации в определенные органеллы клетки, встройки в клеточную мембрану или секреции во внеклеточное пространство [2].

Транслокация крупных гидрофильных белков через интактную мембрану является фундаментальным процессом в мембранной биологии. В эукариотических клетках все секреторные и лизосомные белки первоначально перемещаются через мембрану эндоплазматического ретикулума; в то время как почти все белки митохондрий, хлоропластов и пероксисом синтезируются в цитоплазме и специфически перемещаются через одну, две или даже три мембраны, чтобы достичь своего конкретного места назначения [3].

Общая структура лидерных пептидов состоит из гидрофильной, обычно положительно заряженной N-концевой области, центрального гидрофобного домена и C-концевой области с сайтом расщепления сигнальной пептидазой [4]. У коагуляционного белка FVIII в лидерной последовательности за доменом Gla следуют 2 EGF-like домена и C-концевой домен сериновой протеазы [2].

Лидерные последовательности располагаются между промотором и кодирующей областью и участвуют в регуляции экспрессии генов. Часть лидерной последовательности может быть транслирована в короткий лидерный пептид, но, в отличие от сигнальных пептидов, лидерные пептиды не являются частью структурных белков. Лидерные последовательности содержат короткую открытую рамку считывания, кодирующую лидерный пептид, далее прилегает шпилька. Формирование той или другой возможной шпильки зависит от остановки рибосомы во время трансляции лидерного пептида, либо из-за отсутствия необходимой тРНК, либо из-за связывания определенного метаболита с комплексом рибосома/мРНК. В свою очередь, формирование альтернативной конформации мРНК влияет либо на продолжение транскрипции (ослабление), либо на инициацию трансляции кодирующей области белка (ослабление). Таким образом, лидерные последовательности могут регулировать экспрессию генов на уровне транскрипции или трансляции [2].

Лидерный пептид играет важную роль в ассоциации растущей пептидной цепи с цитозольной стороной ЭПР. Введение лидерного пептида в ЭПР инициирует транслокацию пептида через мембрану. Пока белок перемещается через мембрану ЭПР, лидерный пептид отщепляется сигнальной пептидазой. Оптимизация лидерных пептидов в генетических конструкциях активно применяется в биотехнологии для повышения секреции белков [5].

Объектами исследования служили 3 генетические конструкции с заменой лидерного пептида (№2-4). В качестве контроля использовалась плазмида без лидерного пептида. Трансфекция исследуемыми плазмидами была поставлена на клеточной линии Huh7. Через 72 ч после трансфекции клеток (в трипликатах) проводили внутриклеточное окрашивание белка FVIII флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647 (AF647) и анализ уровня его экспрессии методом проточная цитометрия. Через 7 дней после трансфекции проводили измерение концентрации белка FVIII в культуральной среде методом ИФА и измерение активности белка FVIII в культуральной среде с помощью хромогенного теста.

Через 72 ч после трансфекции клеток исследуемыми плазмидами проводили внутриклеточное окрашивание белка FVIII и анализ уровня его экспрессии методом проточная цитометрия. Результаты представлены в табл. 1, а также в графическом виде на рис. 1-3.

Таблица 1 – Уровень экспрессии внутриклеточного белка FVIII в клеточной линии Huh7 после трансфекции плазмидами

Анализируемые образцы	FVIII-AF647, %	FVIII-AF647, Mean
Huh7 – isotype, не трансфецированные клетки	1,23	14,79
Huh7 – плазмида №1 (контроль)	57,20±3,39	18,58±1,52
Huh7 – плазмида №2	48,99 ±3,80	17,66±1,20
Huh7 – плазмида №3	68,86±7,61	18,13±2,49
Huh7 – плазмида №4	62,88±4,52	18,72±1,40

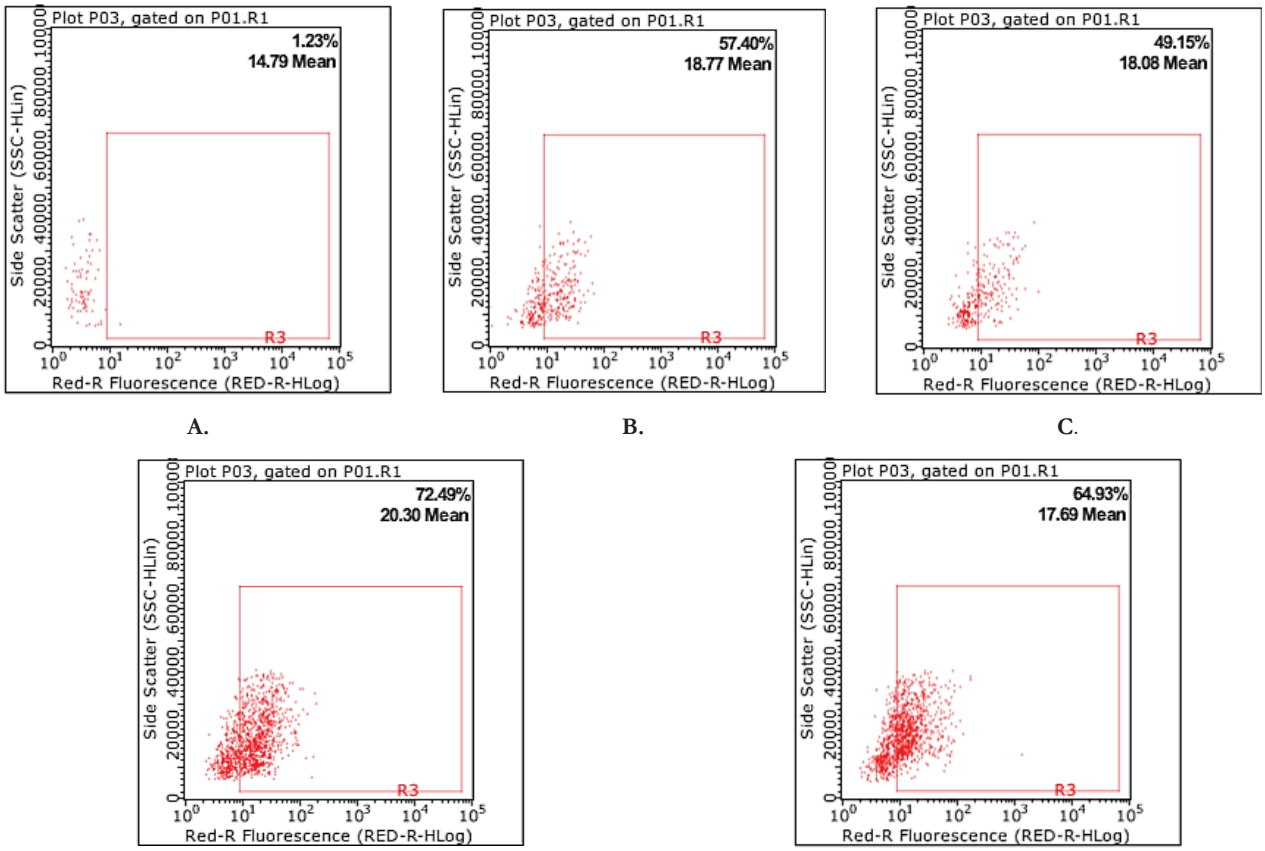


Рисунок 1. Внутриклеточная экспрессия FVIII-AF647 в клеточной линии Huh7 после трансфекции плазмидами, 72 часа. A. Не трансфецированые клетки, окрашивание первичными антителами Anti-F8 и вторичными антителами Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG; B. Клетки после трансфекции плазмидой №1, окрашивание первичными антителами Anti-F8 и вторичными антителами Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG; C. Клетки после трансфекции плазмидой №2, окрашивание первичными антителами Anti-F8 и вторичными антителами Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG; D. Клетки после трансфекции плазмидой №3, окрашивание первичными антителами Anti-F8 и вторичными антителами Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG; E. Клетки после трансфекции плазмидой №4, окрашивание первичными антителами Anti-F8 и вторичными антителами Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG

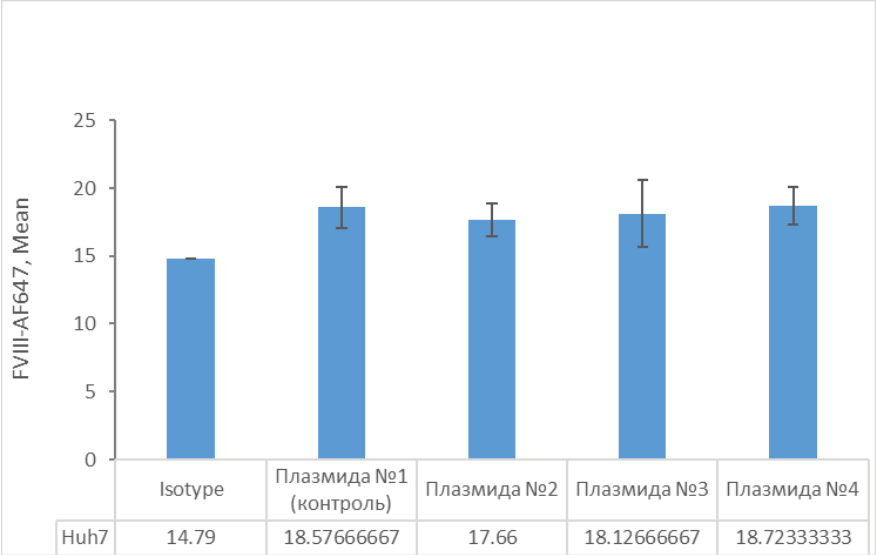


Рисунок 2. Интенсивность внутриклеточной экспрессии FVIII-Alexa Fluor 647 (Mean) в клетках Huh7 после трансфекции плазмидами, у.е.

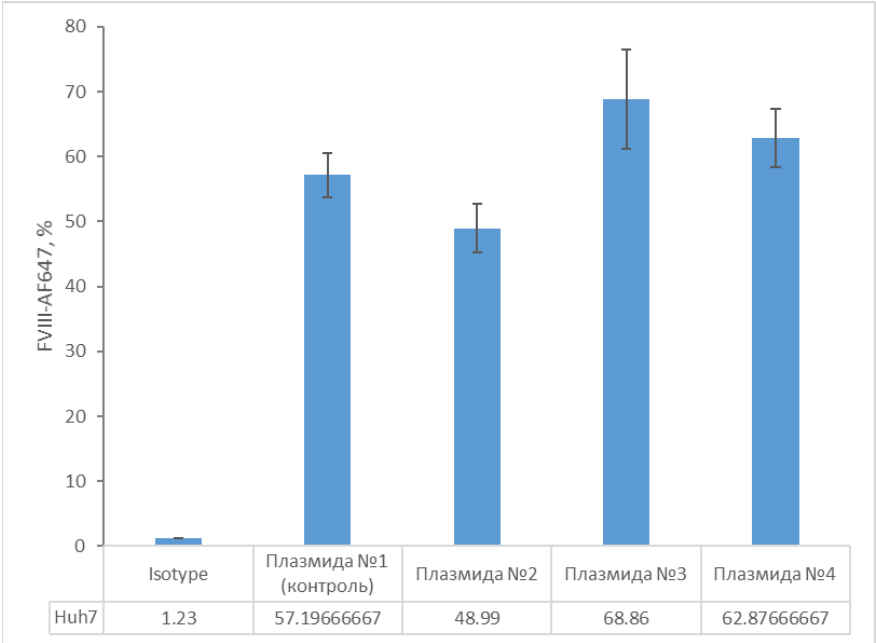


Рисунок 3. Уровень внутриклеточной экспрессии FVIII-Alexa Fluor 647 в клетках Huh7 после трансфекции плазмидами, %

Результаты измерения концентрации FVIII методом ИФА в культуральной среде через 7 дней после трансфекции клеточной линии Huh7 плазмидами №1-№4 представлены в табл. 2 и на рис. 4.

Таблица 2 – Концентрация белка FVIII в культуральной среде (с учетом разведения) после трансфекции клеток HUH7, 7 дней, нг/мл

Анализируемые образцы	Концентрация FVIII в среде, нг/мл
Huh7 – isotype, не трансфецированные клетки	29,84±2,0
Huh7 – плазмида №1 (контроль)	66,20±4,4
Huh7 – плазмида №2	151,10±11,1
Huh7 – плазмида №3	59,56±10,7
Huh7 – плазмида №4	140,40±8,5

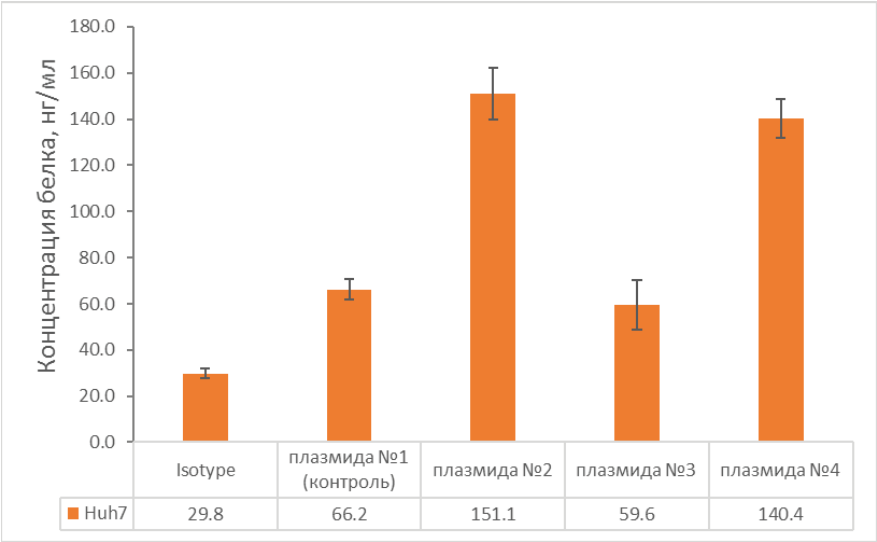


Рисунок 4. Концентрация FVIII в культуральной среде после трансфекции плазмидами после 7 дней инкубации, нг/мл

Результаты измерения активности белка FVIII в культуральной среде с помощью хромогенного теста через 7 дней после трансфекции клеточной линии Huh7 исследуемыми плазмидами представлены в табл. 3 и на рис. 5.

Таблица 3 – Активность белка FVIII в культуральной среде через 7 дней после трансфекции клеточной линии Huh7, %

Анализируемые образцы	Активность FVIII в среде, %
Huh7 – isotype, не трансфецированные клетки	1,27±0,3
Huh7 – плазмида №1 (контроль)	13,37±2,1
Huh7 – плазмида №2	110,48±21,3
Huh7 – плазмида №3	23,65±3,1
Huh7 – плазмида №4	130,00±9,2

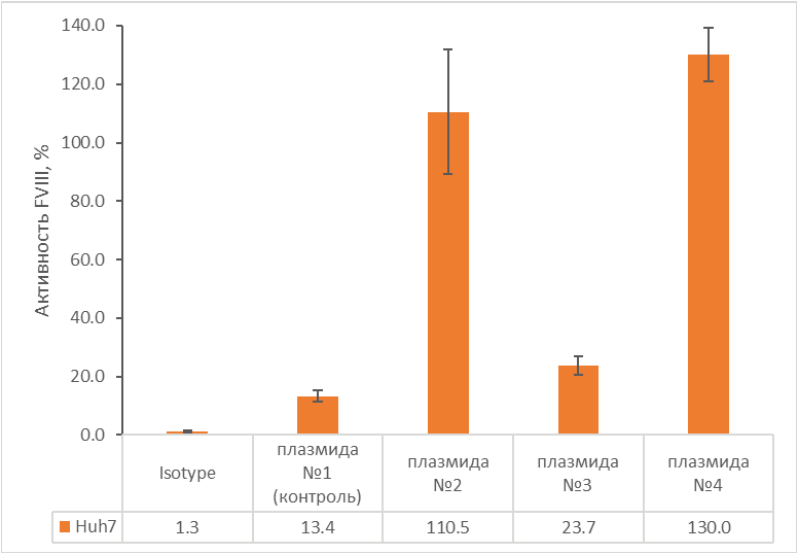


Рисунок 5. Активность белка FVIII в культуральной среде после трансфекции плазмидами и 7 дней инкубации, %

Несмотря на отсутствие значимых различий по уровню внутриклеточной экспрессии FVIII между плазмидами, наблюдается увеличение концентрации и активности белка в культуральной среде после трансфекции плазмидами с измененными лидерными пептидами (№2-№4).

В данной экспериментальной работе проводилось сравнение трёх плазмид с измененными лидерными пептидами – относительно контрольной плазмиды. Результаты проточной цитометрии не показали статистически значимых различий уровня экспрессии внутриклеточного белка FVIII.

Изменения, внесенные в лидерном пептиде в плазмиде №2 и №4, привели к увеличению продукции белка FVIII и его активности в культуральной среде после 7 дней инкубации по сравнению с контрольной плазмидой. Изменения, внесен-

ные в лидерном пептиде в плазмиде №3, не приводят к значимому изменению продукции белка FVIII и его активности по сравнению с контролем. Модификации лидерного пептида способны повлиять на секрецию активного белка FVIII.

ЛИТЕРАТУРА

1. Garagiola I, Peyvandi F. State of the art on clinical trials of gene therapy in haemophilia. 2020.
2. Mølhøj M, Dal Degan F. Leader sequences are not signal peptides. Nature biotechnology. 2004;22(12):1502-1502.
3. Singer SJ, Maher PA, Yaffe MP. On the translocation of proteins across membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences.1987;84(4):1015-1019.
4. Kapp K et al. Post-targeting functions of signal peptides. Protein transport into the endoplasmic reticulum. 2009:1-16.
5. Hansson K, Stenflo J. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2005;3(12):2633-2648.

SUMMARY

EVALUATION THE INFLUENCE OF LEADER PEPTIDES ON SECRETION OF THE FVIII PROTEIN

Zelmanchuk I.S., 2nd year graduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A lot of literature data suggest that the modification of the leader peptide can increase protein secretion. As part of this study were compared constructs with modified leader peptides. According to the results of transduction the Huh7 cell line, 2 plasmid variants with replacement of the leader peptide №2 and №4 were chosen.

Key words: *hemophilia A, factor VIII, gene therapy, adeno-associated viral vectors, leader peptides, plasmids.*

REFERENCES

1. Garagiola I, Peyvandi F. State of the art on clinical trials of gene therapy in haemophilia. 2020.
2. Mølhøj M, Dal Degan F. Leader sequences are not signal peptides. Nature biotechnology. 2004;22(12):1502-1502.
3. Singer SJ, Maher PA, Yaffe MP. On the translocation of proteins across membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences.1987;84(4):1015-1019.
4. Kapp K et al. Post-targeting functions of signal peptides. Protein transport into the endoplasmic reticulum. 2009:1-16.
5. Hansson K, Stenflo J. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2005;3(12):2633-2648.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБИОРЕАКТОРА ДЛЯ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА ИНСУЛИНА БЕТА-КЛЕТКАМИ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА

Зенкова А.К., студ. 3 курса, **Карандашова С.С.**, студ. 3 курса
Руководители: **Арсениев Н.А.**, к.б.н., доц., **Вопиловский П.Н.**, вед. инженер
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: arina.zenkova@spcpu.ru

Разработана и создана экспериментальная модель микробиореактора широкого спектра действия с возможностью использования различных клеточных культур в качестве продуцентов.

Ключевые слова: *микробиореактор, клетки-продуценты, биологически активные вещества, генетическая инженерия, CRISPR/Cas9*

Для достижения эффективного и безопасного введения лекарственного препарата в организм человека с минимальным причинением вреда всем его тканям и органам была реализована идея специфического микроинкапсулирования и разработана конструкция микробиореактора, работающего непосредственно внутри организма человека. Размещенные в «теле» микробиореактора клеточные культуры-продуценты позволяют поставлять необходимые организму лекарственные вещества в течение достаточно продолжительного времени, что в свою очередь обеспечивает возможность регулирования времени воздействия и концентрации БАВ. Разработанный микробиореактор можно разместить максимально близко к пораженному органу, обеспечивая целевую доставку БАВ.

Цель работы: разработка экспериментальной модели микробиореактора для проведения стендовых испытаний.

Задачи:

1. Разработать конструкцию микробиореактора, отвечающую заданным требованиям и пригодную для печати металлом на 3D-принтере.

2. Аналитически рассмотреть существующие способы получения линий клеток-продуцентов.
3. Выбрать линию клеток-продуцентов для проведения испытаний в микробиореакторе.

Микробиореактор, программа «Компас 3D», 3D-принтер, материал (металл) для печати – титан.

На данный момент разработана экспериментальная конструкция микробиореактора, представляющая собой шаровидный тор, состоящий из двух частей с ювелирной защелкой, внутри располагается сетка с каналами для размещения продуцента. Каналы соединены с отверстиями (порами) на поверхности конструкции и проходят между сетчатыми блоками, в которых находятся линии клеток-продуцентов. Микробиореактор распечатан на 3D-принтере. Материал – титан.

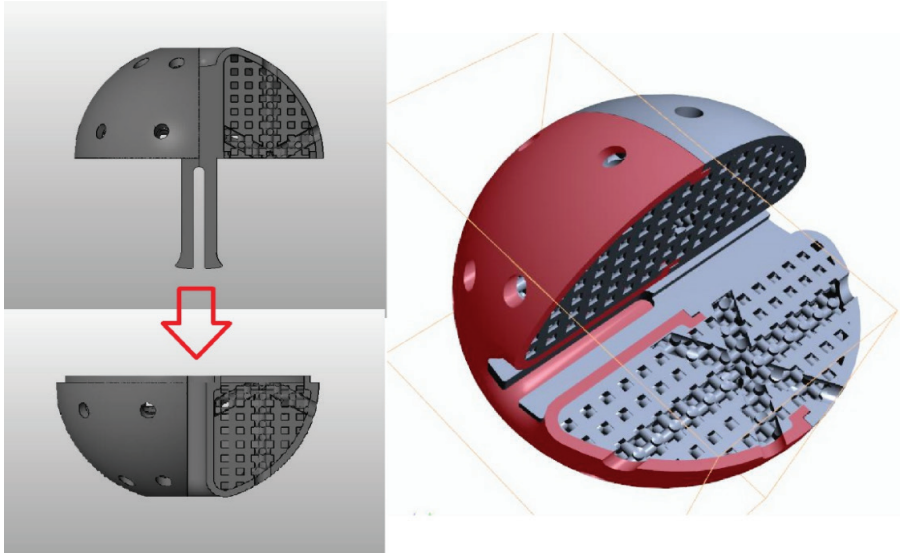


Рисунок 1. Разработанный микробиореактор

Проведен анализ научной литературы для выбора клеточной культуры в качестве рабочего тела микробиореактора. Для проведения исследований планируется использовать бета-клетки островков Лангерганса. Выбор этих клеток был сделан на основе работы [3]. Возможно применение клеточной линии RIN m 5F, выделенной из инсулиномы крысы, которая хранится в Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П) Института Цитологии РАН. С выбранной клеточной линией будут проводиться работы по ее адаптации к условиям существования внутри микробиореактора (в условиях статики и динамики). Также планируется начать работы по модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas9 для повышения выработки целевого метаболита. За основу взят алгоритм редактирования генома β-клеток инсулиномы крысы линии INS-1 (832/13) (глюкозочувствительные) с помощью технологии CRISPR/Cas9 [3], который осуществляется по следующей схеме: (представлен на рис. 2).

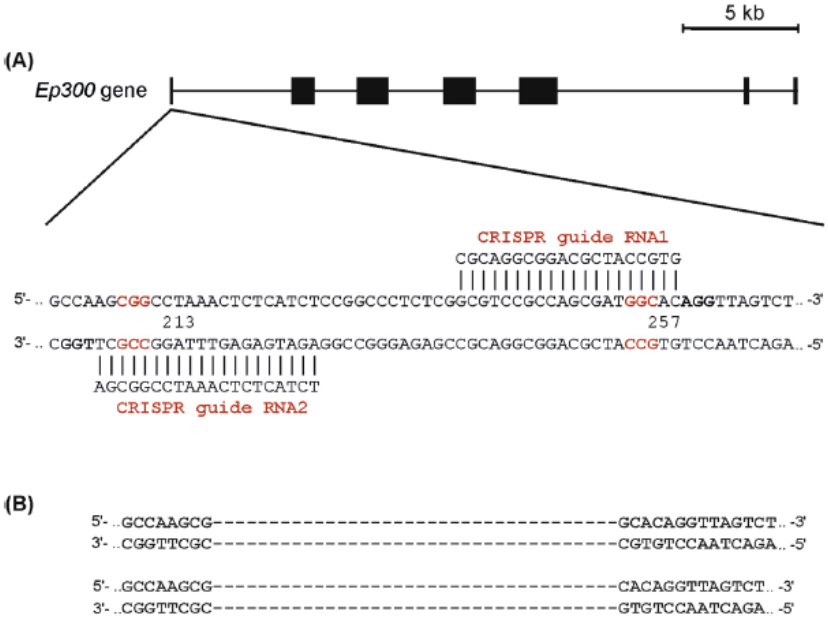


Рисунок 2. Алгоритм редактирования генома методом вырезания гена Ep300 в клетках INS1 832/13 с использованием технологии CRISPR/Cas9 [3]

В настоящий момент разработана и создана экспериментальная конструкция микробиореактора. Предварительно выбрана клеточная линия RIN m 5F, выделенная из инсулиномы крысы, которая будет непосредственно находиться в «теле» микробиореактора. Проведенный нами поиск и анализ научных работ позволил изучить принципы генетической инженерии, особенности использующихся клеточных технологий. Основываясь на результатах опубликованных исследований [1],[2],[3], мы выбрали технологический алгоритм редактирования генома бета-клеток островков Лангерганса.

Решается задача по воспроизведению полученных раннее результатов научных исследований [1],[2],[3] с целью развития навыков работы с линиями клеток-продуцентов, изучения методов, применяемых в генетической инженерии, и проведения стендовых испытаний микробиореактора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нургалиева АК, Скрипова ВС, Минигулова ЛФ, Киямова РГ. Получение клеточной линии рака поджелудочной железы, стабильно экспрессирующей доксициклин-зависимую эндонуклеазу cas9. Казанский (Приволжский) федеральный университет. Казань, 2018;160(3):386–394

2. Орлова НА, Ковнир СВ, Ходак ЮА, Ползиков МА, Воробьев ИИ. Рекомбинантный лютеинизирующий гормон человека для терапии бесплодия: получение линии-продуцента. ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва ООО «АйВиФарма», Москва, DOI: 10.17749/2313-7347.2017.11.3.033-042

3. Pradeep Bompada, David Atac, Cheng Luan, Robin Andersson, Judit Domènech Omella, Emilia Ottosson Laakso, Jason Wright, Leif Groopa, Yang De Marinis. Histone acetylation of glucose-induced thioredoxin-interacting protein gene expression in pancreatic islets. Diabetes and Endocrinology, Department of Clinical Sciences, Lund University, Malmö, SE-20502, Sweden, Lund University Diabetes Centre, Department of Clinical Sciences, Lund University, Malmö, SE-20502, Sweden, Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology (MIT) and Harvard, Cambridge, MA, 02142, USA, Finnish Institute for Molecular Medicine (FIMM), Helsinki University, Helsinki, FI-00014, Finland. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. December, 2016.

SUMMARY

THE USE OF A MICROBIOREACTOR FOR INDUCTION OF INSULIN BY BETA-CELLS OF LANGERHANS ISLANDS

Zenkova A.K., 3rd student, **Karandashova S.S.**, 3rd student
Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
197376, St. Petersburg, Prof. Popova st, 14, Russian Federation

An experimental model of a broad-spectrum microbioreactor has been developed and created with the possibility of using cell cultures as producers.

Key words: *microbioreactor, producer cells, biologically active substances, genetic engineering, CRISPR / Cas9.*

REFERENCES

1. Nurgalieva AK, Skripova VS, Minigulova LF, Kiyamov RG. Obtaining a pancreatic cancer cell line stably expressing doxycycline-dependent cas9 endonuclease. Kazan (Volga Region) Federal University. Kazan,2018;160(3):386–394

2. Orlova NA, Kovnir SV, Khodak YuA, Polzikov MA, Vorobiev II. Recombinant human luteinizing hormone for infertility therapy: obtaining a producer line. Federal Research Center "Fundamental Foundations of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences", Moscow LLC "iViPharma", Moscow, DOI: 10.17749 / 2313-7347.2017.11.3.033-042

3. Pradeep Bompada, David Atac, Cheng Luan, Robin Andersson, Judit Domènech Omella, Emilia Ottosson Laakso, Jason Wright, Leif Groopa, Yang De Marinis. Histone acetylation of glucose-induced thioredoxin-interacting protein gene expression in pancreatic islets. Diabetes and Endocrinology, Department of Clinical Sciences, Lund University, Malmö, SE-20502, Sweden, Lund University Diabetes Center, Department of Clinical Sciences, Lund University, Malmö, SE-20502, Sweden, Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology (MIT) and Harvard, Cambridge, MA, 02142, USA, Finnish Institute for Molecular Medicine (FIMM), Helsinki University, Helsinki, FI-00014, Finland. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. December, 2016.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ АГАРИКОВЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Ильичева Е.С., студ. 4 курса
Руководители: **Гурина С.В.**, канд. биол. наук, зам. зав. кафедрой; **Псурцева Н.В.**, канд. биол. наук, зав. лабораторией
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: ilicheva.ekaterina@pharminnotech.com

Проведен скрининг 22 культур грибов – представителей отдела Basidiomycota класса Agaricomycetes порядка Agaricales по показателям скорости роста, микро- и макроморфологических признаков, а также активности протеолитических, целлюлолитических и окислительных ферментов. На основании анализа полученных результатов были отобраны наиболее активные культуры для дальнейшего изучения их биотехнологического потенциала.

Ключевые слова: *скорость роста, оксидазная активность, желатиназная активность, сирингалдазин, гваякол, продуценты БАВ.*

В настоящее время, мицелиальные грибы и дрожжи активно используются в биотехнологии как продуценты различных веществ: антибиотиков, ферментов, полисахаридов, каротиноидов и многих других БАВ [1].Еще с древних времен был раскрыт потенциал базидиальных грибов для использования их в медицине, но, в связи с отсутствием достаточного количества сведений об их культивировании, промышленное производство базидиальных грибов только начинает налаживаться [2]. Актуальным является то, что их можно легко культивировать на питательных средах со стандартным составом, и к ним применимы почти все генетические методы, которые используются при работе с микроорганизмами, также многие из них являются съедобными и не аллергенными. Грибы порядка Agaricales представлены в основном грибами с мягкомясистыми плодовыми телами, с центральной ножкой и шляпкой на ней. Реже плодовые тела имеют хрящеватую или кожистую консистенцию и боковую ножку. Бывают они и без ножки – сидячие: это характерно для некоторых видов, развивающихся на древесине, таких, как вешенка. Мицелий агариковых грибов находиться внутри субстрата [3]. В работе изучены новые культуры грибов базидиомицетов, выделенных из регионов Дальнего Востока, и введенных в Коллекцию культур БИН РАН, включающей около 3200 штаммов, в том числе 700 видов макромицетов [4]. Целью данной работы являются изучение морфолого-биохимических и ростовых свойств новых культур базидиальных грибов порядка Agaricales и отбор вариантов с наибольшей ростовой и ферментативной активностями, перспективных для их дальнейшего биотехнологического исследования.

Объектами исследования служили 22 культуры макромицетов представителей отдела Basidiomycota класса Agaricomycetes порядка Agaricales из коллекционного фонда БИН РАН.

Скорость роста грибов определяли при посеве мицелия изучаемых штаммов на среду стандартного состава – сусло-агар (2 %) на чашку Петри диаметром 60 мм. Посевы инкубировали в термостате при 25° С до полного зарастания среды мицелием, после чего был проведен еще один пересев в 2 повторностях на среду того же состава. Измерение прироста мицелия проводилось на микроскопе Axio Scope A1 (Zeiss, Germany) ежедневно [5].

Для определения протеолитической активности был использован 5% раствор желатина. Раствор разливали по чашкам Петри диаметром 90 мм. На поверхность застывшего желатина помещали диски с мицелием грибов (3 диска на чашку), выращенных на сусло-агаре, и культивировали в термостате при 25°С, через 48 часов определили диаметр зон гидролиза желатина на чашке Петри в 2-х взаимно перпендикулярных направлениях [5].

Определение целюлолитической активности (ЦА) проводили с использованием 1% раствора микрокристаллической целлюлозы, который разливали по чашкам Петри диаметром 90 мм. После застывания раствора на его поверхность помещали диски с мицелием грибов (3 диска на чашку), выращенных на сусло-агаре, и помещали в термостат на 25°С, через 48 часов в чашки Петри добавляли раствор йода (0,5% р-р I в 2% KI), определяли диаметр окрашенных в темно-коричневый цвет зон гидролиза целлюлозы [5].

Для определения оксидоредуктазной активности использовали 2 субстрата: сирингалдазин (Syringaldazine, 0,1%, Sigma) – окислительные ферменты, продуцируемые штаммом, окисляли реактив до пурпурно-красного пигмента (тетраметоксиазобисметиленхинон) и гваякол (Guaiacol, 2%, Sigma), при взаимодействии которого с окислительными ферментами, осуществлялся процесс перекисного окисления гваякола, и образовывался пигмент красно–коричневого цвета (3, 3'-диметоксидифено–2,2'-хинон) [6].

Все исследованные штаммы были введены в Коллекцию БИН РАН с использованием 3 способов хранения: 1) метода суб-культуры на скошенном сусло-агаре в пробирках; 2) дискового метода на микропробирках с дистиллированной водой; 3) метода криоконсервации на криопробирках с 10% водным раствором глицерина.

Анализ результатов скорости роста исследуемых культур показал, что их можно разделить на 3 группы (рис.1 А): культуры со средней скоростью роста (9 культур) – 2,6 мм/сут; медленно растущие (5 культур) – 1,7 мм/сут; быстрорастущие (8 культур) – 5,7 мм/сут. Наибольшей скоростью роста обладали грибы: *Agrocybe* sp., *Oudemansiella* sp., *Pleurotus citrinopileatus*; *Psathyrella candolleana*; *Coprinus disseminatus.*

При изучении активности протеолитических ферментов с использованием в качестве субстрата желатина показано, что две исследованные культуры – *Clitocybe marginella* и *Hemistropharia albocrenulata* не обладали желатиназной активностью

(ЖА). Тогда как остальные культуры проявили разную по выраженности ЖА (рис.1 В): культуры со средней ЖА (7 культур) – 24,14 мм; культуры с высокой ЖА (4 культуры) – 66,4 мм; культуры с низкой ЖА (6 культур) – 17,25 мм. Установлено, что наибольшей протеолитической активностью обладали базидиальные грибы с наибольшей скоростью роста: *Agrocybe* sp., *Oudemansiella* sp., *Pleurotus citrinopileatus*; *Psathyrella candolleana*; *Coprinus disseminatus*.

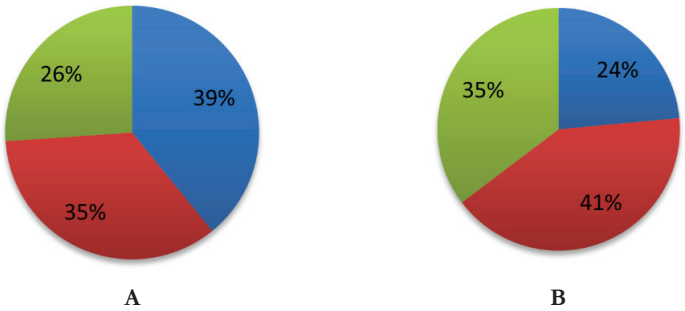


Рисунок 1. Скорость роста и желатиназная активность колоний 22 исследованных штаммов:
А – скорость роста (■ – быстрорастущие, ■ – со средней скоростью роста, ■ – медленнорастущие);
В – желатиназная активность (■ – с высокой ЖА, ■ – со средней ЖА, ■ – с низкой ЖА)

При изучении целлюлолитической активности установили, что большинство изучаемых культур обладали ЦА, кроме *Podoscypha* sp. (рис.2 А). Количество вариантов с разной степенью ЦА разделили на 3 группы: со средней ЦА (10 культур) – 22,14 мм; с высокой ЦА (4 культуры) – 30,62 мм;с низкой ЦА (7 культур) – 15,95 мм. Наибольшей активностью обладали грибы: *Agrocybe* sp., *Pleurotus citrinopileatus, Psathyrella candolleana.*

Анализ результатов оксидоредуктазной активности показал, что штаммы *Marasmiellus* sp., *Coprinus* sp. и *Megacollybia* sp., не продуцировали окислительные ферменты (рис.2 В). А наибольшей активностью обладали : *Pleurotus citrinopileatus,*. *Oudemansiella* sp.

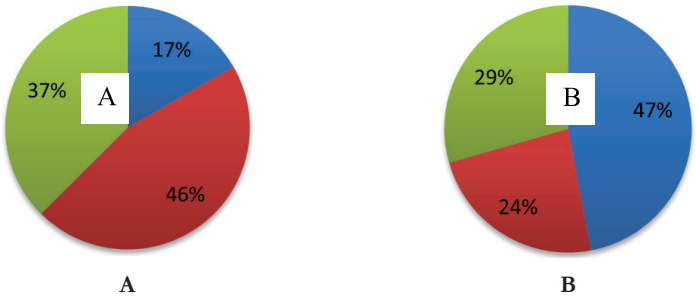


Рисунок 2. Активность целлюлолитических и окислительных ферментов 22 исследованных культур:
А – целлюлолитическая активность (■ – штаммы с высокой ЦА, ■ – штаммы со средней ЦА, ■ – штаммы с низкой ЦА);
В – активность окислительных ферментов (■ – штаммы с высокой активностью, ■ – штаммы со средней активностью, ■ – штаммы с низкой активностью)

На основании исследования культур по ростовым свойствам и активности ферментов было отобрано 5 наиболее активных культур базидиомицетов *Agrocybe* sp., *Oudemansiella* sp.; *Pleurotus citrinopileatus*; *Psathyrella candolleana*; *Coprinus disseminutus* (рис. 3).

Наибольшей скоростью роста обладали 2 культуры: *Agrocybe* sp. и *Pleurotus citrinopileatus* (рис.3). Скорость роста остальных трех изучаемых грибов находилось в среднем интервале значений. Наибольшей ЖА обладали *Oudemansiella* sp. и *Psathyrella candolleana,* а наибольшей ЦА обладали *Agrocybe* sp. и *P. citrinopileatus.* Наибольшую активность окислительных ферментов показали *Oudemansiella* sp и *P. citrinopileatus.* Изучение данного показателя было проведено с помощью качественной реакции – изменение цвета субстрата, как следствие выделения пигмента.

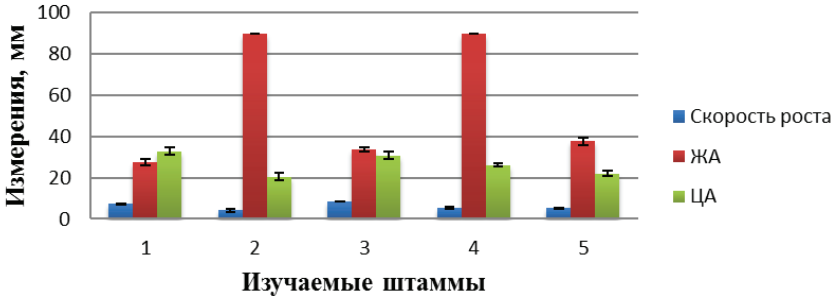


Рисунок 3. Соотношение скорости роста, желатиназной активности и целлюлолитической активности исследованных вариантов (1 – *Agrocybe* sp., 2 – *Oudemansiella* sp., 3 – *Pleurotus citrinopileatus,* 4 – *Psathyrella candolleana,* 5 – *Coprinus disseminutus*)

На рисунке 4 представлена динамика роста 3-х наиболее активных штаммов: *Oudemansiella* sp., *Pleurotus citrinopileatus* и *Agrocybe* sp.

Наиболее высокую скорость роста продемонстрировали 2 варианта (*P. citrinopileatus*, *Agrocybe* sp.), но в тоже время у *Oudemansiella* sp. согласно рисунку 3 наиболее высокая протеолитическая активность. Все 3 культуры представляют интерес для их дальнейшего исследования: таксономической верификации штаммов с применением молекулярно-генетических методов, глубинного культивирования для определения выхода целевого продукта, выделения и очистки БАВ.

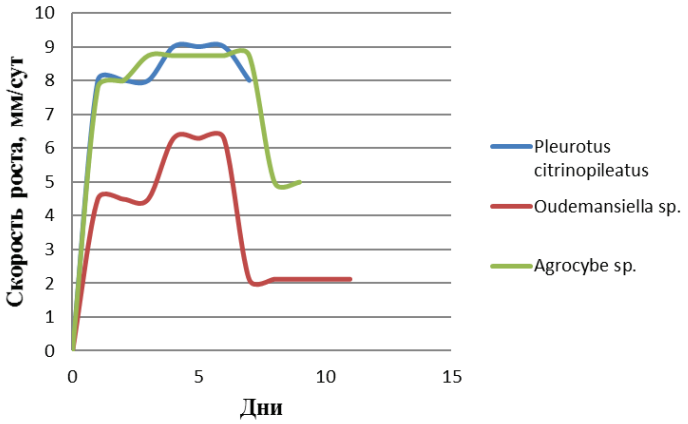


Рисунок 4. Графики скорости роста *Oudemansiella* sp., *Pleurotus citrinopileatus*, *Agrocybe* sp.

Таким образом, культуры с высокой скоростью роста обладали и наибольшей ферментативной активностью. Показатель скорости роста культуры продуцента является основополагающим для использования его в качестве объекта в биотехнологическом производстве. Культуры, обладающие высокой целлюлолитической и протеолитической активностями, перспективны как продуценты БАВ при культивировании на экономически-выгодных субстратах. Например, с помощью ферментативного комплекса целлюлаз культуры грибов расщепляют целлюлозу до глюкозы, которая используется в качестве источника энергии. Протеолитические ферменты катализируют гидролиз пептидных связей (CO-NH) белков, которые в ходе реакции распадаются на свободные аминокислоты (АК), используемые в качестве источника органического азота. Оксидоредуктазы катализируют реакции биологического окисления, которые являются незаменимыми в процессе жизнедеятельности грибов.

Была проведена микроскопия 3 исследованных культур – *Oudemansiella* sp., *Pleurotus citrinopileatus*, *Agrocybe* sp., которая подтвердила принадлежность данных вариантов к отделу Basidiomycota (рис. 5). Были обнаружены признаки базидиальных грибов: наличие многоядерного мицелия с перегородками, пряжек – тонких одноклеточных выростов, примыкающих к другой соседней клетке, способных образовывать дикариотическую клетку.

A **B** **C**

Рисунок 5. Микроморфология грибов: A – *Pleurotus citrinopileatus,* B – *Agrocybe* sp., C – *Oudemansiella* sp.

В результате скрининга 22 культур грибов – представителей отдела Basidiomycota класса Agaricomycetes порядка Agaricales, были изучены: скорость роста, микро- и макроморфологические признаки, а также активности протеолитических, целлюлолитических и окислительных ферментов. В ходе анализа по совокупности их биологических характеристик были выявлены наиболее активные штаммы – *Oudemansiella* sp., *Pleurotus citrinopileatus*, *Agrocybe* sp., представляющие интерес для дальнейших исследований в качестве перспективных продуцентов биологически активных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Огарков БН, Огаркова ГР, Самусенок ЛВ. Микро и макромицеты как основа биотехнологических препаратов. Известия Иркутского государственного университета. Сер. Биология, Экология. 2010:12 .

2. Molitoris HP. Mushrooms in medicine. *Folia Microbiol.* 1994;39:91-98;

3. Змитрович ИВ, Фирсов ГФ, Бондарцева и др. Базидиомицеты – возбудители хронических гнилей деревьев Ботанического сада Петра Великого Ботанического института имени В. Л. Комарова РАН: диагностика, биология, распределение по территории. Hortus botanicus. 2018;13:182–204

4. Псурцева НВ, Белова НВ, Алехина ИА. Биотехнологические возможности использования коллекции культур базидиомицетов. Биотехнология. 1994;7:35–39.

5. Дудка ИА и др. Методы экспериментальной микологии: справочник. 1982.

6. Gorbatova ON, Koroleva OV, Landesman EO et al. Increase of the detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis. Applied Biochemistry and Microbiology. Res. 2006;42(4):414–419.

SUMMARY

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF SOME AGARIC BASIDIOMYCETES

Ilicheva E.S., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

22 cultures of fungi – representatives of the Basidiomycota division of the Agaricomycetes class of the order Agaricales were screened for growth rate, micro-and macromorphological features, as well as the activity of proteolytic, cellulolytic and oxidative enzymes. Based on the analysis of the obtained results, the most active cultures were selected for further study of their biotechnological potential.

Key words: *growth rate, oxidasational activity, gelatinase activity, syringaldazine, guaiacol, producers of biologically active substances.*

REFERENCES

1. Ogarkov BN, Ogarkova GR, Samusenok LV. Micro and macromycetes as the basis of biotechnological preparations. Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser. Biology, Ecology. 2010:12 (In Russ).

2. Molitoris HP. Mushrooms in medicine. *Folia Microbiol.* 1994;39,91-98;

3. Zmitrovich IV, Firsov GF, Bondartseva MA, et al. Basidiomycetes-pathogens of chronic tree rot in the Peter the Great Botanical Garden of the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences: diagnostics, biology, distribution by territory. Hortus botanicus. 2018;13:182-204. (In Russ)

4. Psurtseva NV, Belova NV, Alyokhina IA. Biotechnological possibilities of using the collection of basidiomycete cultures. 1994;7:35-39. (In Russ)

5. Dudka IA et al. Methods of experimental mycology: handbookunder total. 1982. (In Russ)

6. Gorbatova ON, Koroleva OV, Landesman EO et al. Increase of the detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis. Applied Biochemistry and Microbiology. Res. 2006;42(4):414–419.

РИСК-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН

Исаева А.А., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Топкова О.В.**, канд. биолог. наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: anna.isaeva@spcpu.ru

Вакцины являются основным методом борьбы с инфекционными заболеваниями. Специфика вакцин требует особого подхода к их разработке и производству. В данной статье рассматриваются особенности вакцин и возможность применение риск ориентированного подхода в рамках концепции QbD к их разработке.

Ключевые слова: *разработка вакцин, риск-ориентированный подход, Quality by Design.*

Вакцинация является самым эффективным способом предотвращения многих инфекционных заболеваний, которые могут приводить к инвалидности и летальному исходу. Разработка вакцин позволила многократно снизить количество случаев заражения тяжелыми заболеваниями, такими как корь, оспа, краснуха, полиомиелит, что существенно повысило уровень жизни странах, где проводится вакцинация [1-3]. По данным всемирной организации здравоохранения, вакцинация позволяет предотвратить 2-3 миллиона смертельных случаев в год [4]. Однако, появление новых заболеваний, мутации и изменчивость существующих возбудителей вынуждают компании по всему миру разрабатывать новые вакцины для предотвращения глобальных эпидемий. Недавняя пандемия коронавирусной инфекции показала значимость вакцин для современного общества, и, возможно, это послужит новым толчком для развития этой области.

Несмотря на очевидную пользу вакцин, существует риск появления побочных эффектов. Уменьшение распространенности заболеваний, против которых проводится вакцинация, переводит внимание общества на побочные эффекты вакцин [5]. Страх перед возможным негативными последствиям применения вакцин может сыграть определенную роль в уменьшении обхвата вакцинации, тем самым увеличивая риск возникновения заболеваний, с которыми успешно бо-

ролись в последние несколько десятилетий. Поэтому производителям при разработке вакцин необходимо руководствоваться современным концепциями (например, Quality by Design) и применять риск-ориентированный подход.

Производство вакцин – сложный биотехнологический процесс, отличающийся высокой вариабельностью. Кроме того, вакцины плохо поддаются стандартизации по сравнению с лекарствами, полученными химическим синтезом, или даже с другими продуктами биотехнологии (например, моноклональными антителами) [6]. Это связано с тем, что вакцина зачастую содержит в себе либо целые клетки или их компоненты, точный состав которых сложно охарактеризовать.

Сложность состава продукта и вариабельность процесса производства, а также высокая общественная значимость вакцин обуславливают необходимость применения риск-ориентированного подхода при разработке в рамках концепции Quality by Design. Такой подход позволит не только производить качественный и безопасный продукт, но также повысить доверие общественности к вакцинации. В данной работе будет рассмотрены основные принципы риск-ориентированного подхода при разработке вакцин.

Целью данной работы является рассмотрение возможности применения риск-ориентированного подхода при разработке вакцин. Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

1) Изучить основные особенности вакцин;

2) Рассмотреть основные принципы риск-ориентированного подхода;

3) Выявить основные преимущества, получаемые при применении риск-ориентированного подхода к разработке вакцин.

Особенности производства вакцин. Вакцины – иммунобиологические лекарственные препараты, которые содержат компоненты, вызывающие при введении человеку активный специфический иммунный ответ к антигенам микроорганизма. В качестве активного компонента вакцины могут содержать живые или аттенуированные микроорганизмы (бактерии или вирусы) или их антигенные компоненты (белки и/или полисахариды) [7].

Разработка и производство вакцин имеют свои особенности. Во-первых, вакцины часто предназначены для иммунизации здоровых людей (в том числе и детей), поэтому к ним предъявляют повышенные требования к отсутствию побочных эффектов. Во-вторых, в отличие от других лекарственных препаратов, обладающих определенной активностью и нацеленных на конкретную мишень, вакцины способны вызывать иммунный ответ, и не обладают никакой другой активностью. В-третьих, при производстве вакцин необходимо учитывать патогенность применяемых микроорганизмов и организовывать работу в соответствии с требованиями регуляторных органов. В-четвёртых, в большинстве случаях вакцины производят в виде инъекций, поэтому к ним предъявляют требование стерильности, оценка которой может быть затруднена в случае живых вакцин. В-пятых, для сохранения качества и безопасности вакцин необходимо соблюдать определенные условия хранения, в том числе – температурный режим. Рассмотрим некоторые из особенностей подробнее.

Требования к безопасности. Безопасности вакцин уделяется большое внимание, как со стороны производителей, отслеживающих возможные побочные эффекты, так и со стороны государства. Однако, контроль обусловлен не столько распространенностью эффектов, сколько высокой социальной значимостью вакцин. Большая часть возможных побочных эффектов после вакцинации, такие как повышение температуры, покраснение и отек в месте инъекции и некоторые другие, являются нормальной реакцией организма на введение инородного агента и проходят в течение нескольких дней. Тяжелые случаи встречаются редко и чаще всего обусловлены аллергическими реакциями на компоненты вакцины [8]. Так, например, распространенной является аллергическая реакция на альбумин, входящий в состав некоторых вакцин. Производителю при разработке следует учитывать аллергенность компонентов и, по возможности, исключать такие составляющие и предупреждать пациентов о возможных аллергических реакциях.

Патогенность микроорганизмов. Производство вакцины в большинстве случаев связано с культивированием и работой с возбудителем заболевания, против которого производится вакцина. При работе с ними для избежание заражения персонала, выброса инфекционного агента в окружающую среду на производстве и в лабораториях необходимо соблюдать особые правила, установленные СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

В соответствии с этими требованиями, к работе с патогенными биологическими агентами допускаются только специалисты с высшим или средним специальным инженерно-техническим образованием. Необходима строгая система отслеживания здоровья сотрудников. Особые требования предъявляются к производственным и лабораторным помещениям. Все работы должны проходить в боксах биобезопасности или специально оборудованных зонах. Все отходы производства в обязательном порядке инактивироваться для исключения возможности попадания патогенного биологического агента в окружающую среду.

Отсутствие посторонней контаминации. Важной составляющей безопасности вакцин является отсутствие в конечном продукте посторонней микрофлоры, которая может быть обусловлена использованием загрязненных вспомогательных веществ, питательных сред или несоблюдением асептичности процесса культивирования. Однако, классическое определение стерильности как полное отсутствие живых микроорганизмов плохо применимо к вакцинам, которые содержат живые клетки. Так что под стерильностью, в данном случае, следует понимать отсутствие посторонних микроорганизмов. Это особенно важно, в связи с тем, что на данный момент, несмотря на наличие неинвазивных вариантов доставки, большая часть вакцин вводятся в кровь инъекционно. В таком случае, наличие посторонней микрофлоры может привести не только к снижению эффективности вакцин, но и к нежелательным побочным реакциям у пациентов.

Стоит отметить, что в современном российском законодательстве касательно живых вакцин существует неопределенность в отношении такого показателя качества как стерильность. Так, Государственная фармакопея предъявляет к вакцинам требование отсутствия микроорганизмов-контаминантов, однако, не предлагает методов их определения [9].

Хранение вакцин. Компоненты вакцины являются биообъектами и поэтому чувствительны к изменениям температуры. Вакцины, содержащие живые бактерии или вирусы, могут быстрее терять свою иммуногенность при хранении при повышенной температуре по сравнению с вакцинами, состоящими из белковых и полисахаридных антигенов. Однако, последние более чувствительны к замораживанию из-за наличия в их составе адъювантов (например, солей алюминия, которые могут разрушаться при замораживании) [10]. В связи с этим, при производстве, транспортировке и хранении вакцин необходимо соблюдать определенный температурный режим. По данным Всемирной организации здравоохранения, почти четверть вакцин не соответствуют заявленным требованиям безопасности из-за нарушений правил хранения при перевозке [11]. Система, обеспечивающая подходящую температуру на протяжении всего жизненного цикла вакцины, получила название холодовая цепь.

Производители вакцин стараются улучшить термостабильность вакцин при хранении для того, чтобы снизить возможные риски для пациента.

Риск-ориентированный подход. Риск-ориентированный подход, реализованный в рамках концепции Quality by Design позволяет стабильно получать продукт с заданными характеристикам. Использование риск-ориентированного подхода предполагает оценку рисков и предотвращение возможных их последствий еще на стадии разработки. Благодаря этому подходу становится возможно определить характеристики, которым должен соответствовать продукт, оценить критичность различных параметров процесса и характеристик сырья для выявления тех, что оказывают наибольшее влияние на качество конечного продукта [12]. Выявление таких характеристик может проходить с помощью различных инструментов и методов, таких как анализ видов и последствий отказов (FMEA), анализ видов последствий и критичности отказов (FMECA), анализ дерева отказов (FTA), диаграммы «причины и следствия» (диаграмма Исикавы) и др.

Дальнейшая оценка возможных рисков должна учитывать влияние потенциальных отклонений параметров процесса и характеристик сырья на критически параметры качества. На ранних этапах разработки выделение наиболее значимых рисков позволяет выделить наиболее существенные отклонения и направить усилия разработчиков на их предотвращение. В последствии, с получением информации о процессе и продукте при разработке результаты анализа рисков, полученные ранее могут и должны быть пересмотрены. Стоит учесть не только возможное влияние на критические параметры качества, но также вероятность возникновения подобных отклонений и возможность обнаружить отклонения до того, как оно окажет существенное влияние на качество. По результатам оценки все критериев, для каждого параметра рассчитывается общий коэффициент риска и на основе сравнения коэффициентов у разных параметров выявляют наиболее критичные, которым в дальнейшем и будет уделено основное внимание [13].

Как можно заметить из всего сказанного ранее, разработка и производство вакцин – это сложный и комплексный процесс, требующий принимать во внимание множество факторов. Даже небольшие отклонения могут привести к значительным последствиям. Применение риск-ориентированного подхода при разработке вакцин может позволить не только получить продукт высокого качества, но и предотвратить возможные случаи брака до их появления. Кроме того, процесс разработки крайне длительный и дорогостоящий, и своевременная оценка риска на этапе разработки может позволить грамотно распределить усилия команды разработчиков, более тщательно изучая именно те параметры и возможности, которые могут привести к нарушениям качества. Также комплексный анализ на ранних этапах позволит упростить процесс пострегистрационного изучения, так как, зная возможные риски, могут быть спланированы варианты решения.

Наибольшую пользу риск-ориентированный подход может принести при реализации в качестве составной части концепции Quality by Design. Quality by Design – это систематический подход к разработке, основанный на надежных научных данных и управлении рисками по качеству, который начинается с предопределенных целей и улучшает понимание продукта и процесса, а также контроля производственного процесса [14]. Основными целями этой концепции при разработке фармацевтического препарат являются: 1. достижение необходимых характеристик качества продукта, основанных на клинических показателях; 2. уменьшение вариабельности процесса и брака за счет лучшего понимания продукта и процессов производства; 3. повышение эффективности разработки и производства продукта; 4. улучшение анализа первопричин отклонений показателей качества и управление изменениями в течение всего жизненного цикла продукта [15]. Оценка рисков является важным шагом для определения связи между критических показателей качества и характеристикам процесса и свойствами сырья.

Вакцины как биотехнологический продукт имеют свои особенности, во многом связанные с использованием в производстве живых патогенных микроорганизмов или их компонентов. Эти особенности значительно усложняют процесс разработки и производства вакцин. Однако применение риск-ориентированного подхода, основной задачей которого является предотвращение возможных рисков еще до их возникновения, и концепции Quality by Design позволяет более полно проработать возможные риски и понять конечный продукт. Нацеленность на безопасность приводит к получению высококачественной и безопасной продукции, что необходимо для поддержания здоровья людей и доверия общества к вакцинации.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. *Measles.* Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/measles [Accessed 10 March 2021].

2. World Health Organization. *Poliomyelitis.* Available at: //www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis [Accessed 10 March 2021].

3. World Health Organization. *Rubella.* Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rubella [Accessed 10 March 2021].

4. World Health Organization. *Vaccines and immunization.* Available at: https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1 [Accessed 10 March 2021].

5. Dubé E, Laberge C, Guay M, Bramadat P, Roy R, Bettinger JA. Vaccine hesitancy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2013;9(8):1763–1773. doi:10.4161/hv.24657.

6. CMC-Vaccines Working Group. *A-VAX: Applying Quality by Design to Vaccines.* Available at: https://www.dcvmn.org/IMG/pdf/a-vax-applying-qbd-to-vaccines_2012.pdf [Accessed 10 March 2021].

7. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 2. ОФС.1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины». Доступно по: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/733/index.html/.

8. Kelso JM, Greenhawt MJ, Li JT, Nicklas RA, Bernstein DI, Blessing-Moore J, Wallace D. Adverse reactions to vaccines practice parameter 2012 update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;130(1):25–43. doi:10.1016/j.jaci.2012.04.003.

9. Суханова СМ, Саяпина ЛВ, Бердникова ЗЕ, Тихонова АС, & Климов ВИ. Проблемы оценки «стерильности» живых бактериальных вакцин. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;3:87-93. doi: 10.21055/0370-1069-2019-3-87-93.

10. Kurzątkowski W, Kartoğlu Ü, Staniszewska M, Górska P, Krause A, & Wysocki MJ. Structural damages in adsorbed vaccines affected by freezing. *Biologicals*. 2013;41(2):71–76. doi:10.1016/j.biologicals.2011.10.011.

11. World Health Organization. *Effective vaccine management. Global Data Analysis 2009-2018*. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/immunization/supply-chain/evm-global-data-analysis-2010-2018-en.pdf?sfvrsn=9113352_5 [Accessed 10 March 2021].

12. ICH Q9 Quality risk management [Electronic edition]. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-3.pdf [Accessed 10 March 2021].

13. Chang L, Blue JT, Schaller J, Phelan L, Khandke L, Green BA. Applicability of QbD for Vaccine Drug Product Development. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series [Internet]. Springer New York, 2015:437–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2316-8_19.

14. ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development [Electronic edition]. Available at: http://www.ema.europe.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development [Accessed 10 March 2021].

15. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, Woodcock J. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *The AAPS Journal*. 2014;16(4):771–783. doi:10.1208/s12248-014-9598-3/

SUMMARY

RISK-BASED APPROACH TO VACCINE DEVELOPMENT

Isaeva A.A., 2st year MS student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Vaccines are the main method of prevention infectious diseases. The specificity of vaccines requires a special approach to their development and manufacturing. This article examines the features of vaccines and the possibility of applying a risk-based approach within the framework of the QbD concept to their development.

Key words: *vaccine development, risk-based approach, Quality by Design.*

REFERENCES

1. World Health Organization. *Measles.* Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/measles [Accessed 10 March 2021].

2. World Health Organization. *Poliomyelitis.* Available at: //www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis [Accessed 10 March 2021].

3. World Health Organization. *Rubella.* Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rubella [Accessed 10 March 2021].

4. World Health Organization. *Vaccines and immunization.* Available at: https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1 [Accessed 10 March 2021].

5. Dubé E, Laberge C, Guay M, Bramadat P, Roy R, Bettinger JA. Vaccine hesitancy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2013;9(8):1763–1773. doi:10.4161/hv.24657.

6. CMC-Vaccines Working Group. *A-VAX: Applying Quality by Design to Vaccines.* Available from: https://www.dcvmn.org/IMG/pdf/a-vax-applying-qbd-to-vaccines_2012.pdf [Accessed 10 March 2021].

7. State Pharmacopeia of the Russian Federation XIV edition. Vol. 2. OFS.1.7.1.0004.15 «Vakciny i anatoksiny». [Electronic edition]. Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/733/index.html/ (in Russ).

8. Kelso JM, Greenhawt MJ, Li JT, Nicklas RA, Bernstein DI, Blessing-Moore J, Wallace D. Adverse reactions to vaccines practice parameter 2012 update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;130(1):25–43. doi:10.1016/j.jaci.2012.04.003.

9. Sukhanova SM, Sayapina LV, Berdnikova ZE, Tikhonova AS, Klimov VI. Problems of Assessment of Live Bacterial Vaccine Sterility. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;3:87-93. doi: 10.21055/0370-1069-2019-3-87-93 (in Russ).

10. Kurzątkowski W, Kartoğlu Ü, Staniszewska M, Górska P, Krause A, & Wysocki MJ. Structural damages in adsorbed vaccines affected by freezing. *Biologicals*. 2013;41(2):71–76. doi:10.1016/j.biologicals.2011.10.011.

11. World Health Organization. *Effective vaccine management. Global Data Analysis 2009-2018*. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/immunization/supply-chain/evm-global-data-analysis-2010-2018-en.pdf?sfvrsn=9113352_5 [Accessed 10 March 2021].

12. ICH Q9 Quality risk management [Electronic edition]. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-3.pdf [Accessed 10 March 2021].

13. Chang L, Blue JT, Schaller J, Phelan L, Khandke L, Green BA. Applicability of QbD for Vaccine Drug Product Development. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series [Internet]. Springer New York; 2015:437–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2316-8_19.

14. ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development [Electronic edition]. Available at: http://www.ema.europe.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development [Accessed 10 March 2021].

15. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, Woodcock J. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *The AAPS Journal*. 2014;16(4):771–783. doi:10.1208/s12248-014-9598-3/

МОДИФИКАЦИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ

Караваева Л.И., асп. 3 года обучения
Руководитель: **Глазова Н.В.**, канд.хим.наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14 Российская Федерация
E-mail: Lolita.Karavaeva@spcpu.ru

Целью настоящей работы является модификация гидролитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя для разработки сорбционно-хроматографического метода выделения и очистки.

Для проведения модификации гидролитических ферментов из экстракта поджелудочной железы северного оленя предварительно были изучены условия получения комплекса протеолитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя с использованием сорбционно-хроматографичского метода на сорбентах различной структуры. Показана возможность стабилизации ферментов с использованием наносителей в процессе выделения. Выявлено оптимальное соотношение фермент и наноноситель. Полученные данные могут быть использованы при выделении протеаз из поджелудочной железы северного оленя

Ключевые слова: *поджелудочная железа, северный олень, экстракт, гидролитические ферменты, сорбция, стабилизация, циклодекстрины.*

В настоящее время пищеварительные ферментные препараты одни из самых востребованных на российском рынке. Одним из таких препаратов, получаемых из крупного рогатого скота (КРГ) является «Химопсин» (ОАО Самсон-Мед)-комплекс протеаз, состоящий из смеси химотрипсина и трипсина. Ввиду большой востребованности ферментов, актуальным является получения не только из КРГ, но и из органов северного оленя (СО). В настоящее время в районнах крайнего севера России широко распространено оленеводство, поэтому актуальной задачей является поиск методов выделения и очистки ферментных препаратов из поджелудочной железы северного оленя.

Объектами исследования являются: модельный раствор препарата: Химопсин (ООО Самсон-Мед.), экстракт поджелудочные железы северного оленя.

В работе использовались сорбенты различных структур фирмы Purolite (Сульфокатиониты, Карбоксильный катиониты, Аниониты, Неионогенный сорбенты).

Концентрацию общего белка в растворе определяли по методу Лоури с помощью реактива Фолина-Чиокальтеу [1]. В основе определения протеолитической активности лежит модифицированный метод Кунитца. [2] Для изучение компонентного состава экстракта применялся метод гель-хроматографического анализа.

Известно, что в поджелудочной железе крупного рогатого скота, протеазы находятся ввиде неактивных форм (зимогенов). Поэтому для получения конечного продукта требуется дополнительная стадия активации. Сравнительный анализ препарата «Химопсин» (ОАО Самсон–Мед) и экстракта поджелудочной железы СО показал, что протеолитические ферменты в экстракте поджелудочной железы СО находятся в активной форме, что может привести к снижению их активности на стадии выделения и очистки [3]. Поэтому перед проведением работы проводилась стабилизация протеаз путём наноструктурирования с циклодекстринами.

В процессе изучения сорбционных процессов на модельном растворе в статических и динамических условиях на сорбентах различной структуры показало, что наиболее эффективным сорбентом для дальнейшего изучения параметров сорбции в динамических условиях – сультфокатионит Purolite-C150 [3].

Для предотвращения потери активности ферментов было изучено влияние различных соотношений циклодекстринов на стабильность исследуемых ферментов при различных условиях: при комнатной температуре и на холоду [4]. Эксперементальные данные показали, что оптимальным соотношением фермент и наноноситель является соотношение 1:0,5 так как при таком соотношении через час протеолитическая активность как на холоду, так и при комнатной температуре увеличивается в 1,7 раз.

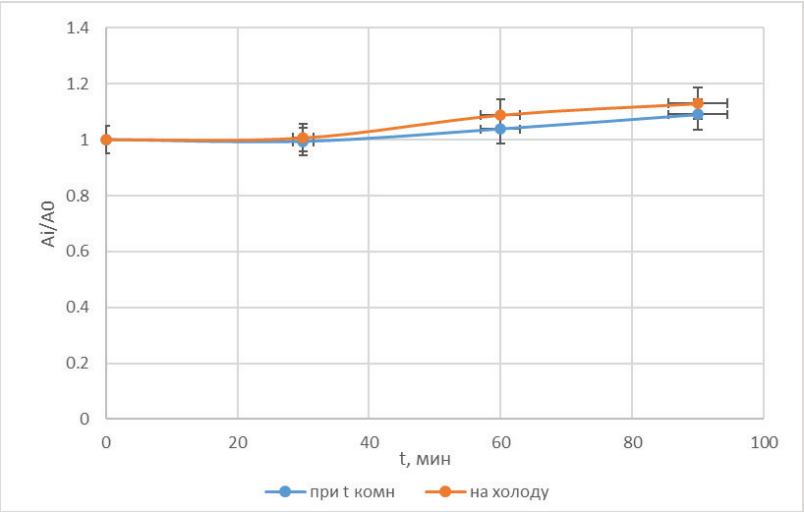


Рисунок 1. Влияние циклодескстринов на стабильность протеолитических ферментов в соотношении 1:0,5

Изучение процессов сорбции и десорбции протеаз из экстракта поджелудочной железы северного оленя проводили на оптимальном сорбенте Purolite-C150 в присутствии циклодекстринов. По полученным данным был рассчитан выход по белку на стадии десорбции, и построена выходная кривая сорбции и десорбции протеаз из экстракта на сорбенте Purolite-C150 в присутствии циклодекстринов.

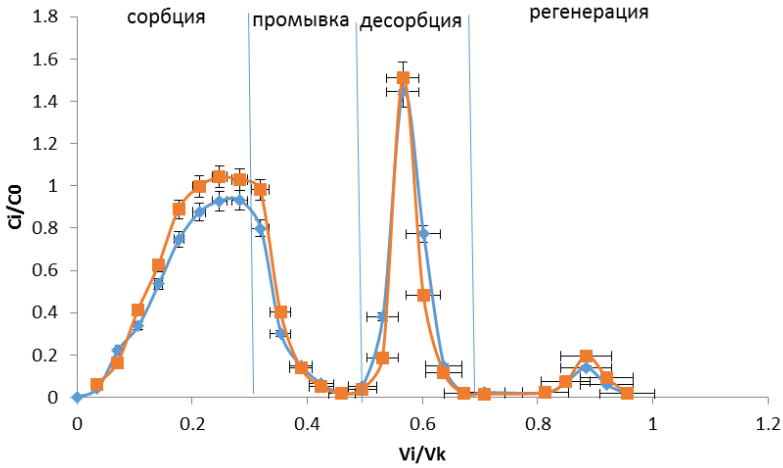


Рисунок 2. Выходная кривая сорбции и десорбции протеаз из экстракта на сорбенте Purolite-C150 в присутствии циклодекстринов

По данным рисунка 2 видно, выход по белку на стадии десорбции составляет 85%, выход по протеолитической активности составил 79%.

На данный момент продолжаются работы по изучению процессов сорбции и десорбции протеаз из экстракта поджелудочной железы СО на оптимальных сорбентах в присутствии циклодекстринов.

В результате работы показано, что в отличие от экстракта КРГ в экстракте поджелудочной железы СО протеазы находятся в активной форме, что может приводить к снижению их активности в процессе хроматографической очистки. Поэтому была проведена стабилизация протеаз с помощью циклодекстринов. Выявлено оптимальное соотношение фермент и наноноситель – соотношение 1:0,5.

Изучение процессов сорбции и десорбции протеаз из экстракта поджелудочной железы северного оленя на оптимальном сорбенте Purolite-C150 проводили в присутствии циклодекстринов. Было показано: выход по белку на стадии десорбции составляет 85%, выход по протеолитической активности составил 79%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;V.193(1):265-275.
2. Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin ingibitor. 1974:291-300.
3. Караваева Л.. Подбор Сорбентов для разработки сорбционного метода для выделения и очистки комплекса протеаз из поджелудочной железы северного оленя. Сборник материалов IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием конф. «Молодая Фармация – Потенциал будущего», 22-23 апреля 2019 г., СПб.: СПХФУ, 2019:403-406
4. Капустин МА. Методы получения нанокомплексов биологически активных веществ с циклическими олигосахаридами, анализ их физико- химических свойств и использование в пищевом производстве. Труды Белорусского государственного университета. Минск. 2016;11(11)

SUMMARY

SELECTION OF SORBENTS FOR THE DEVELOPMENT OF SORPTION METHOD FOR ISOLATION AND CLEANING OF THE COMPLEX OF THE PROTEASIS FROM THE PANCULAR GLAND OF THE NORTHERN DEER

Karavaeva L.I., 3th year post graduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The conditions for obtaining a complex of proteolytic enzymes from the extract of the pancreas of a reindeer using the sorption-chromatographic method were studied on sorbents of various structures. The possibility of their stabilization using carriers in the process of isolation was shown. The optimal ratio of enzyme and nanocarrier was revealed.

Key words: *pancreas, reindeer, extract, sorption. поджелудочная железа, северный олень, hydrolytic enzymes, sorption, stabilization, cyclodextrins.*

REFERENCES

1. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;V.193(1):265-275.
2. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin ingibitor. 1974: 291-300.
3. Karavaeva LI Selection of sorbents for the development of a sorption method for the isolation and purification of a complex of proteases from the pancreas of a reindeer. Proceedings of the IX All. Russian Scientific Conference of Students and Postgraduates with International Participation Conf. « Young Pharmacy – Potential of the Future», April 22-23, 2019, Saint Petersburg : SPHFU, 2019.: 403-406
4. Kapustin MA. Methods of obtaining nanocomplexes of biologically active substances with cyclic oligosaccharides, analysis of their and chemical properties and use in food production. M.A. Kapustin, A.S. Chubarova, T.N. Golovach, V.G. Tsygankov, A.M., Bondaruk, V.P. Kurchenko. Proceedings of the Belarusian State University. Minsk, 2016;11(11).

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ СОРБЦИИ КОКАРБОКСИЛАЗЫ НА СОРБЕНТАХ РАЗЛИЧНОГО ТИПА

Кованева А.В., студ. 4 курса, **Холодаева С.В.**, студ. 3 курса
Руководитель: **Красовицкая И.А.**, ст. преп. кафедры биотехнологии
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: kovaneva.anna@pharminnotech.com

В работе представлены результаты экспериментов по изучению динамической сорбции кокарбоксилазы на сорбентах КУ-23 и Aberlite HPR1100Na. Показано, что сорбент Aberlite HPR1100Na обладает более высокой емкостью сорбции при высоте слоя сорбента в колонке 10 мм. Десорбция кокарбоксилазы не была эффективной при всех вариантах условий (скорости пропускания раствора через колонку и высоте слоя сорбента), что говорит о необходимости подбора более эффективного элюента, чем используемый согласно традиционной технологии.

Ключевые слова: *кокарбоксилаза, тиаминдифосфат, сорбция, КУ-23.*

Кокарбоксилаза (тиаминдифосфат, ТДФ, тиаминпирофосфат, ТПФ) – органическое гетероциклическое соединение, содержащее два кольца – пиримидиновое и тиазоловое, соединенных метиленовой связью (рис. 1).

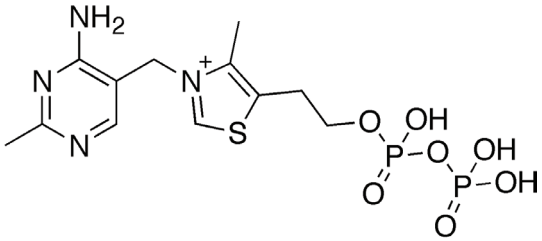


Рисунок 1. Структурная формула кокарбоксилазы (тиаминдифосфата, тиаминпирофосфата)

Обе кольцевые системы синтезируются отдельно в виде фосфорилированных форм, затем объединяются через четвертичный атом азота.

Тиаминдифосфат – это активная форма витамина В1 (тиамина). ТДФ является составной часть минимум 5 ферментов, участвующих в промежуточном обмене веществ.

В организме человека тиаминдифосфат образуется в результате реакции фосфорилирования тиамина при участии тиаминпирофосфокиназы путем переноса пирофосфатной группировки от АТФ.

ТПФ входит в состав двух сложных ферментных систем – пируват - и α – кетоглутарат дегидрогеназных комплексов, катализирующих окислительное декарбоксилирование пировиноградной и α-кетоглутаровой кислот. Также он является коферментом транскетолазы - фермента пентозофосфатного пути. В ее составе ТПФ участвует в переносе гликоальдегидного радикала от кетосахаров на альдосахара. В составе дегидрогеназы разветвленных α-кетокислот, ТПФ участвует в катаболизме лейцина, валина, изолейцина.

Препарат Кокарбоксилаза выпускается в форме кокарбоксилазы гидрохлорида (ККГХ). ККГХ применяют в виде раствора внутримышечно или внутривенно при сахарном диабете, нарушениях сердечного ритма, недостаточности коронарного кровообращения, лёгких формах рассеянного склероза [1]. Кокарбоксилаза применяется преимущественно в составе комплексной терапии и способствует образованию ацетил-кофермента А, а также регулирует углеводный обмен [2].

При производстве кокарбоксилазы используется химический синтез. Традиционная технология, неизменная с 70-х годов прошлого века, основана на обработке витамина В1 (тиамина) хлорокисью фосфора или смесью пирофосфорной кислоты и фосфорного ангидрида с последующим получением смеси эфиров (моно-, ди- и трифосфорных), которые разделяют хроматографическим методом на сорбенте КУ-23 [3, 4]. Данная технология характеризуется малым выходом целевого продукта [5].

Следует отметить, что сульфокатионит КУ-23, используемый на стадии сорбции, в настоящее время не выпускается в промышленных масштабах на территории Российской Федерации, и его поставки на территорию страны затруднены. В связи с тем, что на современном рынке представлено большое разнообразие эффективных сорбентов, перспективным направлением является поиск замены труднодоступному и малоэффективному КУ-23.

Ранее на кафедре биотехнологии были проведены исследования процесса сорбции кокарбоксилазы на сорбентах различного типа в статических условиях [6]. Сорбенты, показавшие наилучшие результаты по емкости, избирательности и скорости процесса сорбции, были отобраны для дальнейших исследований: сильнокислотный катионит Aberlite HPR1100Na, хелатный сорбент S950 и сульфокатионит на основе сверхсшитого полистирола MN500. Эти сорбенты намного превзошли КУ-23 по перечисленным показателям.

Целью данной работы является изучение процесса динамической сорбции кокарбоксилазы на отобранных сорбентах для разработки технологии сорбционно-хроматографической очистки, способной заменить традиционную.

Для изучения зависимости емкости сорбции от значения pH была проведена серия экспериментов в статических условиях при значениях pH модельного раствора кокарбоксилазы от 0 до 4. Эксперименты проводили на сорбентах КУ-23 и Aberlite HPR1100Na в соотношении 2 мг на 1 мл раствора. Емкость статической сорбции рассчитывали как разность исходной и равновесной концентрации кокарбоксилазы в растворе, отнесенную к массе навески сорбента, с учетом объема раствора.

Сорбцию кокарбоксилазы из модельного раствора на КУ-23 в динамических условиях проводили на лабораторной колонке диаметром 12 мм при температуре 20-22°С и pH = 0. Промывку сорбента после сорбции осуществляли раствором 1н. HCl. Для десорбции в качестве элюента, опираясь на традиционную технологию, использовали ацетатный буферный раствор (pH = 5.5). Было проведено 9 опытов при высоте слоя сорбента 10, 32, 42 мм и следующих значениях скорости протекания раствора через колонку: 0.75 мл/мин при сорбции и промывке, 0.375, 0.75, 1.5 мл/мин при десорбции. Объем отбираемых фракций составлял 2 мл при сорбции и промывке и 1 мл при десорбции. Емкость динамической сорбции рассчитывали по следующей формуле:

$$Q = \frac{C_{исх} * V_{общ} - (C_1 + C_2 + ... + C_n) * V_{фр}}{n}$$

где Q – емкость динамической сорбции;

$C_{исх}$ – концентрация исходного раствора кокарбоксилазы, мг/мл;

$V_{общ}$ – общий объем пропускаемого раствора кокарбоксилазы, мл;

C_1 ... C_n – концентрация кокарбоксилазы в отобранных фракциях, мг/мл;

$V_{фр}$ – объем фракции, мл;

n – масса навески сорбента, г.

Аналогичный эксперимент был проведен с сорбентом Aberlite HPR1100Na при высоте слоя сорбента 10 мм, скорости сорбции и промывки 0.75 мл/мин, скорости десорбции 0.375 мл/мин.

Для определения концентрации кокарбоксилазы во всех исследуемых растворах проводили разведение пробы в 400 раз цитратным буферным раствором с pH = 1.1, после чего измеряли оптическую плотность разведенного раствора на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 245 нм.

Для подбора условий проведения динамической сорбции была изучена зависимость емкости сорбции кокарбоксилазы на сорбентах КУ-23 и Aberlite HPR1100Na от pH раствора в статических условиях. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

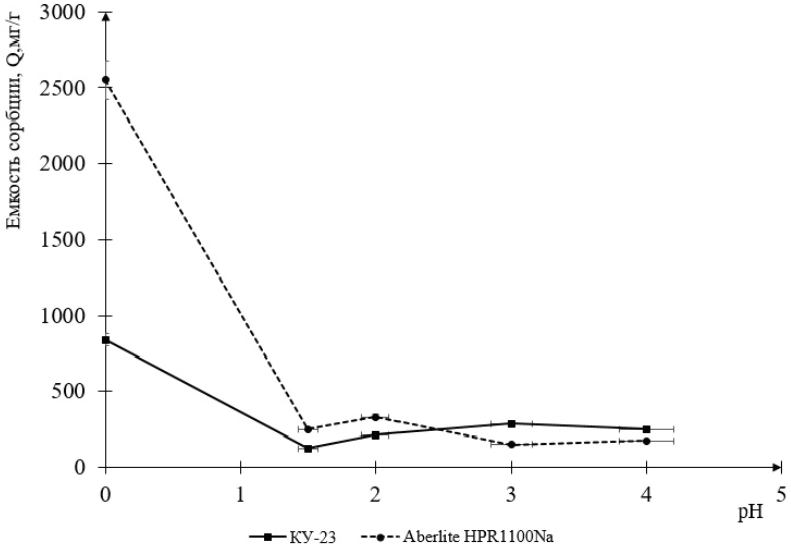


Рисунок 2. График зависимости емкости сорбции от pH раствора кокарбоксилазы

Из рисунка 2 видно, что сорбцию кокарбоксилазы на исследуемых сорбентах следует проводить при значении pH, равном 0, так как при данном значении емкость сорбции была максимальна.

Помимо подбора значения pH необходим также подбор таких параметров, как высота слоя сорбента в колонке и скорость протекания раствора через колонку в процессе динамической сорбции. Для оценки эффективности динамического процесса были построены выходные кривые сорбции, промывки и десорбции кокарбоксилазы при каждом варианте высоты слоя сорбента и скорости пропускания раствора. На рисунках 3 и 4 соответственно представлены выходные кривые при проведении процесса на сорбентах КУ-23 и Aberlite HPR1100Na в следующих условиях: высота слоя сорбента 10 мм, скорость пропускания раствора 0.75 мл/мин при сорбции и 0.375 мл/мин при десорбции, элюент – ацетатный буферный раствор (pH = 5.5). В таблице 1 представлены рассчитанные емкости сорбции при всех вариантах, описанных в разделе выше условий.

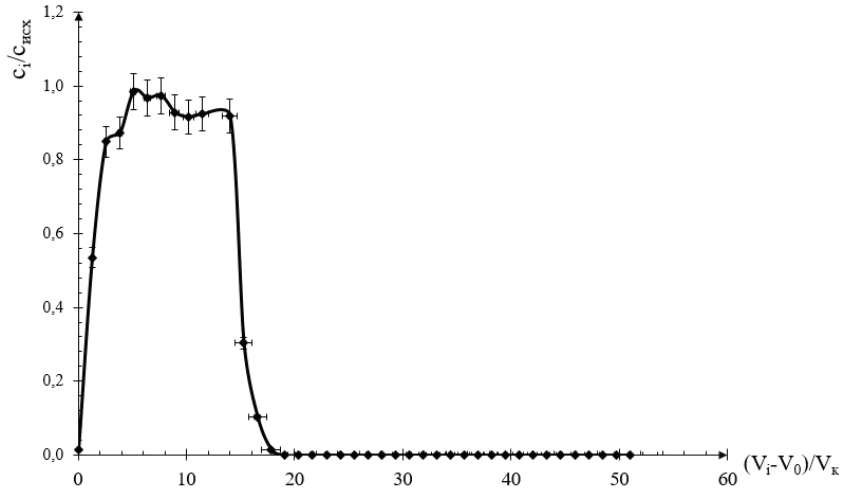


Рисунок 3. Выходная кривая сорбции и десорбции на КУ-23 с высотой слоя сорбента 10 мм; скорость сорбции 0.75 мл/мин; скорость десорбции 0.375 мл/мин

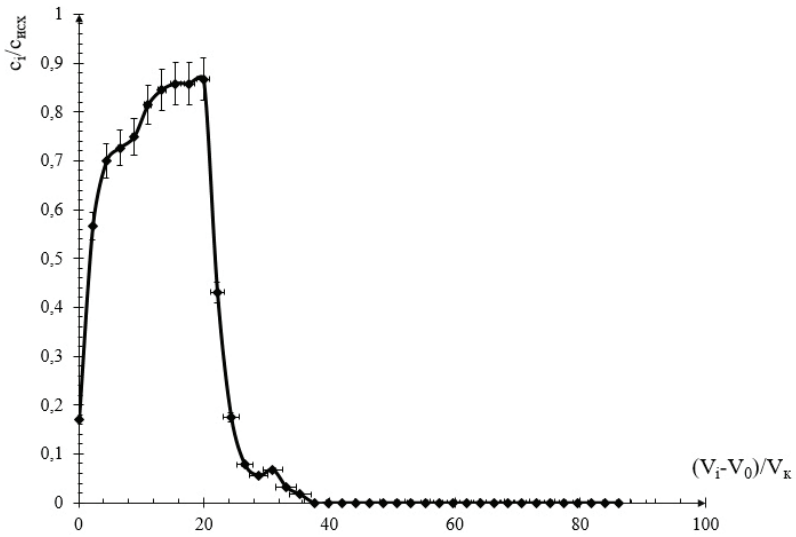


Рисунок 4. Выходная кривая сорбции и десорбции на Aberlite HPR1100Na с высотой слоя сорбента 10 мм; скорость сорбции 0.75 мл/мин; скорость десорбции 0.375 мл/мин

Таблица 1 – Емкости динамической сорбции сорбентов

Сорбент	Высота слоя сорбента, мм	Емкость сорбции, ЕД/г
КУ-23	10	100,45
	32	79,97
	42	42,70
Aberlite HPR1100Na	10	160,19

При проведении серии опытов на КУ-23 с различными скоростями пропускания раствора было показано, что данные параметры не оказывают значительного влияния на эффективность процесса десорбции – выходные кривые были аналогичны представленной на рисунке 3 и в данной статье не показаны. Согласно данным таблицы 1 наибольшая емкость сорбции наблюдается при высоте слоя сорбента 10 мм. Емкость сорбции кокарбоксилазы на Aberlite HPR1100Na выше, чем на КУ-23, что подтверждается результатами статических экспериментов [6].

Из рисунков 3 и 4 видно, что десорбция с использованием в качестве элюента ацетатного буферного раствора с pH = 5.5, выбранного согласно традиционной технологии, не была эффективной. Это говорит о том, что необходимо проведение дальнейших экспериментов по подбору эффективного элюента для десорбции кокарбоксилазы с изучаемых сорбентов, а также оптимизация условий проведения десорбции.

В ходе исследования было подобрано значение pH сорбции кокарбоксилазы на сорбентах КУ-23 и Aberlite HPR1100Na. Изучение динамического процесса показало, что подбор условий проведения сорбции и десорбции, таких как высота слоя сорбента в колонке, скорость сорбции, а также вид используемого элюента, необходимо продолжить для достижения более эффективных результатов. В дальнейшем планируется изучение сорбции и десорбции кокарбоксилазы в динамических условиях на сорбентах Aberlite HPR1100Na, MN500 и S950, а также процесса хроматографического разделения смеси моно-, ди- и трифосфорных эфиров тиамина из раствора, получаемого на стадии фосфорилирования тиамина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Большая советская энциклопедия. Электронная энциклопедия. Доступно по: http://bse.sci-lib.com/article062606.html.

2. Регистр лекарственных средств в России: Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. Электронный справочник. Доступно по: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_765.htm.

3. Шнайдман ЛО. Производство витаминов. Москва: Пищевая промышленность, 1973.

4. Поляченко ВМ, Юркевич АМ, Махкамов ХМ, Леонтьева ЛИ, Ядгаров ЭГ. Способ получения фосфорных эфиров тиамина. Патент РФ № 2041229. 09.08.1995

5. Krummradt Holger, Beschmann Klaus, Wartenberg Frank-Hardi, Diekmann Horst Method of purifying thiamine phosphates. United States Patent № US 6596865 B1б 22.07.2003

6. Пятиизбянцев ТА, Красовицкая ИА, Котова НВ. Равновесные и кинетические параметры процесса сорбции кокарбоксилазы на сорбентах различной структуры. Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития. М.: ООО «ЭКСПО-БИОХИМ-ТЕХНОЛОГИИ», 2020.

SUMMARY

STUDYING THE DYNAMIC SORPTION OF COCARBOXYLASE ON DIFFERENT SORBENTS

Kovaneva A.V., 4th year student, **Kholodaeva S.V.**, 3th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The results of dynamic sorption of cocarboxylase on the KU-23 sorbent and Aberlite HPR1100Na sorbent are present in the article. It is shown that the Aberlite HPR1100Na sorbent has a higher sorption capacity at the height of the sorbent layer in the sorption column of 10 mm. The desorption of cocarboxylase was not effective under all conditions (the speed of flow the solution through the sorption column and the height of the sorbent layer), it indicates the need to select a more effective eluent than used according to traditional technology.

Key words: *cocarboxylase, thiaminediphosphate, sorption, KU-23.*

REFERENCES

1. Bolshaya sovetskaya enciklopediya. Elektronnaya enciklopediya. Available at: http://bse.sci-lib.com/article062606.html. (in Russ)
2. Registr lekarstvennyh sredstv v Rossii: Enciklopediya lekarstv i tovarov aptechnogo assortimenta Elektronnyj spravochnik. Available at: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_765.htm. (in Russ)
4. Shnajdman LO. Proizvodstvo vitaminov. Moscow: Pishevaya promyshlennost, 1973. (in Russ)
5. Polyachenko VM, Yurkevich AM, Mahkamov HM, Leonteva LI, Yadgarov EG. Sposob polucheniya fosfornyh efirov tiamina . Patent RF № 2041229. 09.08.1995 (in Russ)
6. Krummradt Holger, Beschmann Klaus, Wartenberg Frank-Hardi, Diekmann Horst Method of purifying thiamine phosphates. United States Patent № US 6596865 B1b 22.07.2003
7. Pyatiizbyancev TA, Krasovickaya IA, Kotova NV. Ravnovesnye i kineticheskie parametry processa sorbcii kokarboksilazy na sorbentah razlichnoj struktury. Materialy mezhdunarodnogo foruma “Biotehnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya. Moscow: OOO “EKSPO-BIOHIM-TEHNOLOGII”, 2020. (in Russ)

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ПРОГРЕССИЮ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Колесникова М.А., студ. 4 курса
Руководитель: **Хальчицкий С.Е.**, канд. биол. наук.; **Кириллова Н.В.**, доктор биол. наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: kolesnikova.mariya@pharminnotech.com

Были рассмотрены полиморфизмы генов нейромедиаторов: *5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2C*, *MAOA*-VNTR, *COMT*. На основании литературного обзора определены полиморфизмы генов нейромедиаторов, которые могут быть ассоциированы с прогрессией и выживаемостью больных раком предстательной железы. Однако, требуются дополнительные исследования, подтверждающие полученные ранее результаты, позволяющие выявить полиморфизмы генов нейромедиаторов, которые будут иметь достаточную клиническую значимость при оценке рисков развития рака предстательной железы и прогнозировании исхода заболевания.

Ключевые слова: *рак предстательной железы, полиморфизмы генов нейромедиаторов, прогрессия и выживаемость больных раком предстательной железы.*

По данным ВОЗ за 2018 год рак предстательной железы (РПЖ) относится к одному из наиболее распространённых видов рака: 1,28 млн случаев [4]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями мужского населения России рак предстательной железы стоит на втором месте после опухолей легких и составляет – 14 % [7]. Социальная значимость проблемы обоснована высокой заболеваемостью и смертностью, значительными затратами на диагностику, лечение и реабилитацию больных РПЖ. [3]

В 1994 г. FDA (Food and Drug Administration) было одобрено применение метода определения уровня простатического специфического антигена (PSA) у больных раком предстательной железы для скрининга и выявления РПЖ, что повлекло повышение % выявляемости заболевания на ранних стадиях. Определение уровня PSA (в сочетании с периодическими методами визуального контроля (УЗИ/МРТ) и повторной биопсией) и поныне является золотым стандартом в диагностике РПЖ. Однако, около 60% всех случаев с повышенным значением PSA (более 4 нг/мл) у мужчин старше 50 лет связаны с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) [6]. Также, следует отметить, что тест показателен для возрастной группы только до 70 лет, так как практически 100% лиц старше 70 имеют повышенный

уровень PSA в сыворотке крови, связанный с неминуемым развитием ДГПЖ в связи с возрастным фактором. [19] Представленные данные свидетельствуют о недостаточной специфичности анализа на PSA, в связи с этим необходим поиск новых высокоспецифичных онкомаркеров, связанных с рисками при РПЖ.

Развитие рака предстательной железы обусловлено многими этиологическими факторами риска, такими как, образ жизни, экологические риски и играющая ключевую роль при РПЖ генетическая восприимчивость. Проведённые исследования показывают, что РПЖ является одним из видов рака, с наибольшей наследственной предрасположенностью [15]. Поэтому, в качестве онкомаркеров целесообразно рассматривать генетические маркеры, преимуществом которых является разовое проведения анализа, что позволяет снизить медицинские и материальные затраты, а также выделить пациентов с разной степенью риска развития и прогрессирования РПЖ. По сравнению с возрастным PSA скринингом, индивидуальный скрининг позволит уменьшить на 16% количество обследуемых, и на 3% снизить гипердиагностику РПЖ. [20] Целью данной статьи является выявление полиморфизмов генов нейромедиаторов, влияющих на прогрессию и выживаемость больных раком ПЖ на основании опубликованных исследований. Необходимо установить наличие генов нейромедиаторов ассоциированных с РПЖ, а также их роль в прогрессии и выживаемости больных РПЖ.

На данный момент проведенные исследования подтверждают связь некоторых полиморфизмов нейромедиаторов с раком предстательной железы, включающие как однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), так и как изменчивость числа коротких повторов в некодирующей части ДНК (STR). Наибольший интерес при изучении влияния генетических факторов на развитие и прогрессирование заболеваний уделяется однонуклеотидным полиморфизмам (SNP). SNP – это вариации генов у одного биологического вида, различающиеся одной парой нуклеотидов и не нарушающие функцию гена. Встречаются в популяции не реже чем в 1% случаев, т.е. каждый человек отличается от других одним нуклеотидом на каждую тысячу нуклеотидов. Подавляющее большинство однонуклеотидных полиморфизмов биаллельны и являются самым распространённым типом полиморфизмов (приблизительно 1 полиморфизм на 300 п.н). [21] Простота определения SNP обуславливает большой интерес к их изучению в качестве биомаркеров.

Течение ряда патологических процессов, в частности опухолевого, сильно зависит от психоэмоционального состояния до начала и во время заболевания [10]. Состояние стресса, как острого, так и хронического, достоверно влияет на все звенья опухолевого процесса, способствуя инициированию, прогрессированию и метастазированию рака, в том числе и злокачественных опухолей ЦНС [11]. В модулировании реакций на заболевание основную роль играют нейропептиды, нейрогормоны и нейроэндокринная система в целом. Нейротрансмиттеры (тормозные и возбуждающие) находятся в состоянии постоянного взаимодействия и динамического изменения в зависимости от условий среды, генетических и эпигенетических факторов [5]. В последние годы, по данным литературы, показано, что стресс-ассоциированные нейротрансмиттеры, в частности адреналин и норадреналин, могут существенно модулировать пролиферацию и апоптоз трансформированных клеток и тем самым вносить вклад в формирование и прогрессию злокачественных новообразований [1, 2, 18]. Тормозные нейромедиаторы, в первую очередь гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), известны своим противоопухолевым действием в большинстве моделей злокачественных новообразований [16].

Серотони́н, биогенный моноамин и один из основных нейромедиаторов, принимающий участие в регуляции настроения, сна, полового и пищевого поведения, формировании чувства боли и др. [8] В дополнение к своим хорошо известным функциям, серотонин, как было показано, является митогенным фактором для широкого спектра нормальных и опухолевых клеток. Серотонин проявляет стимулирующее рост действие при агрессивных раках и карциноидах чаще всего через 5-HT1 и 5-HT2 рецепторы. Напротив, низкие дозы серотонина могут ингибировать рост опухоли путем уменьшения кровоснабжения опухоли. Кроме того, прогрессирование некоторых опухолей сопровождается нарушением регуляции паттерна экспрессии рецепторов серотонина. Установлено, что уровень серотонина в сыворотке крови подходит для оценки прогноза уротелиальной карциномы мочевого пузыря, аденокарциномы предстательной железы и почечно-клеточного рака. [14] Таким образом, поскольку серотонин может влиять на опухолевый процесс, то вариации генов соответствующих рецепторов могут быть связаны с прогрессированием рака предстательной железы. В частности, результаты одного из исследований показали различие в частотах вариантов *5-HT1B* между группами пожилых мужчин без симптомов гиперплазии предстательной железы (60 человек), мужчин с нелеченной доброкачественной гиперплазией предстательной железы (42 человека) и мужчин с раком предстательной железы (15 человек)-группа РПЖ. Эта разница была обусловлена значительно более высокой частотой G (GG + GA) по сравнению с гомозиготным генотипом AA в группе РПЖ. Хотя эта группа была небольшой, результаты показывают, что варианты *5-HT1B* могут быть рассмотрены в качестве маркера генетического риска для роста РПЖ, В то же время результаты не показали значительной разницы в частотах аллелей гена *5-HT2A* и *5-HT2C* между группами. [9].

Другой потенциальный генетический маркер – полиморфизм гена митохондриального фермента – МАОА. Моноаминоксидаза (МАОА) разрушает аминные нейромедиаторы, катализируя окислительное дезаминирование серотонина, мелатонина, катехоламинов и других биогенных аминов. Хотя МАОА в основном изучается в контексте широкого спектра расстройств антисоциального спектра, он также может способствовать развитию рака, поскольку было показано, что дезаминированные продукты активности МАОА способствуют клеточной пролиферации и ингибируют апоптоз. Исследования экспрессии генов показали, что транскрипты МАОА повышены в злокачественном эпителии предстательной железы по сравнению с нормальным соседним эпителием, а уровни белка МАОА ассоциированы с более высокими степенями шкалы Глисона. Было показано, что активность МАОА способствует более агрессивному фенотипу РПЖ с помощью неопределенных механизмов. Таким образом, поскольку экспрессия МАОА ассоциирована с РПЖ и тяжестью опухоли, из этого следует, что генетические вариации *МАОА* могут быть связаны с риском РПЖ. Так, общие аллели *МАОА*-VNTR не были связаны с относительным риском развития РПЖ, а также не отличались клиническими

особенностями заболевания. Однако, редкий полиморфизм промотора *MAOA* (вариант с 5 копиями), обеспечивающий низкую экспрессию, был связан со снижением риска развития рака предстательной железы [17]. В другом исследовании высокая экспрессия *MAOA* была связана с плохой общей выживаемостью [13].

Также был рассмотрен полиморфизм Val158Met гена *COMT*. Ген *COMT* кодирует фермент, главным образом ответственный за деградацию катехоламинов, таких как допамин и норадреналин, кроме того, он участвует в инактивации потенциальных канцерогенных соединений, продуцирующих воспаление и катехолэстрогенов, которые обладают способностью повреждать ДНК и принимать участие в опухолевом процессе. Аллельная вариация в *COMT* (Val158Met), вероятно, связана со снижением ферментативной активности и, следовательно, увеличивает риск канцерогенеза из-за накопления метаболитов эстрогена. Связь между полиморфизмом гена *COMT* и раком предстательной железы была проверена в ряде исследований, но с получением противоречивых результатов. Так, проведённый метаанализ, включающий 11 исследований с общим числом случаев с РПЖ 3381 и 3276 контроля, показал, что рецессивный вариант полиморфизма Val158Met является фактором риска развития рака предстательной железы [12].

Проведённые на данный момент исследования указывают на возможность ассоциации некоторых рассмотренных полиморфизмов с раком предстательной железы. Однако, они требуют подтверждения результатов новыми исследованиями для получения объективного представления о роли нейромедиаторов и связанных с ними рецепторных сигнальных путей в развитии и прогрессировании рака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов ВВ, Егоров ДН, Вардосанидзе ВК, Козлов ВВ. Нервная и иммунная система в канцерогенезе. Новосибирск: СО РАМН, 1998..

2. Берштейн ЛМ. Гормональный канцерогенез. СПб: Наука, 2000..

3. Говоров АВ, Иванова ЕО, ПСА в деталях. Урология сегодня. 2011;6:2. Доступно по: http://urotoday.ru/system/files/6-2011.pdf (дата обращения: 17.02.2021)

4. Данные ВОЗ по заболеваемостью раком, 12 сентября 2018 г. Доступно по https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer (дата обращения: 17.02.2021)

5. Девойно ЛВ, Идова ГВ, Альперина ЕЛ. и др. Системные мозговые механизмы нейроиммуномодуляции: психоэмоциональный вклад. Бюллетень Сибирского отделения РАМН. 2004;2:90–97.

6. Сергеева ЕА, PSA и его роль в диагностике рака простаты. 18.09.2018. Доступно по: https://medach.pro/post/1620 (дата обращения: 20.02.2021)

7. Статистика злокачественных новообразований в РФ. Данные регистра МНИОИ им. П.А. Герцена. Доступно по: http://www.oncology.ru/specialist/library/prostate_cancer (дата обращения: 17.02.2021)

8. Шур ВЮ, Самотруева МА, Мажитова МВ, Тризно НН, Беднов ИА, Шур ЮВ. Некоторые аспекты влияния серотонина на морфофункциональное состояние печени и процессы её регенерации. Современные проблемы науки и образования. 2015;4. Доступно по: http://science-education.ru/ru/article/view?id=20591 (дата обращения: 21.02.2021).

9. Daria Pašalić, Paulina Pauković, Selma Cvijetić et al. Prostate Cancer in Elderly Croatian Men: 5-HT Genetic Polymorphisms and the Influence of Androgen Deprivation Therapy on Osteopenia. 2012:598–604. DOI: 10.1089/gtmb.2011.0279

10. Heffner KL, Loving TJ, Robles TF et al. Examining psychosocial factors related to cancer incidence and progression: In search of the silver lining. Brain Behav. Immun. 2003;17:109–111. DOI: 10.1016/s0889-1591(02)00076-4

11. Moreno-Smith M, Lutgendorf SK, Sood AK. Impact of stress on cancer metastasis. Future Oncol. 2010;6(12):1863–1881. DOI: 10.2217/fon.10.142

12. Pradeep Kumar and Vandana Rai. Catechol-O-Methyltransferase Gene Val158Met Polymorphism and Prostate Cancer Susceptibility. 2020. DOI: 10.1101/2020.04.16.20067736

13. S Xu, H Adisetiyo et al. Dual inhibition of survivin and MAOA synergistically impairs growth of *PTEN*-negative prostate cancer. 2015. DOI: 10.1038/bjc.2015.228

14. Sarrouilhe D, Clarhaut J, Defamie N, Mesnil M. Serotonin and cancer: what is the link? Curr Mol Med. 2015:62–77. DOI: 10.2174/1566524015666150114113411

15. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. 2004;13(1):R103–R121.; Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. 2000;343(2):78– 85. DOI: 10.1093/hmg/ddh072

16. Schuller HM, Al-Wadei HA, Ullah MF, Plummer HK. Regulation of pancreatic cancer by neuropsychological stress responses: a novel target for intervention. Carcinogenesis. 2012;33(1):191–196. DOI: 10.1093/carcin/bgr251

17. Thomas A. White, Erika M. Kwon et al. The *Monoamine Oxidase A* Gene Promoter Repeat and Prostate Cancer Risk. 2012. DOI: 10.1002/pros.22515

18. Tilan J, Kitlinska J. Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis-Link between Stress and Cancer Progression. J Oncol. 2010. DOI: 10.1155/2010/539706

19. William J. Catalona. Prostate Cancer Screening. Med. Clin. NA. 2018;102(2):199-214. DOI: 10.1016/j.mcna.2017.11.001

20. Xu X, Valtonen-André C, Sävblom C, Halldén C, Lilja H, Klein RJ. Polymorphisms at the microseminoproteinβ locus associated with physiologic variation in β-microseminoprotein and prostate-specific antigen levels. Cancer. 2010;19(8):2035–2042. DOI: 10.1158/1055-9965.epi-10-0431

21. Zhao H, Nettleton D, Dekkers J.c.M. Genet. res. 2007;89:1–6. DOI: 10.1017/s0016672307008634

SUMMARY

POLYMORPHISMS OF NEUROTRANSMITTER GENES AFFECTING PROGRESSION AND SURVIVOL OF PROSTATE CANCER PATIENTS

Kolesnikova M.A., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Polymorphisms of neurotransmitter genes were considered: 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2C, MAOA-VNTR, COMT. Based on a literature review, polymorphisms of neurotransmitter genes have been identified that can be associated with progression and survival of prostate cancer patients. However, more research is required to support the earlier findings to identify polymorphisms of neurotransmitter genes that will have sufficient clinical relevance in assessing prostate cancer risks and predicting disease outcome.

Key words: *prostate cancer, polymorphisms of neurotransmitter genes, progression and survival of prostate cancer patients.*

REFERENCES

1. Abramov VV, Egorov DN, Vardosanidze VK, Kozlov VV. Nervous and immune systems in carcinogenesis. Novosibirsk: SB RAMS, 1998.

2. Berstein LM. Hormonal carcinogenesis. Saint Petersburg: Science, 2000.

3. Govorov AV, Ivanova EO, PSA in detail. Urology today. 2011;6:2. [Electronic Resource]. – Access mode: http://urotoday.ru/system/files/6-2011.pdf (call date: 17.02.2021)

4. WHO data on cancer incidence, September 12, 2018. Available at: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer (call date: 17.02.2021)

5. Devoino LV, Idova GV, Alperina EL. and others. Systemic brain mechanisms of neuroimmunomodulation: psychoemotional contribution. Bulletin of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Sciences. 2004;2:90-97.

6. Sergeeva EA, PSA and its role in the diagnosis of prostate cancer. 18.09.2018. Available at: https://medach.pro/post/1620 (call date: 20.02.2021)

7. Statistics of malignant neoplasms in the Russian Federation. Data of the P.A. Herzen MNIOI register. Available at: http://www.oncology.ru/specialist/library/prostate_cancer/ (call date: 17.02.2021)

8. Shur VYu., Samotrueva MA, Mazhitova MV, Trizno NN, Bednov IA, Shur YuV. Some aspects of serotonin influence on morphofunctional liver state and its regeneration processes. Modern problems of science and education. 2015;4. Available at: http://science-education.ru/ru/article/view?id=20591 (call date: 21.02.2021).

9. Daria Pašalić, Paulina Pauković, Selma Cvijetić et al. Prostate Cancer in Elderly Croatian Men: 5-HT Genetic Polymorphisms and the Influence of Androgen Deprivation Therapy on Osteopenia. 2012:598–604. DOI: 10.1089/gtmb.2011.0279

10. Heffner KL, Loving TJ, Robles TF et al. Examining psychosocial factors related to cancer incidence and progression: In search of the silver lining. Brain Behav. Immun. 2003;17:109–111. DOI: 10.1016/s0889-1591(02)00076-4

11. Moreno-Smith M, Lutgendorf SK, Sood AK. Impact of stress on cancer metastasis. Future Oncol. 2010;6(12):1863–1881. DOI: 10.2217/fon.10.142

12. Pradeep Kumar and Vandana Rai. Catechol-O-Methyltransferase Gene Val158Met Polymorphism and Prostate Cancer Susceptibility. 2020. DOI: 10.1101/2020.04.16.20067736

13. S Xu, H Adisetiyo et al. Dual inhibition of survivin and MAOA synergistically impairs growth of *PTEN*-negative prostate cancer. 2015. DOI: 10.1038/bjc.2015.228

14. Sarrouilhe D, Clarhaut J, Defamie N, Mesnil M. Serotonin and cancer: what is the link? Curr Mol Med. 2015:62–77. DOI: 10.2174/1566524015666150114113411

15. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. 2004;13(1):R103–R121.; Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. 2000;343(2):78– 85. DOI: 10.1093/hmg/ddh072

16. Schuller HM, Al-Wadei HA, Ullah MF, Plummer HK. Regulation of pancreatic cancer by neuropsychological stress responses: a novel target for intervention. Carcinogenesis. 2012;33(1):191–196. DOI: 10.1093/carcin/bgr251

17. Thomas A. White, Erika M. Kwon et al. The *Monoamine Oxidase A* Gene Promoter Repeat and Prostate Cancer Risk. 2012. DOI: 10.1002/pros.22515

18. Tilan J, Kitlinska J. Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis-Link between Stress and Cancer Progression. J Oncol. 2010. DOI: 10.1155/2010/539706

19. William J. Catalona. Prostate Cancer Screening. Med. Clin. NA. 2018;102(2):199-214. DOI: 10.1016/j.mcna.2017.11.001

20. Xu X, Valtonen-André C, Sävblom C, Halldén C, Lilja H, Klein RJ. Polymorphisms at the microseminoproteinβ locus associated with physiologic variation in β-microseminoprotein and prostate-specific antigen levels. Cancer. 2010;19(8):2035–2042. DOI: 10.1158/1055-9965.epi-10-0431

21. Zhao H, Nettleton D, Dekkers J.c.M. Genet. res. 2007;89:1–6. DOI: 10.1017/s0016672307008634

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКА НЕМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ С ЦЕЛЬЮ ПОИСКА ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ ПЕСТИЦИДОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Короткова О.И., магистрант 2 года обучения
Руководители: **Колодязная В.А.**, канд. биол. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: oksana.korotkova@pharminnotech.com

В данной работе изучена биологическая активность антибиотика немедицинского назначения имбрицина с целью определения возможности его использования в качестве экологически безопасного и эффективного биопрепарата для защиты растений от болезней и вредных членистоногих. Показана высокая антагонистическая активность в отношении фитопатогенных грибов рода *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* и бактерии *Pseudomonas syringae pv. maculicola* инсектицидная активность в отношении *Megoura viciae*.

Ключевые слова: *имбрицин, неполиеновые антибиотики, антибиотики немедицинского назначения, биопрепараты, защита растений, антагонистическая активность, инсектицидная активность, экологическая безопасность.*

В последние годы все больше внимания уделяют разработке экологически безопасных методов ведения сельского хозяйства [1]. Резкий скачок интенсивности загрязнения окружающей среды и снижение качества сельскохозяйственной продукции в результате применения химических пестицидов оказало сильное влияние на практическое внедрение биологических методов защиты растений во всех странах мира. Биопрепараты, используемые в качестве альтернативы химическим пестицидам, соответствуют требованиям, предъявляемым к средствам защиты растений: экологически безопасны, специфичны, деградируют в окружающей среде, активны при низких концентрациях, нетоксичны для человека и нецелевых организмов. Биопрепараты являются важнейшим элементом современных технологий фитосанитарной оптимизации агроценозов [2]. Ожидается, что рынок биопрепаратов достигнет 8,5 млрд. долларов к 2025 году [3].

Для защиты растений используют антибиотики немедицинского назначения (АНН) с целью распространения резистентных форм микроорганизмов. Имбрицин является неполиеновым макролидным противогрибковым АНН. Благодаря своей низкой токсичности и высокой фунгицидной активности имбрицин нашел применение в пищевой промышленности, а также в изготовлении биостойкой бумаги, используется в сельском хозяйстве для защиты хлопчатника от заболеваний [4]. Перспективы применения имбрицина расширяются, в том числе и в сельском хозяйстве.

Целью данной работы является изучение антагонистической активности в отношении фитопатогенных грибов и бактерий антибиотика немедицинского назначения имбрицина, а также его инсектицидной активности в отношении вредных членистоногих с целью поиска экологически безопасного эффективного биопрепарата для защиты растений.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) Определить антагонистическую активность образца имбрицина в отношении фитопатогенных грибов и бактерий.
2) Оценить инсектицидную активность образца в отношении виковой тли.

Объектом исследования являлся антибиотик немедицинского назначения (АНН) имбрицин, полученный и выделенный на кафедре биотехнологии Санкт-Петербургского Химико-Фармацевтического Университета (СПХФУ). Экспериментальная часть работы была выполнена на базе лаборатории микробиологической защиты растений Всероссийского научно-исследовательский института защиты растений (ВИЗР).

Антагонистическую активность АНН имбрицина определяли стандартным микробиологическим методом лунок по диаметру зоны лизиса тест-культуры. Диаметр лунки составлял 10 мм. В качестве тест-культур использовали фитопатогенные грибы: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Alternaria solani* Sorauer, *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium oxysporum* Schltdl., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.; и бактерии: *Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis* (Smith) Davis *et al* (штамм 101)*, Pseudomonas syringae pv. maculicola* (McCulloch) Young et al.*, Pseudomonas syringae pv. tomato* (van Hall) Young *et al*. Выбор данных фитопатогенов обусловлен широкой распространенностью и опасностью вызываемых ими заболеваний растений. Концентрация образца имбрицина составляла 100 мг/л. Диаметр лунки составлял 10 мм.

Определение инсектицидной активности образцов антибиотиков немедицинского назначения проводили в лабораторных условиях на виковой тле (*Megoura viciae* Buckt.) при контактном способе обработки. Виковая тля относится к группе сосущих членистоногих вредителей, которая крайне распространена и приносит большой ущерб сельскохозяйственным культурам. В опытах использовали лабораторные популяции вредителя. Популяции виковой тли, выделенные в природных условиях, разводили и поддерживали на растениях бобов в условиях инсектария. Концентрация антибиотика составляла 100 мг/л, антибиотик растворяли в 0,01 % растворе неонола.

На основании полученных данных установлено, что исследованный образец АНН имбрицин проявил высокую антагонистическую активность против всех изученных фитопатогенных грибов, а также против фитопатогенных бактерий. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

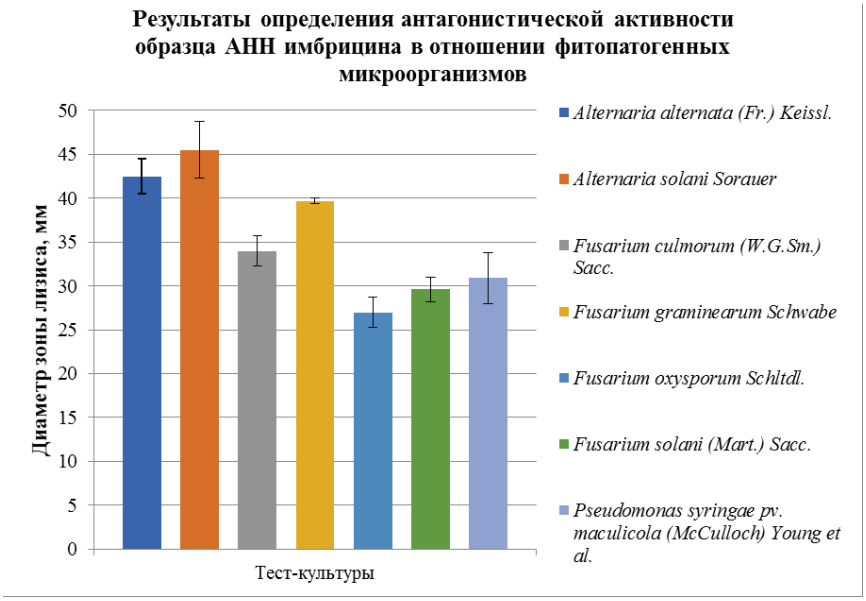


Рисунок 1. Результаты определения антагонистической активности образца АНН имбрицина в отношении фитопатогенных микроорганизмов

Было определено, что *Pseudomonas syringae pv. maculicola* и *Pseudomonas syringae pv. tomato* нечувствительны к данному образцу антибиотика. Имбрицин активно подавлял рост грибов рода *Alternaria spp.,* диаметр зоны лизиса составлял (42,5 ± 2) мм. *Alternaria spp.* является возбудителем ряда опасных заболеваний различных сельско-хозяйственных культур, включая зерновые, масличные культуры, такие овощные культуры, как цветная капуста, брокколи, морковь и картофель, томат, а также некоторые плодовые культуры [5].

Известно, что *Alternara alternata* и *A. solani* продуцируют микотоксины, которые при попадании с продуктами питания вызывают серьезные последствия для здоровья человека [5]. Поэтому крайней важной задачей является поиск эффективного средства защиты растений от данных фитопатогенов.

Исходя из полученных результатов, видно, что имбрицин имеет высокую антагонистическую активность в отношении грибов рода *Fusarium spp.* Зоны лизиса находились в диапазоне от 27 мм до 39,7 мм. *Fusarium spp.* являются значимыми фитопатогенными грибами, широко распространенными и вызывающими огромные экономические потери во всем мире в сельском хозяйстве вследствие заражения растений и в животноводстве. Опасность заражения сельскохозяйственных культур возбудителями фузариоза обусловлена их способностью продуцировать микотоксины. [6].

Выявлено, что имбрицин активен против *Pseudomonas syringae pv. maculicola*. Данный фитопатоген широко распространен и вызывает бактериальную пятнистость крестоцветных [7].

Результаты оценки инсектицидной активности имбрицина представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты определения инсектицидной активности образца АНН имбрицина в отношении виковой тли

Вариант	Количество тли в опыте	Смертность, %
Имбрицин (0,1 % водный раствор)	60	38,3
Имбрицин (0,1 % раствор с неонолом)	60	83,3
Контроль (вода)	60	0
Контроль (раствор 0,01 % неонола)	60	0

Установлено в результате анализа полученных данных, что раствор имбрицина с 0,01 % неонолом обладает высокой инсектицидной активностью, при этом смертность тли составила 83,3 %.

Таким образом, в работе показана высокая антагонистическая активность в отношении фитопатогенных грибов рода *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* и бактерии *Pseudomonas syringae pv. maculicola* инсектицидная активность в отношении *Megoura viciae*, что позволяет рассматривать имбрицин как перспективный биологически безопасный биопрепарат для защиты растений от фитопатогенов и вредителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатурова А.М., Жевнова Н.А., Цыгичко А.А., Аллахвердян В.В., Хомяк А.И., Бондарчук Е.Ю., Саенко К.Ю., Астахов М.М., Гырнец Е.А., Штернпис М.В. Влияние лабораторных образцов биопрепаратов и их смесей с органоминеральными удобрениями на рост и развитие растений озимой пшеницы и подсолнечника. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2019;20(6):602-612. DOI: 10.30766/2072-9081.2019.20.6.602-612

2. Краснобаева И.А., Коваленко Н.М., Попова Э.В. Влияние хитина на биологическую активность штаммов *Bacillus subtilis*. Вестник защиты растений. 2020;4(103):233-240 DOI: 10.31993/2308-6459-2020-103-4-13272

3. Khakimov A.A., Omonlikov A.U., Utaganov S.BU. Current status and prospects of the use of biofungicides against plant diseases. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences. 2020:13(03): 119-126. DOI: 10.30574/gscbps.2020.13.3.0403

4. Belakhov V.V., Yakovleva E.P., Kolodyaznaya V.A. et al. Imbricin, an Antifungal Antibiotic of Non-Medical Application: Preparation, Physicochemical Properties, Structural Features, and Industrial and Agricultural Uses (Review). Russ J Gen Chem. 2017;87:3220–3232 DOI: 10.1134/S1070363217130175

5. Thomma BPHJ. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology. 2003;4:225-236. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x

6. Hof H. The Medical Relevance of Fusarium spp. Journal of Fungi. 2020;6(3):117. DOI: 10.3390/jof6030117

7. Wang W, Feng M, Kong D, Liu L, Song S, Xu C. Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Pseudomonas syringae pv. maculicola* in broccoli and radish seeds, Food and Agricultural Immunology. 2015;26:5: 738-745, DOI: 10.1080/09540105.2015.1023266

SUMMARY

STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIBIOTIC OF NON-MEDICAL APPLICATION IN SEARCH OF ENVIRONMENTALLY SAFE PESTICIDES FOR PLANT PROTECTION

Korotkova O.I., 2th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The biological activity of the non-medical antibiotic imbricin was studied. Practical application of imbricin as an eco-friendly and effective biopreparation for plant protection from diseases and harmful arthropods was considered. High antagonistic activity against phytopathogenic fungi *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* and the bacteria *Pseudomonas syringae pv. maculicola* was shown. Insecticidal activity against *Megoura viciae* was demonstrared.

Key words: *imbricin, non-polyene antibiotics, non-medical antibiotics, biopreparations, plant protection, antagonistic activity, insecticidal activity, environmental safet.*

REFERENCES

1. Asaturova A.M., Zhevnova N.A., Tsygichko A.A., Allakhverdyan V.V., Khomyak A.I., Bondarchuk YE.YU., Sayenko KYU, Astakhov MM, Gyrnets YEA, Shternshis MV. Vliyaniye laboratornykh obraztsov biopreparatov i ikh smesey s organomineral'nymi udobreniyami na rost i razvitiye rasteniy ozimoy pshenitsy i podsolnechnika. Agrarnaya nauka Yevro-Severo-Vostoka. 2019; 20(6): 602-612. DOI: 10.30766/2072-9081.2019.20.6.602-612 (In Russ)

2. Krasnobayeva IL, Kovalenko NM, Popova EV. Vliyaniye khitina na biologicheskuyu aktivnost' shtammov *Bacillus subtilis*. Vestnik zashchity rasteniy, 2020;4(103):233-240 DOI: 10.31993/2308-6459-2020-103-4-13272 (In Russ)

3. Khakimov A.A., Omonlikov A.U., Utaganov S.BU. Current status and prospects of the use of biofungicides against plant diseases. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences. 2020:13(03): 119-126. DOI: 10.30574/gscbps.2020.13.3.0403

4. Belakhov V.V., Yakovleva E.P., Kolodyaznaya V.A. et al. Imbricin, an Antifungal Antibiotic of Non-Medical Application: Preparation, Physicochemical Properties, Structural Features, and Industrial and Agricultural Uses (Review). Russ J Gen Chem. 2017;87:3220–3232 DOI: 10.1134/S1070363217130175

5. Thomma BPHJ. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology. 2003;4:225-236. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x

6. Hof H. The Medical Relevance of Fusarium spp. Journal of Fungi. 2020;6(3):117. DOI: 10.3390/jof6030117

7. Wang W, Feng M, Kong D, Liu L, Song S, Xu C. Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Pseudomonas syringae pv. maculicola* in broccoli and radish seeds, Food and Agricultural Immunology. 2015;26:5: 738-745, DOI: 10.1080/09540105.2015.1023266

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММЫ ОБУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ПЕРСОНАЛА НА ПРЕДПРИЯТИИ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕ ВЕТЕРИНАРНЫХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Крыжановская В.С., магистр. 2 года обучения
Руководитель: **Топкова О.В.**, канд. биол. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: valeriya.kryzhanovskaya@spcpu.ru

В данной работе представлена разработка программы обучения производственного персонала, являющегося ключевым объектом фармацевтической системы качества, на предприятии по производству ветеринарных иммунобиологиче-

ских препаратов. С этой целью на предприятии-производителе ветеринарных иммунобиологических препаратов были изучены документы, регламентирующие процесс обучения, определены ключевые темы обучения и непосредственно разработана программа обучения.

Ключевые слова: *производственный персонал, обучение персонала, программа обучения персонала.*

В предыдущих работах уже было отмечено, что в настоящее время не все предприятия-производители ветеринарных иммунобиологических препаратов соответствуют действующим правилам надлежащей производственной практики (GMP). Главным образом данное несоответствие относится к функционирующей системе документации, являющейся неотъемлемой частью фармацевтической системы качества [1, 2]. К причинам такого несоответствия относятся не только трудности, возникающие при составлении документации, но и недостаток квалифицированного персонала, трудности при обучении персонала составлению и ведению документации. Помимо влияния на систему документации, персонал воздействуют практически на все стадии производства фармацевтической продукции, а, следовательно, на организацию и надлежащее функционирование системы обеспечения качества. Поэтому для решения всех поставленных задач, а также обеспечения качества, безопасности и эффективности готового продукта производитель должен иметь достаточное количество квалифицированного персонала, чётко знающего и понимающего свои должностные обязанности [3].

Однако на сегодняшний день в фармацевтической отрасли наблюдается дефицит квалифицированных кадров. Так, в рамках исследования проблем управления производственным персоналом при внедрении фармацевтической системы качества, проведенного в 2019 году, было выявлено [4]:

- наличие дефицита производственного персонала надлежащей квалификации (78,0 % опрошенных);
- недостаток молодых квалифицированных специалистов (70,0 % опрошенных). Причём, 62,0 % опрошенных оценили уровень образования выпускников ниже ожиданий, а 24,0 % – существенно ниже ожиданий;
- отсутствие реализации специальной кадровой политики в отношении производственных работников, за исключением ключевого персонала (72,0 % опрошенных).

Данная тенденция обусловлена рядом причин, в частности, недостаточной практической подготовкой, оттоком профессорско-преподавательского состава высших учебных заведений из-за низкого уровня оплаты труда в другие сферы деятельности, нехваткой высших учебных заведений соответствующего направления подготовки, а также низким уровнем оплаты труда персонала фармацевтических предприятий, недостаточно развитой системой управления персоналом, в том числе и системой стимулирования. Для решения данной проблемы необходимо разрабатывать образовательные программы с достаточным количеством часов практической подготовки, обеспечивать высшие учебные заведения необходимым и современным оборудование, увеличить оплату труда преподавателей и др.

В связи с недостатком квалифицированных кадров и занятостью в производственном процессе кадров, не имеющих необходимой квалификации, что особенно актуально для производств ветеринарных препаратов, помимо улучшения кадрового управления, необходимо уделить большое внимание разработке системы обучения. Обучение персонала – одна из мер по снижению риска для качества и безопасности лекарственного средства [5].

Цель работы заключалась в разработке программы обучения производственного персонала на предприятии-производителе ветеринарных иммунобиологических препаратов. Для решения сформулированной цели необходимо было решить ряд задач: изучить регламентирующие процесс обучения документы предприятия по производству ветеринарных иммунобиологических препаратов, определить ключевые темы обучения и разработать программу обучения.

Предметом исследования выступала система обучения персонала ООО «НПП «АВИВАК». Объектом исследования служила документация данного предприятия по обучению персонала. Методы исследования – контент-анализ, логико-теоретические методы.

На основании анализа действующей на предприятии системы обучения персонала была предложена программа обучения, изложенная ниже.

Цель обучения: формирование системных знаний, навыков и умений по производству ветеринарных иммунобиологических препаратов.

По итогам обучения формируются следующие компетенции:

- способность применять правила GMP при выполнении своих должностных обязанностей;
- способность соблюдать санитарно-гигиенические требования;
- способность применять полученные знания в своей деятельности;
- способность правильного ведения (оформление, хранение и др.) регистрирующей документации (протоколы, журналы).

Целевая аудитория программы: производственный персонал.

Форма обучения: очная.

Длительность программы: 24 часа (14 часов – лекционные занятия, 6 часов – практические занятия, 4 часа – различные виды контролей).

Итоговая аттестация: решение ситуационных задач, тестирование.

Документ по итогам успешного завершения обучения: личная карточка обучения сотрудника.

Преподаватели: утвержденные сотрудники (ведущие специалисты предприятия).

Структура программы обучения представлена в таблице.

Таблица – Архитектура программы

Раздел программы	Тематики занятий	Объем, часы
Лекции	1. Введение. Основные термины и определения. Применение ветеринарных иммунобиологических препаратов для вакцинопрофилактики. Технология производства вакцин	1
	2. Объекты, используемые для получения вируссодержащего материала: культуры клеток, куриные эмбрионы. Правила работы с ними	2
	3. Правовые и организационные вопросы обеспечения качества лекарственных средств, основные принципы GMP	2
	4. Персонал. Требования, предъявляемые к персоналу, работающему в заразной/чистой зоне. Основы промышленной санитарии. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней	2
	5. Помещения и оборудование. Уборка чистых производственных помещений. Дезинфекция рабочих помещений и воздушной среды	1
	6. Документация. Виды документации. Порядок разработки, согласования, утверждения, учета и распространения документов. Целостность данных – принципы ALCOA/ALCOA +	2
	7. Технологический регламент производства лекарственного препарата. Технологическая (маршрутная) карта производства серии лекарственного препарата. Материальный баланс стадии и серии	1
	8. Контроль качества лекарственных препаратов. Методы контроля	1
	9. Обеспечение холодовой цепи в процессе производства, хранения и при транспортировке лекарственных препаратов	1
	10. Валидация процесса производства лекарственных средств для ветеринарного применения. Квалификация «чистых» помещений, складов, технологического оборудования, инженерных систем	1
Практические занятия	1. Персонал. Порядок переодевания для работы в чистой/заразной зоне	1
	2. Техника безопасности и правила работы с вируссодержащим материалом. Методы поддержания, учёт и хранение вирусов. Дезинфекция и утилизация отходов	2
	3. Посев и сохранение культур бактерий. Дезинфекция и утилизация отходов	2
	4. Документация. Виды документации. Порядок разработки, согласования, утверждения, учета и распространения документов. Целостность данных- принципы ALCOA/ALCOA +	1

Перед проведением процесса обучения с целью оценки эффективности разработанной учебной программы необходимо провести входной контроль. По окончании лекционного курса проводится тестирование для анализа степени усвоения содержания учебного материала и качества данного материала. В случае получения неудовлетворительных результатов у большинства обучающихся необходимо пересмотреть используемые для обучения учебные материалы. Возможно, потребуется их доработка. В завершении практической части обучающиеся должны продемонстрировать полученные навыки посредством решения ситуационных задач.

В рамках данной работы были изучены регламентирующие процесс обучения документы предприятия-производителя ветеринарных иммунобиологических препаратов. Также были определены ключевые темы обучения исходя из потребностей конкретного предприятия и была разработана программа обучения. Разработанная программа обучения может служить основой для дальнейшего совершенствования на предприятии. В дальнейшем планируется создание лекционных и проверочных материалов по одной из тем учебной программы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крыжановская ВС, Система документации на предприятии-производителе ветеринарных иммунобиологических препаратов. Сборник материалов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 2019; 32-35.

2. Крыжановская ВС, Разработка регламентирующей документации на предприятии-производителе ветеринарных иммунобиологических препаратов. Сборник материалов X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2020; 701-703.

3. Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 77 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Доступно по: http://docs.cntd.ru/document/456026099

4. Смирнов ВА, Горячкин ВВ, Шестаков ВН, Абрамович РА и др. Вызовы и проблемы в управлении оперативным персоналом при внедрении фармацевтической системы качества. Ремедиум. 2019;(4):51–55. DOI: http://dx.doi.org/10.21518/1561-5936-2019-4-51-55

5. Михайлова НИ, Иванова АВ, Кугач ВВ, Мацкевич ЛВ. Система обучения персонала на фармацевтическом предприятии (на примере ООО «Рубикон»). Вестник фармации. 2017;3(77):21-28.

SUMMARY

THE DEVELOPMENT OF THE PROGRAM OF TRAINING PRODUCTION PERSONNEL AT THE ENTERPRISE-MANUFACTURER OF VETERINARY IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS

Kryzhanovskaya V.S., 2st master student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

This paper attempted to develop a training program for production personnel, which is a key object of the pharmaceutical quality system, in the enterprise producing veterinary immunobiological drugs. For this purpose, the documents regulating the training process were studied at the enterprise producing veterinary immunobiological drugs, key training topics were identified and the training program was directly developed.

Key words: *production personnel, personnel training, personnel training program.*

REFERENCES

1. Kryzhanovskaya VS, Sistema dokumentacii na predpriyatii-proizvoditele veterinarnyh immunobiologicheskih preparatov. Sbornik materialov VII Vserossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacii v zdorov'e nacii», Sankt-Peterburg, 2019: 32-35. (in Russ)
2. Kryzhanovskaya VS, Razrabotka reglamentiruyushchej dokumentacii na predpriyatii-proizvoditele veterinarnyh immunobiologicheskih preparatov. Sbornik materialov X Vserossijskoj nauchnoj konferencii studentov i aspirantov s mezhdunarodnym uchastiem «Molodaya farmaciya – potencial budushchego», Sankt-Peterburg, 2020: 701-703. (in Russ)
3. Reshenie Soveta Evrazijskoj ekonomicheskoj komissii № 77 ot 03.11.2016 «Ob utverzhdenii Pravil nadlezhashchej proizvodstvennoj praktiki Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza». Available at: http://docs.cntd.ru/document/456026099 (in Russ)
4. Smirnov VA, Goryachkin VV, SHestakov VN, Abramovich RA et al. Vyzovy i problemy v upravlenii operativnym personalom pri vnedrenii farmacevticheskoj sistemy kachestva. Remedium. 2019;(4):51–55. DOI: http://dx.doi.org/10.21518/1561-5936-2019-4-51-55 (in Russ)
5. Mihajlova NI, Ivanova AV, Kugach VV, Mackevich LV. Sistema obucheniya personala na farmacevticheskom predpriyatii (na primere OOO «Rubikon»). Vestnik farmacii. 2017;3(77):21-28. (in Russ)

ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИАЛУРОНИДАЗЫ

Ладэ А.С., маг. 2 года обучения
Руководитель: **Котова Н.В.**, канд. хим. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.14, Российская Федерация
E-mail: aleksandra.ladje@pharminnotech.com

Препараты на основе гиалуронидазы нашли широкое применение в различных отраслях медицины, в том числе в эстетической поэтому их производство очень востребовано. Целью данной работы является обзор существующих на сегодняшний день технологий и способов получения гиалуронидазы.

Ключевые слова: *гиалуронидаза, лидаза, патенты, технология, способы, семенники крупного рогатого скота.*

Лидаза – это торговое название препарата, созданного на основе гиалуронидазы. Гиалуронидаза – это фермент, субстратом которого является гиалуроновая кислота. Этот белок катализирует реакцию разрушения О-гликозидных связей в молекуле гиалуроновой кислоты и её расщепления до более простых соединений – N-ацетилгликозамина и глюкуроновой кислоты.

Актуальность данной работы является в широком применении, которое лидаза нашла в медицине, в особенности, в её эстетической отрасли. Препараты на основе этого фермента используются, в первую очередь, для исправления дефектов, появившихся на коже – для удаления рубцов и шрамов. Кроме того, лидазой лечат различные заболевания опорно-двигательного аппарата.

Помимо этого, лидазой вполне успешно лечат язвы и гематомы, а также различные заболевания дыхательной системы, например, воспаления, локализованные в верхних дыхательных путях, или туберкулёз легких (ведь и в том, и в другом случае причина заболевания одинакова – повышенное образование соединительной ткани и, как следствие, скопление в этих участках гиалуроновой кислоты).

Известны случаи лечения лидазой офтальмологических заболеваний. Достигается это путём введения препарата под конъюнктиву и под нижнее веко.

Известны также случаи избавления человека с помощью лидазы от таких болезней, как тендовагинит – это происходящий в области влагалища сухожилия воспалительный процесс, и склеродермия (с греческого языка «склерос» переводится как «твёрдый», а «дерма» – как «кожа»; это синдром, характеризующийся повышенным образованием уплотнений из соединительной ткани и последующим её утолщением, а значит, опять же, скоплением гиалуроновой кислоты в больших концентрациях).

Американской компанией разработан «Halozyme Therapeutics» Препарат PEGPH20 («Пегилированная рекомбинантная человеческая гиалуронидаза») предполагается использовать в дермато-, эндокрино- и онкологии. Термин «пегилированная» обозначает, что этот фермент присоединен ковалентными связями к многоатомному спирту полиэтиленгликолю; проводится эта процедура с помощью электронно-лучевого синтеза. Основным применением данного препарата является рак молочной железы. В сочетании с моноклональным антителом Трастузумаб, которое специфически связывается с особыми рецепторами раковых клеток и уничтожает их данный препарат нашел широкое применение.

Производителем гиалуронидазы в России является компания «ООО «Самсон-Мед». Применяемая ей в настоящее время технология получения этого фермента является одной из самых эффективных. Первыми этапами данного метода является измельчение семенников крупного рогатого скота и их преэкстракция 0,1н. раствором уксусной кислоты. Далее идёт экстракция, для которой используется тот же раствор. В результате сепарации отделяется жмых. Лидазу осаждают ацетоном, промывают, фильтруют, переосаждают и сушка.

В 2018-ом году сотрудники «Самсон-Меда» предложили метод получения гиалуронидазы, включавший в себя экстрагирование семенников крупного уксусной кислотой, центрифугирование и ультрафильтрацию экстракта, диафильтрацию, стерилизующую фильтрацию и сублимационную сушку [1].

В Советском Союзе был запатентован способ получения лидазы, один из этапов которого заключался в диализе и отделении целевого фермента от примесей. Диализ предлагалось проводить при низких температурах – в пределах от 0 до 10 градусов Цельсия. Сам процесс, описанный в патенте, должен был выглядеть следующим образом: к семенникам приливали 0,1н. раствор уксусной кислоты. Затем, согласно патенту, должна была проводиться экстракция в течение 4 часов при непрерывном перемешивании; минимальная температура равна 2, а максимальная – 8 градусам Цельсия. Затем получившуюся массу предлагалось центрифугировать в течение 20 минут, при той же температуре, на частоте, достигавшей 3000 оборотов в минуту. Далее патентом предписывалась хроматографическая очистка. Проводиться она должна была путём сорбции на сульфокатионите марки КУ-23, уравновешенном раствором хлорида аммония [2].

В 1994-ом году был получен патент на более сложный метод. Первый этап предполагал помещение измельчённых семенников в снабжённый мешалкой аппарат для экстракции и его заполнение экстрагентом. Эта стадия также должна была проводиться при перемешивании. Далее следовал второй этап – разделение смеси, полученной в результате экстракции, на центрифуге. Третий этап процесса – получение осадка. Для этих целей к жидкости, оставшейся после центрифугирования, приливали ацетон, а когда осадок выпадал, его сушили и измельчали. Затем следовало растворение осадка и экстракция в воде, которую так же, как и на других этапах, постоянно перемешивали. Конечными стадиями стали фильтрация получившего экстракта через специальные пластины и лиофилизация [3].

Однако, ацетон применяется для осаждения не во всех технологиях. В 1996 году компания «Биолек» запатентовала способ, включающий в себя четырёхчасовую экстракцию, фильтрацию, ультрафильтрацию и осаждению лидазы хлороформом. После осаждения добавляют хлорид натрия и повторную фильтрацию [4].

Известен также хроматографический метод выделения и очистки гиалуронидазы. Первый этап заключается в экстрагировании уксусной кислотой. На следующей стадии экстракционную смесь предлагалось разделять на центрифуге, а затем пропускать через хроматографическую колонку с СМ-целлюлозой «Whatman» и сорбировать в присутствии полиэтиленгликоля. На последнем этапе планировалось осуществлять ультрафильтрацию тангенциальным способом. При этом наблюдается увеличение выхода целевого продукта [5].

Запатентован способ, на одном из этапов которого в качестве сорбента применяется глина. Семенники подвергаются 2-4-хчасовой экстракции раствором уксусной кислоты. Затем экстракт отделяется от жмыха и проходит сорбцию на глине. Другая особенность данного метода состоит в том, что при экстрагировании в ход идёт инертный газ. Изобретатели считали предлагаемый способ более простым. По их мнению, использование инертного газа помогало бы ускорить процесс и увеличить концентрацию получаемого на выходе целевого фермента [6].

Способ, запатентованный в 2000 году, включал в себя стадии, на которых применялись как низкие, так и высокие температуры. На первом этапе семенники экстрагировали уксусной кислотой, затем подвергали очистке на центрифуге, после чего проводили ультрафильтрацию. При ультрафильтрации для разбавления использовали раствор хлорида натрия концентрацией 0,9%. Далее проводилась стерилизующая фильтрация полученного фермента, а затем – его сублимация. Сублимировали лидазу при температурах, не превышающих сначала -40 градусов Цельсия, а затем – -20 градусов Цельсия. На конечных этапах её сушили при положительных температурах [7].

Метод, патент на который был опубликован в 1997 году, предлагал измельчать сырьё в аппарате, называемом «волчком», а затем приливать к нему водный раствор уксусной кислоты 1%-ной концентрации. Экстрагирование, при котором реакционную смесь непрерывно перемешивали, длилось 2 часа. Особенность этого процесса заключалась в том, что температура при нём увеличивалась и достигала 40 градусов Цельсия. Далее следовала фильтрация экстракта, а затем – ультрафильтрация, концентрирование и лиофильная сушка [8].

Есть запатентованные способы, при которых сырьём служили не семенники крупного рогатого скота, а половые органы морских животных. В 1995 году был опубликован патент на процесс, первой стадией которого было измельчение рыбьих молок, яичников морских млекопитающих и гонад моллюсков. Сырьё заливали 0,1н. раствором уксусной кислоты, после чего 4 часа экстрагировали, непрерывно перемешивая реакционную смесь. На следующих этапах проводились стандартные процедуры – фильтрация, стерилизующая фильтрация, концентрирование лидазы и сублимация [9]. Патент на похожую технологию, выданный сотрудникам Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, был опубликован в 1999 году. В этом патенте предлагалось измельчать рыбьи молоки и экстрагировать их 0.1н раствором уксусной кислоты. После этого полученный экстракт проходит центрифугирование и сепарирование. Следующий этап – сорбция на катионите КУ-23 и его промывка очищенной водой, а затем десорбция и осаждение сернокислым аммонием и обессоливание [10].

Известны также случаи получения гиалуронидазы путём микробного синтеза. Самый ранний из них был запатентован в 1965 году. Данный патент предписывал выращивать штамм гемолитического стрептококка группы А на кровяном скошенном агаре, а затем пересевать его в бульон и термостатировать. Затем предлагалось пропускать полученную жидкость сквозь асбест или центрифугировать её, а потом разделять на фракции методом высаливания сернокислым аммонием. Затем полученные жидкости отстаивались, а на следующий день центрифугировались и снова подвергались обработке сернокислым аммонием. На конечном этапе прибавляли холестерин и отправляли смесь в декантер-перемешиватель [11].

На описанную выше похожа технология, которая запатентована компанией, принадлежащая НИИ имени Гамалеи. Она предлагает высевать один из видов стрептококка на кровяный бульон и культивировать его, а потом проводить от 3 до 5 пассажей. Далее необходимо убедиться, что в полученной культуре отсутствуют посторонние микроорганизмы. Когда проверка успешно пройдена, культуральную жидкость фильтруют, а потом приливают к ней сульфат аммония, после чего полученную смесь нужно перемешать и поставить в холодильник. На конечных стадиях лидазу сепарируют и стерилизуют путём мембранной фильтрации [12].

В 2016 году велись работы по усовершенствованию технологии, в которой продуцентом являлся Streptomyces actinocidus. Культуральную жидкость разделяли на центрифуге. Нативный раствор поступал на стадию сорбции. Сорбентом служил карбоксильный катионит КМ-2П. Депигментация элюата осуществлялась активированным углём, затем фильтровали и промывали дистиллированной водой. Далее следовало осветление элюата, его ультрафильтрация и обессоливание. На следующем этапе к получившемуся элюату присыпали маннит, растворяли последний и добавляли соляную кислоту для доведения необходимого pH 7,4-7,5 раствора. На конечных стадиях его фильтровали и отправляли на лиофильную сушку [13].

Метод, предложенный в 2019 году, по своему исполнению напоминает описанный выше. Роль продуцента выполняет бактерия Ps. putida. После её ферментации так же проводится центрифугирование культуральной жидкости. Затем идёт подкисление и сорбция нативного раствора – в данном случае, сорбентом служил сульфокатионит КУ-23. Проводимые далее процедуры стандартны – в их числе промывка элюата дистиллированной водой и его десорбция, а также ультрафильтрация и лиофильная сушка [14].

В производстве гиалуронидазы заинтересована не только Российская Федерация, но и зарубежные государства – учёные из них давно ведут активные исследования в этой области. В 2010 году итальянские изобретатели создали и запатентовали метод, предлагавший использовать в качестве продуцента лидазы бактерию Streptomyces koganeinsis. Культуральную жидкость разделяли на центрифуге, а затем фильтровали тангенциальным способом. В результате получался супернатант, который подвергался диафильтрации и очистке путём сорбции на анионите [15].

В ходе данной исследовательской работы были исследованы существующие на сегодняшний день технологии и способы производства гиалуронидазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 2671537 Российская Федерация МПК A61K 35/52 C12N 9/26. Препарат гиалуронидазы и способ его получения. Арсамаков АА и др. Заявитель и патентообладатель ООО “Самсон Мед”. № 2016135507. Заявл. 01.09.16. Опубл. 02.11.18.

2. Пат. 827068 СССР МПК А 61К 37/48. Способ получения лидазы. Лазарева ИВ и др. Заявитель Ленинградское ордена Ленина ордена Трудового Красного знамени производственное объединение мясной промышленности имени С.М. Кирова. № 2620821/28-13. заявл. 03.05.78. Опубл. 07.05.81. Бюл. №17.

3. Пат. 1448443 Российская Федерация МПК А61К 35/48. Способ получения вещества, восстанавливающего функцию из семенников половозрелого скота. Морозов ВГ и др. Заявитель и патентообладатель Морозов ВГ. 4017727/14. Заявл. 08.01.86. опубл. 15.08.94.

4. Пат. 2054943 Российская Федерация. МПК А61К35/48. Способ получения лидазы. Мезин ИА и др. Заявитель и патентообладатель Харьк. предпр. по произ-ву ИБ и лек. преп.тов “Биолек”. № 5043835/14. Заявл. 30.03.92. Опубл. 27.02.96.

5 Патент 2027759 Российская Федерация МПК C12N 9/26. Способ получения гиалуронидазы. Пак ВН. Заявители Пак ВН, Офицеров ВИ. Патентообладатель Пак ВН. №5025578/13. Заявл. 03.02.1992. Опубл. 27.01.1995.

6. Патент 1666534 СССР МПК C12N 9/26. Способ получения ронидазы Стекольников ЛИ и др. Заявитель и патентообладатель Стекольников ЛИ и др. №4699964/13. Заявл. 30.07.91. Опубл. 12.05.89. Бюл. № 28.

7. Пат. 2090207 Российская Федерация МПК C12N9/26 A61K35/48. Способ получения тестикулярной гиалуронидазы Якин ОГ. Заявитель и патентообладатель Мун. унит. мед. предпр. Гор. центр крови «САНГВИС». № 98101258/14. Заявл. 22.01.98. Опубл. 20.06.00.

8. Пат. 2159248 Российская Федерация МПК C12N9/26 A61K358/48 35/52. Способ получения гиалуронидазы. Якин ОГ. Заявитель и патентообладатель Сазыкин ИС. № 93039113/14 заявл. 30.07.93. Опубл. 20.09.97.

9. Пат. 2036649 Российская Федерация МПК A61K35/48. Способы получения лидазы Эпштейн ЛМ, Ковалев НН, Фарцейгер АГ. Заявитель и патентообладатель Ковалев НН, Фарцейгер АГ. № 5019800/14. Заявл. 24.12.91. Опубл. 09.06.95.

10. Пат. 2126044 Российская Федерация МПК C12N 9/26. Способ получения гиалуронидазы. Глазова НВ. Заявитель и патентообладатель Глазова НВ. №95102697/13. Заявл. 23.02.95. Опубл. 10.02.99.

11. Пат. 173887 СССР МПК A61K 38/46. Способ получения стрептококковой гиалуронидазы. Могилевский-Гурвич МШ. Заявитель и патентообладатель Могилевский-Гурвич МШ. № 786340/31-16. Заявл. 12.07.62. Опубл. 06.08.65.

12. Пат. 2174557 Российская Федерация МПК C12N 9/26. Способы получения лидазы. Малофеева ТП. Заявитель и патентообладатель Предпр. по произв-ву бакпреп-тов науч.-иссл института эпид-гии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. № 5019800/14. Заявл. 22.11.00. Опубл. 10.10.01.

13. Хабриев РУ. Разработка технологии получения микробной гиалуронидазы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016;1:4-11.

14. Чипинский ЕВ. Разработка оптимальной технологической линии производства гиалуронидазы с использованием микробиологического синтеза. Научное обозрение. Педагогические науки. 2019;2-4:106-109

15. Пат. 2011150814 Российская Федерация МПК C12N 9/26. Внеклеточная гиалуронидаза из Streptomyces koganeinsis. Мессина Лучано, Ваккаро Сузанна Карузо Сальваторе, Дженнари Джованни. Заявитель Фидиа Фармачеутичи С.П.А. № 786340/31-16. Заявл. 12.07.62. Опубл. 06.08.65.

SUMMARY

THE TECHNOLOGIES OF OBTAINING OF HYALURONIDASE

Lade A.S., 6th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Hyaluronidase-based preparations have found a wide application in different branches of medicine, including aesthetic medicine, and that is why their production is very demanded. The goal of this work is exploring technologies and ways of obtaining hyaluronidase.

Key words: *hyaluronidase, lydasum, selection, technology, way, testicles of the cattle.*

REFERENCES

1. Pat. 2671537 Russian Federation IPC A61K 35/52 C12N 9/26. Preparation of hyaluronidase and the way of its obtaining. Arsamakov AA et al. applicant and patentee Samson-Med Ltd. № 2016135507. App. 01.09.16. Pub. 02.11.18. (in Russ)

2. Pat. 827068 USSR IPC A 61K 37/48. The way of obtaining lydasum. Lazareva IV et al. Applicant Production Association of the meat industry named after S.M. Kirov. № 2620821/28-13. App. 03.05.78. Pub. 07.05.81. Bul. №17. (in Russ)

3. Pat. 1448443 Russian Federation МПК A61K 35/48. The way of obtaining substance that reduces sexual function from testicles of the cattle. Morozov VG et al. Applicant and patentee Morozov VG. 4017727/14. App. 08.01.86. Pub. 15.08.94. (in Russ)

4. Par. 2054943 Russian Federation МПК A61K35/48. The way of obtaining hyaluronidase. Mezin IA et al.Applicant and patentee Khark. manufacturer of IB and med. prep. "Biolek". № 5043835/14. App. 30.03.92. Pub. 27.02.96. (in Russ)

5 Pat. 2027759 Russian Federation МПК C12N 9/26. The way of obtaining hyaluronidase. Park VN. Applicants Park VN, Ofitserov VI. Patentee Park. VN. №5025578/13. App. 03.02.1992. Pub. 27.01.1995. (in Russ)

6. Pat. 1666534 USSR IPC C12N 9/26. The way of obtaining rhonidase. Stekolnikov LI et al. Applicant and patentee Stekolnikov LI et al. №4699964/13. App. 30.07.91. Pub. 12.05.89. Bul. № 28. (in Russ)

7. Pat. 2090207 Russian Federation МПК C12N9/26 A61K35/48. The way of obtaining testicular hyaluronidase. Yakin OG. Applicant and patentee Mun. unit. med. ent. Urb. Blood centre «SANGVIS». № 98101258/14. App. 22.01.98. Pub. 20.06.00. (in Russ)

8. Pat. 2159248 Russian Federation МПК C12N9/26 A61K358/48 35/52. The way of obtaining hyaluronidase. Yakin OG. Applicant and patentee Sazykin IS. № 93039113/14. App. 30.07.93. Pub. 20.09.97. (in Russ)

9. Pat. 2036649 Russian Federation IPC A61K35/48. The ways of obtaining lydasum. Epstein LM, Kovalyov NN, Fartseiger AG. Applicant and patentee Epstein LM, Kovalyov NN, Fartseiger AG. № 5019800/14. App. 24.12.91. Pub. 09.06.95. (in Russ)

10. Pat. 2126044 Russian Federation IPC 9/26. The way of obtaining hyaluronidase Glazova NV. Applicant and patentee Glazova NV. №95102697/13. App. 23.02.95.Pub. 10.02.99. (in Russ)

11. Pat. 173887 USSR IPC A61K 38/46. The way of obtaining streptococcal hyaluronidase. Mogilevsky-Gurvich MS. Applicant and patentee Mogilevsky-Gurvich MS. № 786340/31-16. App. 12.07.62. Pub. 06.08.65. (in Russ)

12. Pat. 2174557 Russian Federation C12N 9/26. The ways of obtaining lydasum. Malofeeva TP. Applicant and patentee Manufacturer of bacterial preparations of research institute of epidemiology and microbiology named after N. F. Gamaleya of RAMS. № 5019800/14. App. 22.11.00. Pub. 10.10.01. (in Russ)

13. Khabriev RU. The development of technology of obtaining microbial hyaluronidase. The questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2016;1:4-11. (in Russ)

14. Chipinsky EV. The development of optimal technological line of producing hyaluronidase using microbiological synthesis. Scientific review. Pedagogical sciences. 2019;2-4:106-109 (in Russ)

15. Pat. 2011150814 Russian Federation IPC C12N 9/26. Extracellular hyaluronidase from Streptomyces koganeinsis. Messina Luciano, Vaccaro Susanna, Caruso Salvatore, Gennari Giovanni. App. Filia Farmaceutici S.P.A. № 786340/31-16. App. 12.07.62., Pub. 06.08.65. (in Russ)

В ПОИСКАХ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ. ОЦЕНКА АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ИНТЕРФЕРОНА-ЛЯМБДА 1-ГО ТИПА ПО ОТНОШЕНИЮ К ВИРУСУ ГРИППА А, ВИРУСУ ЧИКУНГУНЬЯ И КОРОНАВИРУСУ

Ложков А.А.[1,2], асп. 4 года обучения, **Плотникова М.А.**[2], **Каа К.В.**[3]

Руководитель: **Васин А.В**., д.б.н., проф.[1,2,4]

[1]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29, Российская Федерация

[2] ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15/17, Российская Федерация

[3] ФГБНУ «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова»,
108819, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита,
домовладение 8, стр. 1, Российская Федерация

[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация

E-mail: aswert6@mail.ru

Одним из подходов профилактики и лечения вирусных инфекций является стимуляция компонентов системы врожденного иммунного ответа организма. Интерфероны-λ являются важнейшим звеном иммунного ответа и обеспечивают защиту клеток респираторного эпителия от широкого спектра вирусных патогенов. Целью данного исследования является оценка терапевтического потенциала рекомбинантного интерферона-λ 1-го типа по отношению к вирусу гриппа А, вирусу Чикунгунья и коронавирусу.

Ключевые слова: *Врожденный иммунный ответ, интерфероны-λ, MxA, вирус гриппа А, вирус Чикунгунья.*

Несмотря на десятилетия активного изучения и существенные успехи в вакцинологии, высокая заболеваемость вирусом гриппа остается существенной проблемой здравоохранения. Во всем мире ежегодные сезонные эпидемии являются причиной гибели до полумиллиона человек [1]. В силу высокой частоты мутаций вируса гриппа на данный момент не представляется возможным создать универсальную вакцину, которая обеспечила бы надежную защиту против всех возможных штаммов [2]. Относительно актуальности проблемы коронавирусной инфекции излишне напоминать. Лихорадка Чикунгунья – вирусное заболевание, передаваемое людям при укусах комаров, зараженных вирусом Чикунгунья (CHIKV). В настоящее время вакцины или специфического лекарственного препарата против данного вируса не имеется. Лечение направлено, главным образом, на облегчение симптомов заболевания. Данный вирус, в основном, распространен в Африке и странах Южной Азии [3].

Одним из перспективных подходов является стимуляция компонентов врожденного иммунного ответа организма [1]. Интерфероны играют важнейшую роль в иммунном ответе, подавляя распространение вирусной инфекции на ранних стадиях заболевания, и формируют первую линию защиты против вирусных инфекций у млекопитающих. Согласно аминокислотной последовательности и типу рецептора, через который опосредована передача сигнала, интерфероны подразделяются на три группы: интерфероны 1-го, 2-го и 3-го типа. Интерфероны 3-го типа (интерфероны-λ, IFN-λ) были открыты только в начале этого века. Данная группа интерферонов родственна интерферонам 1-го типа (интерферонам-α и интерферонам-β) и демонстрирует сходное с ними антивирусное действие [4].

В организме человека обнаружено четыре подтипа IFN-λ: IFN-λ1 (IL-29), IFN-λ2 (IL-28A), IFN-λ3 (IL-28B) и IFN-λ4. IFN-λ взаимодействуют гетеродимерным рецептором IFNLR, состоящим из субъединиц IFNλR1 и IL10R2. Если субъединица IL10R2 также входит в состав рецепторных комплексов для IL-10, IL-22 и IL-26 и экспрессируется в клетках различных тканей, то субъединица IFNλR1 отвечает за специфическое связывание с IFN-λ, и ее экспрессия в основном происходит в эпителиальных клетках, кератиноцитах и дифференцированных дендритных клетках. Следовательно, слизистые дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта – ткани, на которые направлено селективное действие IFN-λ, что обеспечивает высокую эффективность данного цитокина при борьбе против вирусов с повышенным тропизмов к эпителиальным тканям [4].

Синтезированный клеткой IFN-λ секретируется в межклеточное пространство. При связывании IFN-λ происходит димеризация субъединиц рецептора, приводящая к активации JAK/STAT-зависимых сигнальных путей, фосфорилированию белков STAT1 и STAT2, формированию транскрипционного комплекса ISGF3. Данный комплекс индуцирует экспрессию сотен генов *ISG (Interferon stimulated genes)*, к продуктам которых относятся проявляющие выраженную антивирусную активность белки MxA, OAS, PKR, IFITM [4]. Способность IFN-λ вызывать активацию более узкой группы генов в сравнительно небольшой группе клеток-мишеней, экспрессирующих IFNLR, позволяет считать данный тип интерферонов перспективным терапевтическим агентом, который может вызывать более направленный антивирусный и иммунный ответ чем интерфероны других типов [5].

Цель работы заключалась в оценке противовирусной активности полученного рекомбинантного человеческого IFN-λ1 по отношению к пандемическому штамму вируса гриппа A/California/04/2009 на линии клеток A549, а также по отношению к вирусу Чикунгунья и коронавирусу на линии клеток Vero.

В задачи исследования входили:

1) Оценка биологической активности рекомбинантного IFN-λ1 с помощью определения уровня экспрессии *MxA* методом ОТ-ПЦР;

2) Оценка противовирусной активности рекомбинантного IFN-λ1 по отношению к вирусу гриппа А с помощью определения вирусной нагрузки в лизате и супернатанте клеток A549 методом ИФА и уровня экспрессии гена *NP* вируса гриппа методом ОТ-ПЦР;

3) Оценка противовирусной активности рекомбинантного IFN-λ1 по отношению к вирусу Чикунгунья и коронавирусу на линии клеток Vero.

В ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России было осуществлено клонирование рекомбинантного белка IFN-λ1 человека в Escherichia coli. Наработанный IFN-λ1 был выделен из телец включения и очищен. Рефолдинг белка проводился в PBS, содержащим 0,1% Твин-20.

Оценка биологической активности IFN-λ1. В работе использовали клетки линии A549 (Gibco, USA). Клетки A549 культивировали в среде F12K (Gibco, USA), с 10% FBS (Gibco, USA). Монослой клеток промывали DPBS (Gibco, USA), к клеткам добавляли новую среду F12K, содержащую рекомбинантный IFN-λ1 в концентрации 10 нг/мл. После суток инкубации при 37 °C в 5% CO_2, клетки промывали DPBS, добавляли свежую среду F12K. Интактные и обработанные рекомбинантным IFN-λ1 клетки собирали после 10 или 24 часов инкубации (37 °C в 5% CO_2). Методом ОТ-ПЦР была показана биологическая активность IFN-λ1.

Оценка противовирусного действия по отношению к вирусу гриппа А. Клетки A549 культивировали в среде F12K, с 10% FBS. Монослой клеток промывали DPBS. К клеткам A549 добавляли IFN-λ1 в дозах от 240 нг/мл до 10 нг/мл. Проводили инкубацию клеток в течение суток (37 °C в 5% CO_2). Монослой клеток промывали DPBS и инфицировали вирусом гриппа А (Influenza A virus, IAV), штамм A/California/07/09 ((A)H1N1pdm09) в дозах заражения от 2 до 0,001 MOI. Для заражения использовался объем 0,5 мл. После 60 мин адсорбции при 37 °C вирус удаляли, добавляли 1 мл свежей среды, клетки инкубировали (37 °C в 5% CO_2). Инфицированные культуры клеток и неинфицированные контрольные образцы собирали через 10 и 24 часа после заражения вирусом.

Оценка противовирусного действия по отношению к вирусу Чикунгунья. Оценка противовирусного действия проводилась на линии клеток Vero. Культуру клеток рассевали на 24-луночный планшет, посадочная концентрация клеток составляла 150-200 тысяч клеток/мл. На 2-3 сутки по достижению конфлюэнтного монослоя проводили постановку опыта. Клетки были заражены CHIKV (титр $10^{-8,04}$lg $ТЦД_{50}$/мл) в разведении 25 бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100 мкл. Противовирусная активность определялась по трем различным схемам: профилактическая, лечебно-профилактическая и лечебная. Профилактическая схема – нанесение разведений IFN-λ1, адсорбция 1 час, добавление поддерживающей питательной среды. Через 24 часа добавление вируса в объеме 100 мкл, адсорбция 1 час, добавление покрытия. Лечебно-профилактическая – нанесение вируса на плашку, нанесение разведений IFN-λ1, адсорбция 1 час, далее добавление покрытия. Лечебная – нанесение вируса на плашку, адсорбция 1 час, далее добавление разведений IFN-λ1 и покрытие.

Оценка противовирусного действия по отношению к коронавирусу. Культуру клеток рассевали на 96-луночный планшет, посадочная концентрация клеток составляла 150-200 тысяч клеток/мл. На 3-4 сутки по достижению конфлюэнтного монослоя проводили постановку опыта. Для заражения был использован штамм SARS-CoV-2 (GISAID ID EPI_ISL_428851), выделенный из назо-фарингального мазка больного COVID-19. Штамм прошел четыре последовательных пассажа в культуре клеток Vero. На среде ДМЕМ готовили 2-кратные разведения IFN-λ1 и вируса. Вирус разводили до концентрации около 100 $ТЦД_{50}$/лунку. Далее опыт проводили в 2 постановках:

1. разведения смешивали 1:1 с вирусом; смеси инкубировали 1 ч при 37 °C, после чего добавляли к монослою клеток Vero в 4-х повторах;

2. разведения соединений добавляли к монослою клеток в 4-х повторах, инкубировали 2 ч при 37 °C, после чего к обработанным клеткам добавляли вирус.

В экспериментах в качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду, в качестве положительного – контроля β-d-N^4-гидроксицитидин. Учёт цитопатического действия проводили визуально на 5 сутки после заражения. Расчёт титра антител проводили по формуле Кербера (таблица 2).

Оценка биологической активности. Отмечено повышение уровня экспрессии гена *MxA* при обработке в течении 10 часов клеток рекомбинантным IFN-λ1 в концентрации 10 нг/мл по сравнению с интактными A549 (рис. 1). Уровень экспрессии *MxA* возрастал примерно на два порядка. Так как *MxA* относится к группе *ISG*, то возрастание уровня экспрессии данного гена может судить об активации IFN-λ-зависимого противовирусного ответа клетки.

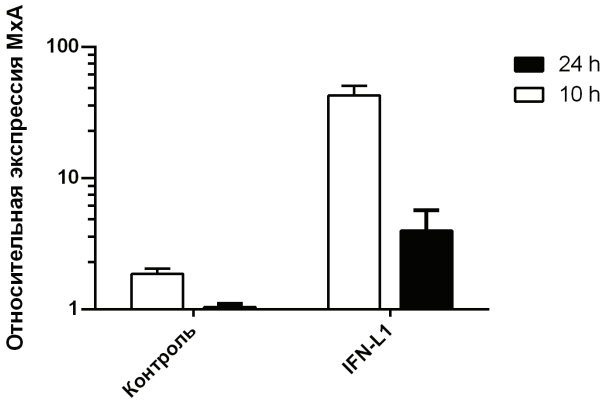


Рисунок 1. Изменение уровня экспрессии *MxA* при обработке клеток IFN-λ1 в дозе 10 нг/мл. По оси ординат показан относительный уровень экспрессии гена, по оси абсцисс указаны условия инкубации клеток

Оценка противовирусного действия по отношению к вирусу гриппа А. Было продемонстрировано противовирусное действие IFN-λ1 по отношению к IAV. В лизатах клеток A549 показано достоверное снижение вирусной нагрузки в уже дозах 0,064 MOI, различия также были и при более низком уровне вирусной нагрузки − вплоть до 0,001 MOI. При более высоких дозах заражения, вероятно, реализуется цитопатическое действие вируса. Для каждой из концентраций вируса в диапазоне 0,001-0,064 MOI наблюдалось дозозависимое снижение титра вируса по сравнению с необработанными IFN-λ1 клетками A549 (рис. 2). Более того, схожие результаты были получены и при исследовании супернатантов клеточной культуры в дозах вируса в диапазоне от 0,001 MOI до 0,064 MOI. Для супернатантов зависимость вирусной нагрузки от концентрации IFN-λ1 имела более выраженный характер, и IFN-λ1 в уже концентрации 10 нг/мл снижал вирусную нагрузку более чем на четверть, а в концентрации 240 нг/мл – почти до нуля.

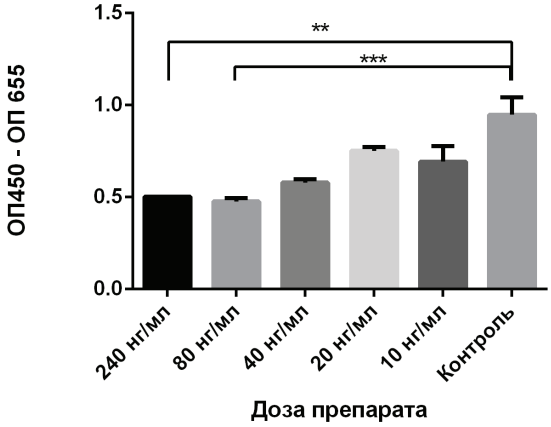


Рисунок 2. Изменение вирусной нагрузки при обработке клеток линии A549 различными дозами IFN-λ1. По оси ординат показан уровень сигнала (относительных единиц) в ИФА, по оси абсцисс указаны концентрации IFN-λ1; для оценки статистической достоверности использован непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями; ** – P < 0,01; * – P < 0,001**

Более того, методом ОТ-ПЦР показано, что экспрессия вирусного гена *NP* была снижена более чем на порядок, при обработке клеток A549 IFN-λ1 уже в концентрации 10 нг/мл, через 24 часа после заражения (рис. 3).

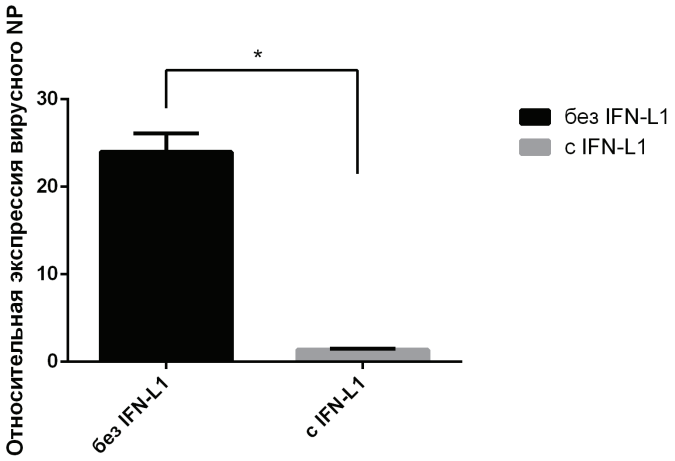


Рисунок 3. Изменение экспрессии *NP* вируса гриппа А при обработке клеток IFN-λ в дозе 10 нг/мл. По оси ординат показан относительный уровень экспрессии NP. Для оценки статистической достоверности использован непараметрический критерий Манна-Уитни; * – P < 0,05

Оценка противовирусного действия по отношению к вирусу Чикунгунья. При изучении профилактической схемы отмечалась тенденция к подавлению репликации вируса от меньшей концентрации препарата к большей (таблица 1).

Таблица 1 – Противовирусная активность IFN-λ1 по отношению к CHIKV

Концентрация IFN-λ1 (нг/мл)	**Результат испытания** IFN-λ1											
	Лечебная схема				Лечебно профилактическая схема				Профилактическая схема			
	Количество бляшек			среднее	Количество бляшек			среднее	Количество бляшек			среднее
10 нг/мл	68	67	71	68	35	37	37	36	60	67	58	61
100 нг/мл	70	60	73	67	32	30	31	31	28	38	36	34
500 нг/мл	83	67	68	72	30	30	34	31	30	26	30	28
Контроль												
25 БОЕ	41	39	43	41	56	50	46	50	55	62	51	56
10 нг/мл	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 нг/мл	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500 нг/мл	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EC_{50}	**> 500 нг/мл**				**> 500 нг/мл**				**499,99**			

При использовании концентрации 500 нг/мл IFN-λ1 отмечалось достоверное, по сравнению с контролем, подавление репликации вируса. В данной схеме IFN-λ1 оказал противовирусное действие, полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) равна 499,99 нг/мл.

При лечебно-профилактической схеме также наблюдается тенденция подавления вирусных бляшек по сравнению с вирусным контролем, но при использованных концентрациях IFN-λ1 полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) равна больше 500 нг/мл.

При лечебной схеме постановки анализа, когда в самом начале вирус адсорбируется на поверхности клеток и затем добавляется IFN-λ1, наблюдается усиление действия вируса на клетки. Можно предположить, что при проникновении вируса в клетку в отсутствии IFN-λ1 происходит «нормальная» реакция клеток, добавление интерферона на ранних стадиях инфекции по-видимому способствует репликации вируса.

Оценка противовирусного действия по отношению к коронавирусу. Признаки цитопатического эффекта, производимого SARS-CoV-2 на клетки Vero, присутствовали как во всех экспериментальных лунках с IFN-λ1, как в лунках отрицательного контроля. В свою очередь, соединение сравнения (β-d-N4-гидроксицитидин) ингибировало развитие цитопатического эффекта. Так, в лунках с константами эффективной концентрации β-d-N4-гидроксицитидин более 9,21 μM, в постановке с преинкубацией соединения с клетками и последующим заражением SARS-CoV-2, и в концентрации более 10,95 μM, в постановке с преинкубацией соединения с вирусом с последующим добавлением к клеткам, отмечено отсутствие цитопатического эффекта. что соответствует ранее полученным результатам (таблица 2, таблица 3).

Таблица 2 – Результаты экспериментов с SARS-CoV-2. Эксперименты с β-d-N4-гидроксицитидином

Концентрация соединения (μM)	**Результат испытания β-d-N4-гидроксицитидина** преинкубация соединения с клетками с последующим заражением				**Результат испытания β-d-N4-гидроксицитидин** преинкубация соединения с вирусом с последующим добавлением к клеткам			
	Оценка ЦПЭ в баллах				Оценка ЦПЭ в баллах			
100	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0
12,5	0	0	0	0	4	0	0	0
6,25	4	4	4	4	4	4	4	4
3,125	4	4	4	4	4	4	4	4
1,5625	4	4	4	4	4	4	4	4
0,78125	4	4	4	4	4	4	4	4
EC_{50}	**9,21**				**10,95**			

Таблица 3 – Эксперименты с IFN-λ1

Концентрация соединения (нг/мл)	**Результат испытания соединения** преинкубация соединения с клетками с последующим заражением				**Результат испытания соединения** преинкубация соединения с вирусом с последующим добавлением к клеткам			
	Оценка ЦПЭ в баллах				Оценка ЦПЭ в баллах			
3100	4	4	4	4	4	4	4	4
1550	4	4	4	4	4	4	4	4
775	4	4	4	4	4	4	4	4
387,5	4	4	4	4	4	4	4	4
193,75	4	4	4	4	4	4	4	4
96,875	4	4	4	4	4	4	4	4
48,4375	4	4	4	4	4	4	4	4
24,21875	4	4	4	4	4	4	4	4
EC_{50}	**>3100**				**>3100**			

Оценка цитопатического эффекта:
0 баллов – признаков не выявлено
1 балл – 0-25% монослоя клеток
2 балла – 25-50% монослоя клеток
3 балла – 50-75% монослоя клеток
4 балла – 75-100% монослоя клеток

В ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России был успешно клонирован IFN-λ1 человека, белок очищен от примесей. Полученный белок проявляет выраженную биологическую активность и вызывает экспрессию гена *MxA*, канонического антивирусного гена, индуцируемого действием интерферонов. Было продемонстрировано, что рекомбинантный IFN-λ1 обладает противовирусной активностью по отношению к пандемическому штамму вируса гриппа A/California/04/2009, снижая вирусную нагрузку в лизате и супернатанте клеток линии A549, в дозах заражения вирусом 0,001-0,064 MOI. Более того, IFN-λ1 оказывает подавляющее противовирусное действие на вирус Чикунгунья при использовании профилактической схемы постановки анализа. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) равна 499,99 нг/мл. Однако, ни в одном из вариантов постановки IFN-λ1 не оказал протективного действия по отношению к коронавирусу SARS-CoV-2.

Работа выполнена в рамках Государственного задания на проведение фундаментальных исследований 0784-2020-0023.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cole SL, Ho L-P. Contribution of innate immune cells to pathogenesis of severe influenza virus infection. Clinical Science [Internet]. Portland Press Ltd. 2017 Jan 20;131(4):269–83. Available at: http://dx.doi.org/10.1042/cs20160484

2. Hayden FG, de Jong MD. Emerging Influenza Antiviral Resistance Threats. Journal of Infectious Diseases [Internet]. Oxford University Press (OUP). 2011 Jan 1;203(1):6–10. Available at: http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq012

3. Ferreira-Sarmiento S, Lastra-Terán KP, de la Rosa D, Viasus D. Severe Chikungunya virus infection. Salud Uninorte [Internet]. Universidad del Norte. 2015 Jun 1;31(3):631–41. Available at: http://dx.doi.org/10.14482/sun.31.3.7352

4. Lozhkov AA, Klotchenko SA, Ramsay ES, Moshkoff HD, Moshkoff DA, Vasin AV, et al. The Key Roles of Interferon Lambda in Human Molecular Defense against Respiratory Viral Infections. Pathogens [Internet]. MDPI AG. 2020 Nov 26;9(12):989. Available at: http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9120989

5. Davidson S, McCabe TM, Crotta S, Gad HH, Hessel EM, Beinke S, et al. IFNλ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFNα treatment. EMBO Molecular Medicine [Internet]. EMBO. 2016 Aug 12;8(9):1099–112. Available at: http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201606413.

SUMMARY

IN SEARCH FOR UNIVERSAL ANTI-VIRAL. ASSESSMENT OF THE ANTI-VIRAL ACTIVITY OF INTERFERON-LAMBDA TYPE 1 WITH RESPECT TO INFLUENZA VIRUS A, CHIKUNGUNA VIRUS AND CORONAVIRUS

Lozhkov A.A.[1,2], 4th year graduate student, **Plotnikova M.A.**[2], **Kaa K.V.**[3]
[1] Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,
St. Petersburg, 195251, Russian Federation
[2] Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health,
St. Petersburg, 197376, Russian Federation
[3] Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products
of Russian Academy of Sciences,
108819, Moscow, Russian Federation
[4] St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
14, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

One of the approaches to the prevention and treatment of viral infections is to stimulate the components of the innate immune response system. Interferons-λ are important mediators in the immune response and protect the cells of the respiratory epithelium from a wide range of viral pathogens. The aim of this study is to assess the therapeutic potential of recombinant type 1 interferon-λ in relation to influenza A virus, Chikungunya virus and coronavirus.

Key words: *Innate immune response, interferons-λ, MxA, influenza A virus, Chikungunya virus.*

REFERENCES

1. Cole SL, Ho L-P. Contribution of innate immune cells to pathogenesis of severe influenza virus infection. Clinical Science [Internet]. Portland Press Ltd. 2017 Jan 20;131(4):269–83. Available at: http://dx.doi.org/10.1042/cs20160484

2. Hayden FG, de Jong MD. Emerging Influenza Antiviral Resistance Threats. Journal of Infectious Diseases [Internet]. Oxford University Press (OUP). 2011 Jan 1;203(1):6–10. Available at: http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq012

3. Ferreira-Sarmiento S, Lastra-Terán KP, de la Rosa D, Viasus D. Severe Chikungunya virus infection. Salud Uninorte [Internet]. Universidad del Norte. 2015 Jun 1;31(3):631–41. Available at: http://dx.doi.org/10.14482/sun.31.3.7352

4. Lozhkov AA, Klotchenko SA, Ramsay ES, Moshkoff HD, Moshkoff DA, Vasin AV, et al. The Key Roles of Interferon Lambda in Human Molecular Defense against Respiratory Viral Infections. Pathogens [Internet]. MDPI AG. 2020 Nov 26;9(12):989. Available at: http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9120989

5. Davidson S, McCabe TM, Crotta S, Gad HH, Hessel EM, Beinke S, et al. IFNλ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFNα treatment. EMBO Molecular Medicine [Internet]. EMBO. 2016 Aug 12;8(9):1099–112. Available at: http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201606413

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО β-ДЕФЕНСИНА 2 В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ CHO-K1

Мартышкина Ю.С., студ. 4 курса
Руководитель: **Янкелевич И.А.**, к.б.н.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: martyshkina.yuliya@pharminnotech.com

Разработан план проекта по получению рекомбинантного человеческого β-дефенсина 2 в клеточной линии CHO-K1.

Ключевые слова: *рекомбинатные белки, антимикробные пептиды, β-дефенсин 2, E. coli top 10, CHO-K1.*

Антимикробные пептиды (АМП) образуют большую группу молекул, играющих важную роль в реализации различных механизмов иммунного ответа и обеспечивающих первую линию защиты от инфекций у широкого круга живых организмов [1].

Одна из наиболее хорошо изученных групп АМП у позвоночных – дефенсины. Это низкомолекулярные катионные полипептиды с β-складчатой антипараллельной структурой. Молекулы дефенсинов характеризуются высоким содержанием основных аминокислот (аргинина, лизина, гистидина), поэтому имеют положительный заряд [1,2].

В настоящее время, описано три подсемейства дефенсинов: α-, β- и θ-. Их молекулы отличаются длиной и характером расположения дисульфидных связей: у α-дефенсиов между остатками цистеина в положениях 1–6, 2–4 и 3–5, у β-дефенсинов – в положениях 1–5, 2–4 и 3–6. В организме человека способны синтезироваться только α- и β-дефенсины [2,3].

На сегодняшний день, у человека описано 6 β-дефенсинов – hBD 1-6, среди них наиболее хорошо изучены и охарактеризованы hBD 1-4.

Различные β-дефенсины обладают широким спектром антимикробного, противогрибкого, противовирусного действия, некоторые обладают противоопухолевой активностью [4].

Кроме того, β-дефенсины играют важную роль в регуляции иммунного ответа. Известно, что они могут выступать как хемоаттрактанты для незрелых дендритных клеток (hBD 1-3), Т-лимфоцитов памяти (hBD 1,2), нейтрофилов и тучных клеток (hBD 2), моноцитов и макрофагов (hBD 3,4). Показано участие hBD 1 и 2 в активации тучных клеток. Следует отметить также, влияние hBD 1 и 3 на дифференцировку кератиноцитов, а hBD 2 – одонтобластов [5].

Многие β-дефенсины способны индуцировать секрецию различных цитокинов и хемокинов, таких как IL-6 (hBD 1,2,4), IL-8 (hBD 1-3), IL-10 (hBD 1,2,4), хемоаттрактантный белок 1 моноцитов MCP-1 (hBD 1-3) макрофагиальный белок воспаления MIP-1β (hBD 1,2) и другие [1,5,6].

Широким спектром биологических свойств β-дефенсинов обусловлена возможность разработки на их основе различных лекарственных препаратов, в т. ч. антимикробных средств, что особенно актуально в условиях развития резистентности микроорганизмов ко все большему числу антибиотиков.

Исследование, проведенное ранее в нашей лаборатории, выявило наличие экспрессии hBD 2 в гипоталамусе крыс (самцы линии Wistar) [неопубликованные данные]. Это может свидетельствовать о возможной нейроактивности hBD 2 и его роли в нейроиммунных взаимодействиях, однако эта область остается малоизученной, в связи с чем возникает интерес к дальнейшему изучению его свойств.

Выделение и очистка hBD 2 из тканей человека оказывается крайне трудоемким и невыгодным способом его получения, не позволяющим получить достаточные для применения в различных областях количества белка. В качестве альтернативы может рассматриваться получение hBD 2 путем химического синтеза – однако этот способ является достаточно дорогим. Поэтому приоритетным способом получения hBD 2 в настоящее время является рекомбинантный метод, который позволяет синтезировать белок в промышленных масштабах и достаточно выгоден с экономической точки зрения.

При экспрессии рекомбинантных дефенсинов в различных штаммах-продуцентах возникает ряд проблем: токсичность по отношению к клетке-хозяину; разложение пептидов протеолитическими ферментами клеток; малый размер молекул, усложняющий стабильную экспрессию; сложность в воссоздании нативной структуры белка и укладке его в правильную конформацию; низкий выход рекомбинантных белков [4,7].

В последнее время были получены различные типы рекомбинантных β-дефенсинов, преимущественно в прокариотических клетках [7].

Известно, что клетки яичника китайского хомячка (CHO) достаточно неприхотливы к условиям культивирования, экспрессируют белок в культуральную среду, что облегчает дальнейшие стадии выделения и очистки, а также способны осуществлять многие важные посттрансляционные модификации белковых молекул, в том числе формирование дисульфидных связей. Принимая во внимание особенности химической природы и пространственной структуры hBD 2 в качестве штамма-продуцента нами была выбрана клеточная линия CHO-K1.

Таким образом, целью настоящего проекта является получение рекомбинантного hBD 2 в клеточной линии CHO-K1.

Для достижения поставленной цели нами был разработан план реализации проекта (представлен ниже).

Этап 1. Конструирование различных вариантов рекомбинантных векторных плазмид

1. Конструирование различных вариантов рекомбинантного вектора на основе плазмиды pEE-HCLALA_ccdB-Stuffer (BIOCAD) в специализированном программном обеспечении (SnapGene)

- конструирование гибридного гена
- выбор сайтов рестрикции
- дизайн праймеров
- конструирование плазмиды, содержащей гибридный ген

2. Подготовка фрагмента-вставки гибридного гена. Обработка фрагмента-вставки рестриктазами. Очистка с помощью набора QIAquick PCR Purifcation Kit

3. Подготовка плазмиды-вектора

- Линеаризация плазмиды (обработка рестриктазами)
- Очистка плазмидной ДНК с помощью набора QIAquick PCR Purifcation Kit

4. Реакция лигирования, получение рекомбинантной плазмиды

5. Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле

Этап 2. Моделирование процесса получения рекомбинантного HBD 2

Этап 2.1. Клонирование различных вариантов рекомбинантных векторов в клетках E. coli top 10

1. Получение жизнеспособных клеток *E. coli top 10* из глицеринового стока и наращивание суспензионной культуры *E. coli top 10* в несколько этапов

2. Получение компетентных клеток *E. coli top 10*

3. Трансформация *E. coli top 10* рекомбинатным вектором, высев на селективную среду (LB-агар с ампициллином)
4. Оценка эффективности трансформации
5. Клонирование вектора в *E. coli top 10*
6. Выделение и очистка плазмиды с помощью набора QIAprep Spin Miniprep Kit (50)
7. Контроль выделенной плазмидной ДНК с помощью рестрикционного анализа и горизонтального электрофореза в агарозном геле

Этап 2.2. Оценка эффективности различных вариантов конструкций рекомбинатного вектора

1. Трансфекция клеток CHO-K1 различными вариантами рекомбинатного вектора с использованием Lipofectamin 3000 Reagent
2. Оценка эффективности трансфекции с помощью детекции флуоресценции GFP
3. Сбор культуральной жидкости, содержащей целевой белок HBD 2, его выделение и очистка
4. Количественный и качественный анализ характеристик целевого белка
5. Выбор оптимального варианта конструкции рекомбинантного вектора

Этап 2.3. Получение рекомбинантного белка с помощью штамма-продуцента CHO-K1

1. Трансфекция клеток штамма CHO-K1 выбранным рекомбинантным вектором
2. Культивирование трансфецированных клеток CHO-K1 в лабораторном биореакторе BIOSTAT A (Sartotius)
3. Сбор культуральной жидкости, содержащей целевой белок HBD 2, его выделение и очистка
4. Анализ различных характеристик целевого белка

В ходе выполнения плана проекта нами были составлены протоколы для осуществления различных методик. На данный момент реализован этап ступенчатого наращивания биомассы *E. coli top 10* (рис.1,2), получены компетентные клетки *E. coli top 10* (рис. 3), готовые к трансфекции. Отработана методика горизонтального ДНК-электрофореза в агарозном геле (рис. 4).

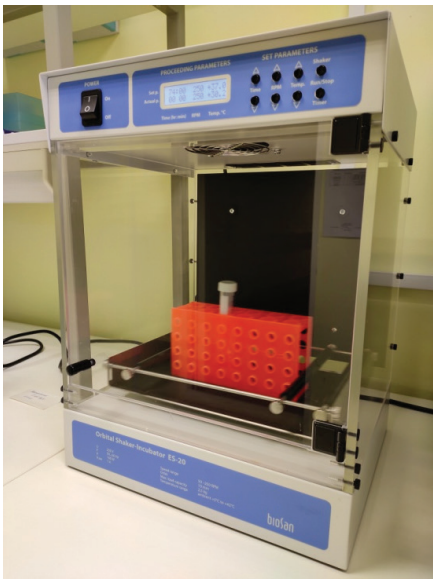


Рисунок 1. Этап ступенчатого наращивания биомассы *E. coli top 10* (пробирка 15 мл)

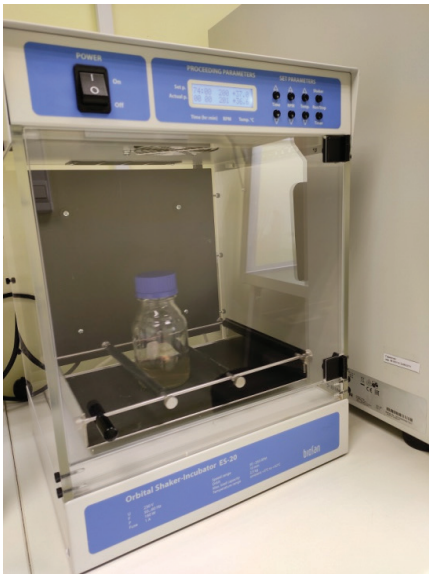


Рисунок 2. Этап ступенчатого наращивания биомассы *E. Coli top 10* (банка 250 мл)

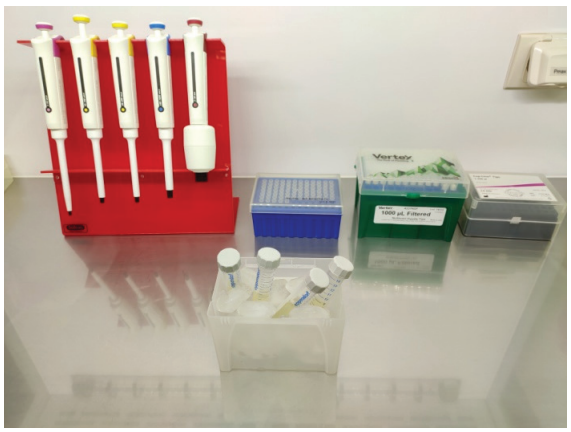


Рисунок 3. Этап получения компетентных клеток *E. coli top 10.* Инкубация на льду

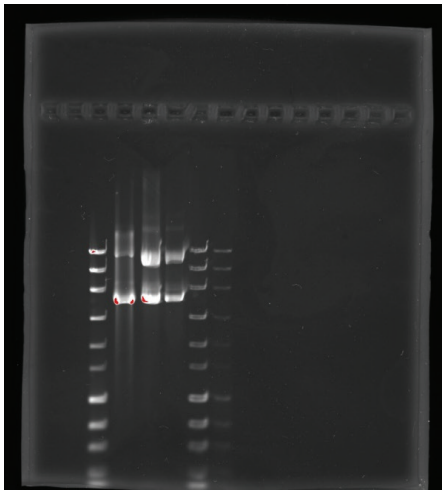


Рисунок 4. Отработка методики горизонтального ДНК-электрофореза в агарозном геле

По окончании реализации проекта будет разработан рекомбинантный вектор, содержащий ген hBD 2, и проведено моделирование процесса получения рекмбиантного hBD 2 в клеточной линии CHO-K1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Будихина АС, Пинегин БВ. Дефензины – мультифункциональные катионные пептиды человека. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008;2:31-40.

2. Мишланов ВЮ. Дефензины и другие противомикробные пептиды: роль нарушений белоксинтезирующей способности нейтрофилов в патогенезе заболеваний органов дыхания. Пульмонология. 2014;3:104-112.

3. Коновалова МВ, Зубарева АА, Луценко ГВ, Свирщевская Е.В. Антимикробные пептиды в норме и при патологиях (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. 2018;3:236–243 doi: 10.7868/S0555109918030029

4. Pazgier M, Li X, Lu W, & Lubkowski J. Human Defensins: Synthesis and Structural Properties. Current Pharmaceutical Design. 2007;13(30):3096–3118 doi: 10.2174/138161207782110381

5. Boniotto M, Jordan WJ, Eskdale J, Tossi A, Antcheva N, Crovella S, et al. Human β-Defensin 2 Induces a Vigorous Cytokine Response in Peripheral Blood Mononuclear Cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006;50(4):1433–1441 doi:10.1128/aac.50.4.1433-1441.2006

6. Dhople V, Krukemeyer A, & Ramamoorthy A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes. 2006;1758(9):1499–1512 doi: 10.1016/j.bbamem.2006.07.007

7. Corrales-Garcia LL, Possani LD, & Corzo G. Expression systems of human β-defensins: vectors, purification and biological activities. Amino Acids. 2010;40(1):5–13 doi: 10.1007/s00726-010-0493-7

SUMMARY

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN β-DEFENSIN 2 IN THE CHO-K1 CELL LINE

Martyshkina J.S., 4th year student
Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A project plan has been developed for the production of recombinant human β-defensin 2 in the CHO-K1 cell line.

Key words: *recombinant proteins, antimicrobial peptides, β-defensin 2, E. coli top 10, CHO-K1.*

REFERENCES

1. Budihina AS, Pinegin BV. Defenziny – mul'tifunkcional'nye kationnye peptidy cheloveka. Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya. 2008;2:31-40. (in Russ)

2. Mishlanov VYu. Defenziny i drugie protivomikrobnye peptidy: rol' narushenij beloksinteziruyushchej sposobnosti nejtrofilov v patogeneze zabolevanij organov dyhaniya. Pul'monologiya. 2014;3:104-112. (in Russ)

3. Konovalova MV, Zubareva AA, Lucenko GV, Svirshchevskaya EV. Antimikrobnye peptidy v norme i pri patologiyah (obzor). Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya. 2018;3:236–243 doi: 10.7868/S0555109918030029 (in Russ)

4. Pazgier M, Li X, Lu W, & Lubkowski J. Human Defensins: Synthesis and Structural Properties. Current Pharmaceutical Design. 2007;13(30):3096–3118 doi: 10.2174/138161207782110381

5. Boniotto M, Jordan WJ, Eskdale J, Tossi A, Antcheva N, Crovella S, et al. Human β-Defensin 2 Induces a Vigorous Cytokine Response in Peripheral Blood Mononuclear Cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006;50(4):1433–1441 doi:10.1128/aac.50.4.1433-1441.2006

6. Dhople V, Krukemeyer A, & Ramamoorthy A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes. 2006;1758(9):1499–1512 doi: 10.1016/j.bbamem.2006.07.007

7. Corrales-Garcia LL, Possani LD, & Corzo G. Expression systems of human β-defensins: vectors, purification and biological activities. Amino Acids. 2010;40(1):5–13 doi: 10.1007/s00726-010-0493-7

ПРИМЕНЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Мударисова Р.С., студ. 4 курса

Руководители: **Ананьева Е.П.**, канд. биол. наук, доцент, зав. кафедрой;

Мокроусов И.В., доктор биол. наук, зав. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики,

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация.

E-mail: mudarisova.regina@pharminnotech.com

Лекарственная устойчивость возбудителя туберкулеза является серьезной проблемой здравоохранения. Классические культуральные методы определения резистентности Mycobacterium tuberculosis имеют множество минусов. В данной статье рассматривается применение молекулярно-генетического метода определения резистентности бактерий как перспективной альтернативы. Исследование проводилось на 19 штаммах, выделенных от пациентов в процессе их длительного лечения. Была определена чувствительность и специфичность результатов используемого метода по сравнению с классическим. Также были выявлены мутации, ведущие к формированию резистентности, и их распространенность в выборке. В работе рассматривались 11 химиотерапевтических препаратов, обычно используемых в лечении туберкулеза.

Ключевые слова: *секвенирование нового поколения, резистентность, химиотерапевтические препараты, Mycobacterium tuberculosis, мутации, определение устойчивости.*

Туберкулез – опасное инфекционное заболевание, возбудителем которого является Mycobacterium tuberculosis (M.tub.). По статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2018 г. заболело 10 млн человек и умерло 1,2 млн человека. Россия входит в число 22 стран мира с наименее благоприятной ситуацией по заболеваемости туберкулёзом (44,4 случая на 100 тысяч населения) и в тройку стран с наибольшим распространением устойчивых форм заболевания. Глобальной угрозой является распространение устойчивых штаммов туберкулеза, обладающих множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ). [1]

В случае туберкулеза особенно важно определить профиль устойчивости возбудителя для назначения правильного лечения. Резистентность к химиотерапевтическим препаратам (ХТП) формируется в результате мутаций в определенных генах.

Существуют много методов определения устойчивости M.tub к ХТП. Среди них различают фенотипические (культуральные) и генотипические. Культуральный метод является классическим для определения устойчивости. Так как он является очень медленным, трудоемким и не всегда репрезентативным из-за особенностей роста возбудителя туберкулеза, то возникает необходимость в новых, более актуальных и современных подходах. Перспективными являются генотипические методы. Они используются для экспресс-диагностики мутаций, приводящих к устойчивости к лекарственным препаратам (ЛП). Генотипические методы являются быстрыми и точными, а также освобождают от необходимости работы с биологически опасным микроорганизмом. При использовании данного метода, обеспечивается своевременное и эффективное лечение инфекции. Поэтому эти методы являются перспективными и нуждаются в дальнейшей разработке. [2]

Цель: Применение секвенирования нового поколения для выявления изменений в геноме Mycobacterium tuberculosis, приводящих к устойчивости к химиотерапевтическим препаратам, в процессе длительного лечения больных туберкулезом.

Задачи:
- выявить все распространенные мутации, отвечающие за резистентность к ХТП;
- сравнить эффективность генотипического определения резистентности с классическими фенотипическими методами;
- определить период времени, необходимый для формирования резистентности к ХТП.

В исследование были включены 19 штаммов M.tub., выделенных от 8 пациентов в процессе их наблюдения в СПб НИИ Фтизиопульмонологии в 2010-2017 годах. ДНК выделяли стандартным методом. [3] Полногеномное секвенирование проводили на секвенаторе Illumina MiSeq Sequencing System (Illumina, США). Полученные данные секвенирования – короткие нуклеотидные последовательности были проанализированы с использованием онлайн ресурсов TB Profiler (https://tbdr.lshtm.ac.uk/) и PhyResSe (https://bioinf.fz-borstel.de/mchips/phyresse/) для определения мутаций в генах, ведущих к формированию резистентности ко всем ХТП. Программа PhyTB (http://pathogenseq.lshtm.ac.uk/phytblive/index.php) была использована для определения филогенетической принадлежности штаммов. Дополнительно полногеномые последовательности картировали на референтный геном стандартнтого лабораторного штамма (H37Rv) с использованием программы Geneious Prime (Biomatters, Новая Зеландия). Распространенность мутаций в опубликованных геномных данных проверяли по базе GMTV (https://mtb.dobzhanskycenter.org/cgi-bin/beta/main.py#custom/world).

Внутри вида M.tub разделяют 8 филогенетических линий различного географического распространения. В России преобладают Восточно-Азиатская (East-Asian или линия 2) и Евро-Американская (Euro-American или линия 4). [4]

Линия 2 отличается повышенной лекарственной устойчивостью и активным распространением. У представителей этой линии устойчивость к рифампицину, изониазиду и этамбутолу встречается чаще, чем у линии 4 из-за более высокой частоты мутаций в определенных генах. Тем не менее любая приобретенная резистентность к ХТП имеет свои последствия, в частности, ухудшается рост бактерий, способность к размножению и в целом ухудшение адаптации в организме хозяина (человека). Это происходит из-за модификации мишеней, изменения количества мишеней для ХТП, играющих важную роль в развитии микобактерии.

В России противотуберкулезные препараты разделены на 3 группы:

- ЛП 1-го ряда являются основными и назначаются для лечения всех туберкулезных больных (рифампицин и изониазид, рифабутин, пиразинамид, этамбутол, стрептомицин);
- ЛП 2-го ряда применяются, когда ЛП 1-го ряда не эффективны. Для больных с МЛУ и ШЛУ (канамицин, амикацин, капреомицин, левофлоксацин, моксифлоксацин, офлоксацин, циклосерин, аминосалициловая кислота). Из препаратов последних лет стоит выделить перхлозон и деламанид, разработанные в России. Это новые препараты, созданные за 35 лет;
- ЛП 3-го ряда используются в при устойчивости МТ к ЛП 1 и 2 ряда (линезолид, амоксициллина клавуланат, кларитромицин, имипинем, перопинем). Уровень их эффективности не доказан, поэтому рекомендуется применять их в особых случаях.

Механизм формирования резистентности микобактерий разнообразен. В основном механизм заключается в модифицировании мишени ХТП и нарушения регуляции экспрессии генов мишени, в связи с чем молекул-мишеней становится больше. Также, как в случае изониазида и пиразинамида, происходит модификация ферментов, активирующих поступивший в клетку ХТП.

Было определено, что 18 штаммов M.tub. относятся к семейству Beijing 2 филогенетической линии. Исследование одного штамма с помощью программы PhyTB показало принадлежность к виду Mecobacterium bovis, бычьему туберкулезу. Инфицирование пациента могло произойти через зараженное непастеризованное молоко.

Были выявлены SNP – мутации (single-nucleotide polymorphism) в определенных генах, которые приводят к резистентности возбудителя туберкулеза к 11 исследуемым в данном эксперименте ХТП. В генах, отвечающих за формирование резистентности к парааминосалициловой кислоте (ПАСК), этионамиду и капреомицину было выявлено по одному виду мутации – folC Ile43Thr, fabG1 C-15T promoter и rrs A1401G соответственно. К остальным исследуемым ЛП были обнаружены по несколько мутаций в разных генах. В качестве примера разнообразия мутаций, на рисунке 1 проиллюстрированы SNP-мутации к изониазиду, рифампицину (ЛП 1-го ряда), фторхинолонам и амикацину (ЛП 2-го ряда).

В формировании резистентности к разным ХТП участвует разное количество генов, что связано с различными мишенями. Например, в отношении изониазида обнаружено всего 2 вида мутаций, причем мутация fabG1 C-15T promoter обнаруживается у 84% изолятов, а katG Ser315Thr у 16%. А у других ЛП (например, рифампицин, фторхинолоны, амикацин) было выявлено множество разных SNP-мутаций. Доминирующими среди изолятов мутациями являются rpoB Ser450Leu (54%), rrs A1401G (44%), gyrA Asp94Gly (36%). При исследовании устойчивости к аминогликозидам (стрептомицин, амикацин, канамицин) была обнаружена определенная закономерность. Одна и та же мутация rrs A1401G приводит к устойчивости к антибиотикам одной группы и встречается среди изолятов с частотой от 25% до 44%.

Сравнение с базой данных GMTV позволило определить мутации среди изолятов, которые в этой базе отсутствовали. Для большей корреляции с глобальной базой данных необходимы дальнейшие исследования с большим количеством образцов. Среди исследуемых изолятов самыми распространенными оказались мутациями в генах katG, rpoB, embB, pncA, rpsL, fabG1 C-15T promoter, gyrA, rrs, eis C-10T promoter (см. рис. 1).

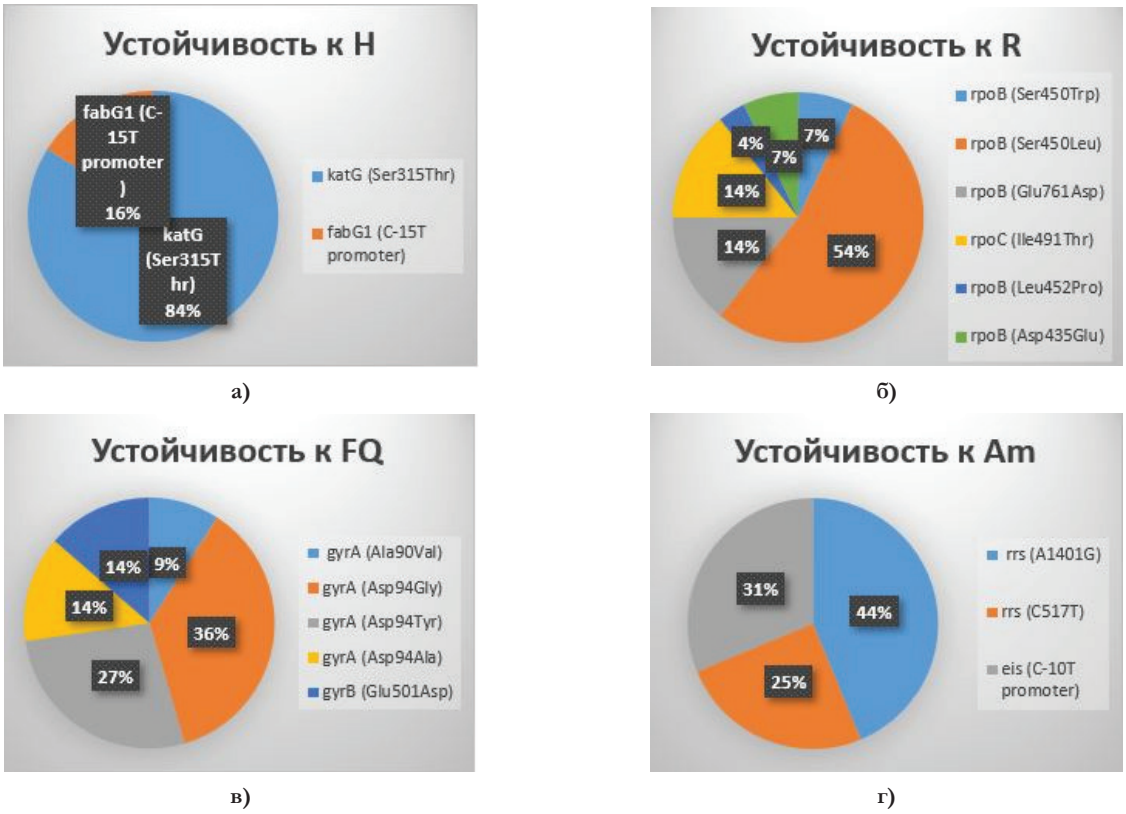


Рисунок 1. Распространенность мутаций среди изученных изолятов Mycobacterium tuberculosis к противотуберкулезным препаратам: а) изониазиду; б) рифампицину; в) фторхинолонам; г) амикацину

Следующим этапом было изучение динамики развития резистентности в генах. К таким препаратам, как изониазид, рифампицин, этамбутол, пиразинамид, стрептомицин, этионамид, амикацин, капреомицин и канамицин наблюдалась 100% резистентность внутри штаммов. Три штамма оказались гетерогенны по мутациям в генах устойчивости к фторхинолонам (gyrA) и пара-аминосалициловой кислоте (folC). У одного штамма процент мутировавших клеток с устойчивостью составлял 55,56% (gyrA Asp94Gly), у второго штамма – 51,72% с той же мутацией. У третьего штамма была выявлена гетерорезистентность по отношению к фторхинолонам в гене gyrA в 94 кодоне. У 68,83% популяции была обнаружена замена аденина (A) на гуанин (G), и 3,39% – аденина (A) на цитозин (C) (рис. 2.). Этот штамм также был гетерогенен по мутациям в другом кодоне gyrA (Ala90Val) 27,17% и folC (Ile43Thr) 77,78%. Молекулярно-генетический метод позволяет определить устойчивость к ХТП в процессе ее формирования. Его можно использовать для своевременной корректировки курса лечения пациентов.

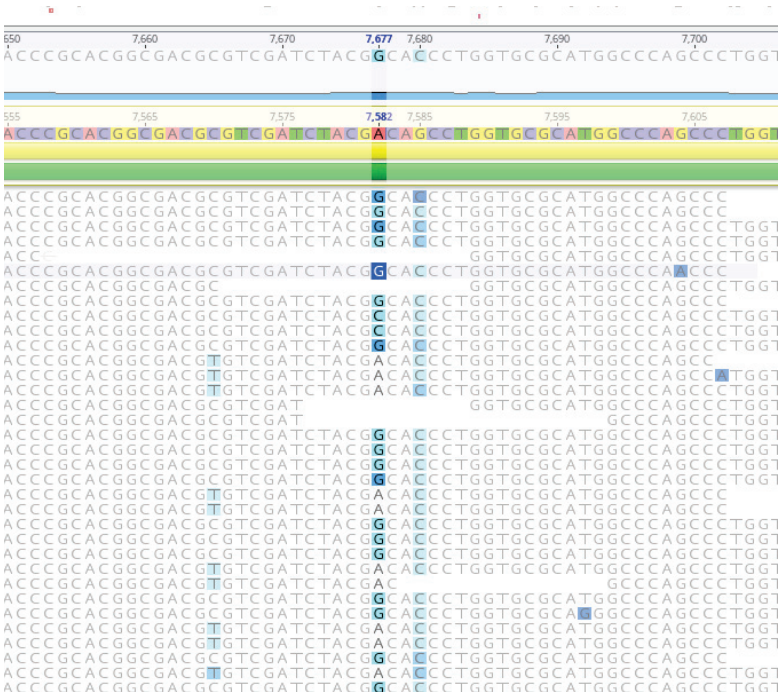


Рисунок 2. Гетерорезистентность штамма по отношению к фторхинолонам

В процессе длительного лечения комплексом ХТП, было показано, что возбудители туберкулеза, выделенные от пациентов, приобрели резистентность к большему числу препаратов. Резистентность развилась к пиразинамиду (Z), этионамиду (Eth), фторхинолонам (FQ), амикацину (Am), капреомицину (Cap), канамицину (Km), ПАСК (PAS). Усредненное время, необходимое для формирования резистентности, отображено на рисунке 3.

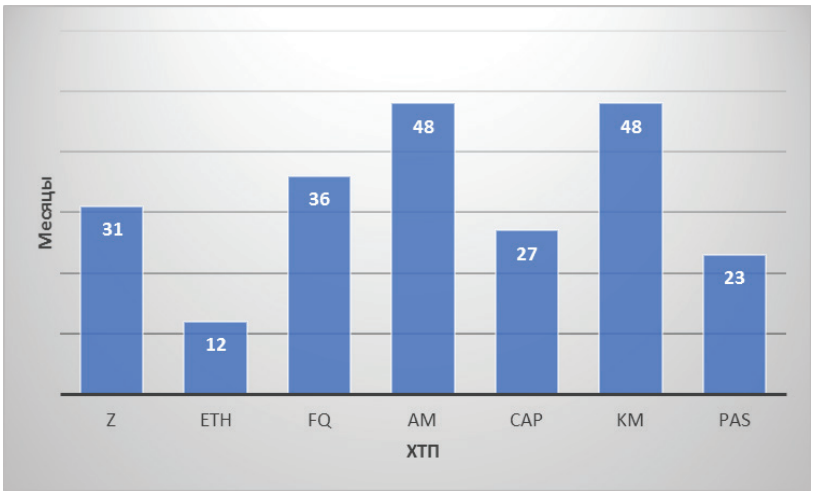


Рисунок 3. Время формирования резистентности Mycobacterium tuberculosis к противотуберкулезным препаратам

По результатам исследования, можно сделать вывод, что к этионамиду резистентность развилась быстрее всего (за 12 месяцев), а к амикацину и канамицину наиболее медленно (48 месяцев). Данный анализ носит предварительный характер, так как необходимо исследовать большее количество штаммов.

Было проведено сравнение результатов молекулярно-генетического и классического фенотипического метода определения устойчивости к ХТП у 14 штаммов. Сведения о фенотипической устойчивости были взяты из историй болезней пациентов. Была рассчитана чувствительность, специфичность, а также процент совпадений по каждому ХТП. Результаты приведены в таблице.

Таблица – Результаты сравнения генотипического и культурального методов

Название ХТП	Чувствительность	Специфичность
Изониазид (H)	100%	-
Рифампицин (R)	100%	-
Этамбутол (E)	100%	0%
Пиразинамид (Z)	0%	58,3%
Стрептомицин (S)	100%	-
Этионамид (Eth)	33,3%	100%
Фторхинолоны (FQ)	100%	42,9%
Амикацин (Am)	100%	28,6%
Капреомицин (Cap)	62,5%	66,7%
Канамицин (Km)	91,7%	100%
Пара-аминосалициловая кислота (ПАСК)	25%	90%

Специфичность не была определена для трех ХТП, т.к. все штаммы уже обладали резистентностью. Анализируя эту таблицу, можно сделать вывод, что метод секвенирования нового поколения является перспективным методом определения устойчивости. Расхождения связаны с малой выборкой, а также с тем, что еще не до конца изучены все мутации, способствующие формированию устойчивости к ХТП.

Молекулярно-генетические методы являются перспективными для экспресс-диагностики устойчивости к противотуберкулезным препаратам. При выявлении туберкулеза и в процессе его лечения данный метод позволяет быстро устанавливать профиль резистентности, что необходимо для назначения правильного лечения. Уже сейчас существуют качественные тест-системы для выявления устойчивости к некоторым препаратам, однако более подробное изучение генома M.tub. позволит определить мутации во всех генах, ведущих к резистентности, и оценить влияние различных противотуберкулезных препаратов на течение данных процессов. Расширяя познания в этой области, можно развить генотипические методы и разработать более эффективные системы для определения устойчивости уже ко всем ХТП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом, 2019 год [Интернет]. Женева: ВОЗ; 2019 г. Доступно по: https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2019_ExecutiveSummary_ru.pdf?ua=1

2. Шульгина МВ, Нарвская ОВ, Мокроусов ИВ, Васильева ИА. Патогенные и условно-патогенные микобактерии. М.: НЬЮ-ТЕРРА.

3. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. Journal of Clinical Microbiology [Internet]. American Society for Microbiology; 1993;31(2):406–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1128/jcm.31.2.406-409.1993

4. Gagneux S, editor. Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control. Advances in Experimental Medicine and Biology [Internet]. Springer International Publishing. 2017. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7

SUMMARY

APPLICATION OF NEXT GENERATION SEQUENCING IN IDENTIFYING THE RESISTANCE OF THE TUBERCULOSIS BACILLUS TO ANTIMICROBIAL

Mudarisova R.S., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Drug resistance of the tuberculosis bacillus is a serious public health problem. Drug resistance of the tuberculosis bacillus is a serious public health problem. Classical culture methods in identifying the resistance of Mycobacterium tuberculosis have a lot of disadvantages. In this article, the application of the molecular-genetic method in identifying the resistance of bacteria as a promising alternative is considered. The study was carried out on 19 strains isolated from patients during their long-term treatment. The sensitivity and specificity and percentage of matches of the used method`s results were determined in comparison with the classical one. Mutations leading to the resistance and their prevalence in the sample were also identified. In this study, the 11 chemotherapy drugs commonly used in the treatment of tuberculosis were considered.

Key words: *next generation sequencing, resistance, chemotherapy drugs, Mycobacterium tuberculosis, mutations, resistance identifying.*

REFERENCES

1. Vsemirnaya organizaciya zdravoohraneniya (VOZ). Doklad o globalnoj borbe s tuberkulezom, 2019 god [Internet]. Zheneva: VOZ, 2019. Available at: https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2019_ExecutiveSummary_ru.pdf?ua=1 (in Russ)

2. SHulgina MV, Narvskaya OV, Mokrousov IV, Vasileva IA. Patogennye i uslovno-patogennye mikobakterii. Moscow: NYU-TERRA. (in Russ)

3. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. Journal of Clinical Microbiology [Internet]. American Society for Microbiology. 1993;31(2):406–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1128/jcm.31.2.406-409.1993

4. Gagneux S, editor. Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control. Advances in Experimental Medicine and Biology [Internet]. Springer International Publishing; 2017. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7

РАЗРАБОТКА СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ α-АМИЛАЗЫ ИЗ ОКОЛОУШНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

Мухтар З.К., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Котова Н.В.**, канд. хим. наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: zere.muhtar@spcpu.ru

В статье представлены результаты исследований по подбору оптимальных условий экстракции α-амилазы из околоушной железы северного оленя, определен компонентный состав полученного экстракта, изучены равновесные параметры процесса сорбции α – амилазы на разных сорбентах.

Ключевые слова: *околоушная железа северного оленя, а-амилаза, сорбция, экстракция,гель-хроматография, гель-электрофорез.*

Производство ферментных препаратов является одним из перспективных направлений в биотехнологии. Особое значение в настоящее время приобретает получение лекарственных средств на основе ферментов из животного сырья,

которые могут успешно заменить продукты аналогичного действия, производимые химическим и микробиологическим синтезом. Гидролитические ферменты имеют ряд особенностей, выгодно отличающих их от других лекарственных средств: высокая эффективность в микроколичествах, высокая специфичность, быстрое достижение желаемого результата, возможность создания на их основе продукта с заданными свойствами. Актуальной задачей является поиск методов получения ферментативных препаратов из внутренних органов северного оленя.

Цели и задачи. Определение качественного и количественного состава содержания биологически активных веществ (БАВ) в околоушной железе северного оленя,а также подбор оптимальных условий выделения и очистки α – амилазы. На основании темы и сформулированной цели были поставлены следующие задачи:

- подобрать наиболее подходящийэкстрагент для проведения процесса экстракции α-амилазы из околоушной железы северного оленя;
- провести гель-хроматографический анализ белкового состава околоушной железы северного оленя;
- определить оптимальныеусловия проведения сорбции.

Объектами исследования являются: околоушная железа северного оленя. Для изучения параметров сорбции гидролитических ферментов использовались сорбенты различных структур:

- Сульфокатионит: КУ-23 (ООО «Химимпэкс», Россия), Purolite-C150, (PUROLITEinternationallimited, Великобритания);
- Карбоксильныйкатионит: Purolite-C115EC, (PUROLITE international limited, Великобритания);

Методы. Выделение α–амилазы из сырья северного оленя проводилось экстрагированием 0,9 % NaCl в течение 1 часа при температуре 5°С. После чего центрифугированием при температуре 5°С на лабораторной центрифуге UniCenMR «Herolab» при частоте вращения 11000 об/мин в течение 15 мин отделили осадок, а супернатант использовали в экспериментальных целях.

Общая концентрация белка определялась методом Лоури [1].

Амилолитическая активность определялась методом, основанным на количественном определении прогидролизованного крахмала в результате его гидролиза ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы в стандартных условиях (температура 30°С, значение pH 4.7, продолжительность гидролиза 10 мин) [2].

Изучение равновесных параметров процесса сорбции α – амилазы проводили на сорбентах КУ-23, С-150, С-115ЕС в статических условиях (концентрация сорбента 2 мг/мл; pH=3.5-3.8). По экспериментальным данным рассчитаны емкость сорбции, построены изотермы сорбции и выходные кривые сорбции и десорбции амилазы на разных сорбентах [3].

Характеристика сорбентов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика сорбентов

Сорбент	Средний размер зерна сорбента, мм	Коэффициент набухания	Насыпная плотность, г/см^3	Функциональные группы
КУ-23	0,25-0.4	1,5	0,6	SO3H-
С-150	0,3 – 0,4	5	0,785 – 0,825	SO3H-
С-115Е	0,3-0,4	5	0,66 – 0,705	COO-

Для определения оптимальных условий проведения процесса экстракции α – амилазы из околоушной железы северного оленя были проведены исследования зависимости концентрации белка в экстракте от использования различных экстрагентов. В качестве экстрагентов были выбраны уксусная кислота (0,01н, 0,1н уксусная кислота), серная кислота (0,01 н., 0,1 н. серная кислота) и изотонический раствор. На рисунке 1 представлена зависимость концентрации белка в экстракте от различных экстрагентов.

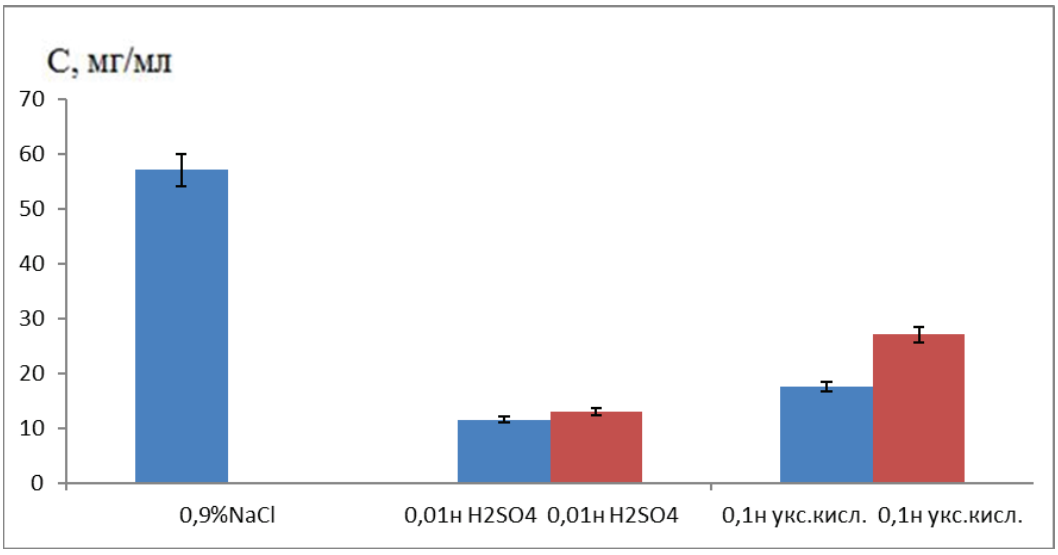


Рисунок 1. Зависимость концентрации белка в экстракте от различных экстрагентов

Показано, что оптимальным экстрагентом является 0,9 % NaCl, так как при его использовании концентрация белка в экстракте в 1,5-2 раза больше, чем при использовании уксусной и серной кислот.

В полученном экстракте был проведен гель-хроматографический анализ белкового состава околоушной железы северного оленя на сефадексе G – 75 фирмы “Sigma”.

Результаты гельхроматографического анализа представлены на рисунке 2.

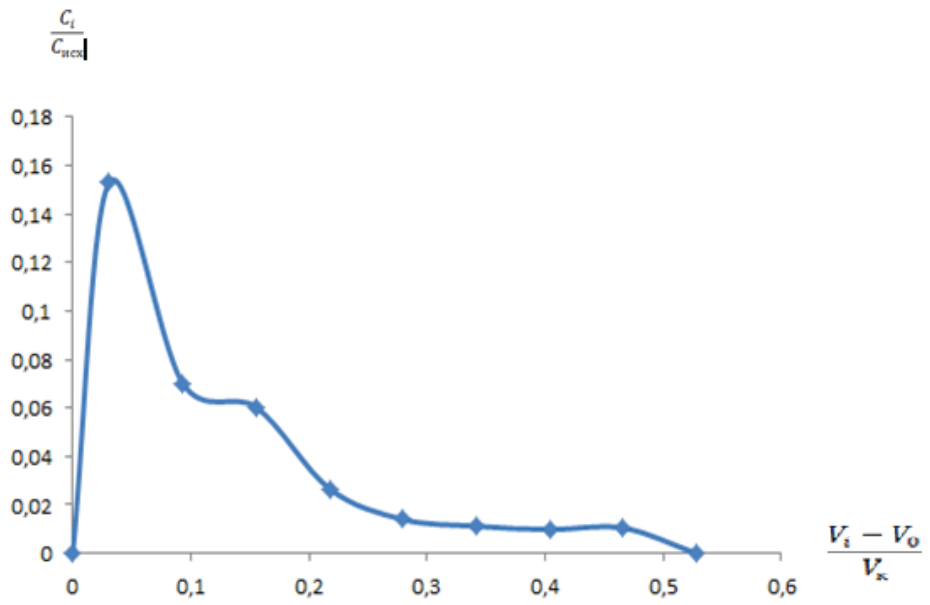


Рисунок 2. Гель-хроматографический анализ экстракта из околоушной железы северного оленя
где C_i – концентрация белка в экстракте, мг/мл; $C_{исх}$ – концентрация белка в исходном растворе, мг/мл;
V_i – объём фракции, мл; V_0 – свободный объём колонки, мл; $V_к$ – объём хроматографической колонки, мл

Из гельхроматограммы, представленной на рисунке 2 видно, что в экстракте присутствует два белковых пика с молекулярными массами: I пик – около 50 кДа (проявляет амилолитическую активность), что соответствует литературным данным представленным выше, II пик – около 31 кДа (не проявляет амилолитическую активность). Таким образом, из рис. 2 следует, что белковые примеси имеют молекулярную массу ниже, чем целевой продукт. Поэтому они могут быть отделены от амилазы сорбционно-хроматографическими и мембранными методами.

Для сорбционно-хроматографической очистки амилазы были подобраны оптимальные условия проведения сорбции на данных сорбентах: pH=3,5 – 3,8, концентрация сорбента 2 мг/мл. Определены равновесные показатели процесса сорбции.

Для изучения избирательности процесса сорбции были построены изотермы сорбции α-амилазы на разных сорбентах, представленные на рисунке 3.

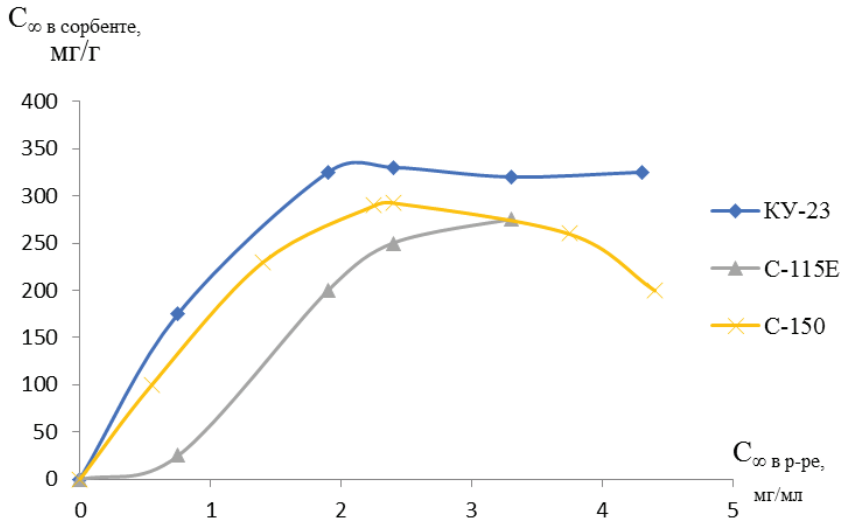


Рисунок 3. Изотермы сорбции раствора α – амилазы на различных сорбентах

На изотермах сорбции α –амилазы на сульфокатионите С-150 наблюдается максимум, который проявляется вследствие того, что поры сорбента недоступны для макромолекулярных ассоциированных структур и емкость сорбента снижается.

Изотерма сорбции α–амилазы на сульфокатионите КУ-23 соответствует модели Лэнгмюра[4].

Изотерма сорбции α –амилазы на карбоксильном катионите С-115Е имеет вид S-образной кривой. Это связано с кооперативным эффектом взаимодействия: происходит взаимное влияние сорбируемых молекул, первые молекулы сорбируются плохо, а последующие лучше за счет этого влияниях [5]. По изотермам сорбции рассчитаны коэффициенты распределения, представленные в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели процесса сорбции на исследуемых сорбентах

Сорбент	Коэффициент распределения Kd, см^3/г	Ёмкость сорбции, мг/г
КУ-23	260 ± 0,4	330± 0,3
С-150	120 ± 0,4	293± 0,3
С-115Е	79 ± 0,4	275

Из таблицы 2 видно, что наибольшей избирательностью и емкостью сорбции обладает макропористый сульфокатионит КУ-23, о чём свидетельствует высокий коэффициент распределения, который составил 260 см^3/г и сорбционная емкость 330 мг/г.

Подобраны оптимальные условия экстракции α-амилазы из околоушной железы северного оленя.

Определён компонентный состав экстракта околоушной железы северного оленя методами гельхроматографии и гель-электрофореза:(α-амилаза М = 50 кДа, белковые примеси М = 31 кДа).

Изучены равновесные параметры сорбции α-амилазы на сорбентах КУ-23, Purolite C-150, Purolite C-160 и Purolite C-115E. Показано, что изотермы сорбции α-амилазы имеют различный вид: кооперативная (S-образная), из7отерма с максимумом и изотерма Ленгмюра. В результате проведённых исследований было показано, что наибольшей избирательностью и емкостью сорбции обладает макропористый сульфокатионит КУ-23.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lowry OH. Protein measurement with Folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;V:193(1):265-275.

2. Рухлядева АП. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легкая и пищевая пр-ть, 1981.

3. Глазова НВ, Тищенко ГА, Муравьева ТД, Потехина ТС. Елькин ГЭ, Самсонов ГВ. Сорбционная иммобилизация α-амилазы Bacillussubtilis сетчатыми карбоксильными полиэлектролитами. Ж. Прикладная биохимия и микробиология. 1987; XXIII(4).

4. Уравнение изотермы адсорбции Ленгмюра. Доступно по: https://helpiks.org/8-21027.html (accessed: 20.02.2021)

5. Елькин ГЭ. Теоретические основы выбора оптимальных режимов сорбции и хроматографии БАВ. Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Биосепарация-96». СПб, 1996.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A SORPTION-CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF A-AMYLASE FROM THE PAROTID GLAND OF REINDEER

Mukhtar Z.K., 2nd year master's student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The article presents the results of experiments on the selection of conditions for the extraction of α-amylase using various extractants, as well as sorption-chromatographic purification of α-amylase on sorbents of various types.

Key words: *parotid gland of reindeer, a-amylase, sorption, extraction, gel chromatography, gel electrophoresis.*

REFERENCES

1. Lowry OH. Protein measurement with Folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;V:193(1):265-275

2. Rukhlyadeva AP. Methods for determining the activity of hydrolytic enzymes. Moscow: Light and food production, 1981. (in Russ).

3. Glazova NV, Tishchenko GA, Muravyeva TD, Potekhina TS, Elkin GE, Samsonov GV. Sorption immobilization of Bacillus subtilis α-amylase by reticulated carboxyl polyelectrolytes. J. Applied Biochemistry and Microbiology. 1987;XXIII(4). (in Russ)

4. Langmuir adsorption isotherm equation. Available at: https://helpiks.org/8-21027.html (accessed: 20.02.2021) (in Russ)

5. Elkin GE. Theoretical foundations for choosing the optimal modes of sorption and chromatography of biologically active substances. Abstracts of the All-Russian Symposium "Bioseparation-96" Saint Petersburg, 1996. (in Russ)

АКТУАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКЕ ГРИППА

Паромов Е.А., студ. 2 курса
Руководитель: **Богданова О.Ю.,** канд. биол. наук, доцент кафедры микробиологии
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: evgenij.paromov@spcpu.ru

Целью работы являлся анализ актуальной литературы с целью систематизации сведений о применяемых в настоящее время лекарственных средствах и мерах специфической профилактики против вируса гриппа. Понимая строение и механизм воздействия вируса на организм человека, можно либо предотвратить его размножение в случае поражения эпителия дыхательных путей, либо в период сезонной эпидемии провести профилактику для формирования иммунной защиты против определенного штамма. В первом случае используют различные лекарственные средства, во втором – вакцины.

Ключевые слова: *вирус гриппа, гемагглютинин, нейраминидаза, антигенный дрейф, антигенный шифт, интерфероны, вакцины.*

Вирус гриппа является одной из причин массовых заболеваний. Это РНК-вирус рода Orthomyxoviridae, который является возбудителем острой респираторной инфекции. Выделяют несколько серотипов вируса: A, B и C. Объектом работы являлись наиболее опасные вирусы гриппа типа A (ВГА), которые поражают людей, животных, и птиц, вызывают эпидемии и даже пандемии с высокой летальностью. Борьба с этим штаммом является наиболее значимой.

Целью работы является актуализация сведений о современных методах лечения и профилактики вируса гриппа.

Для человека опасность ВГА обусловлена множеством подтипов вируса и его чрезвычайной изменчивостью. Основными факторами, определяющими патогенность и вирулентность вирусов гриппа, являются поверхностные антигены – гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), обладающих выраженной изменчивостью, приводящей к появлению новых антигенных вариантов вирусов. По данным ВОЗ (1980), вирус гриппа имеет 18 типов HA и 11 типов NA. Гемагглютинины 1, 2, 3 типов и нейраминидазы 1, 2 типов содержат вирусы, поражающие человека. Остальные антигены присущи вирусам гриппа животных [1,2].

Необычная изменчивость ВГА объясняется антигенным дрейфом и антигенным шифтом. Антигенный дрейф происходит постоянно и обусловлен точечными мутациями в тех сайтах генома, которые отвечают за синтез и структуру антигенных детерминант HA и NA [1,3,4]. Антигенный шифт (англ. shift – скачок) происходит редко при попадании в одну клетку двух разных подтипов вирусов и обусловлен пересортировкой и полной заменой путем рекомбинации гена, кодирующего HA или NA определенной разновидности. Сероварианты вируса гриппа постоянно циркулируют в популяции людей и вызывают постоянные подъемы заболеваемости. Попадая на слизистые оболочки верхних дыхательных путей, вирус внедряется в клетки эпителия и вызывает их повреждение и гибель [5].

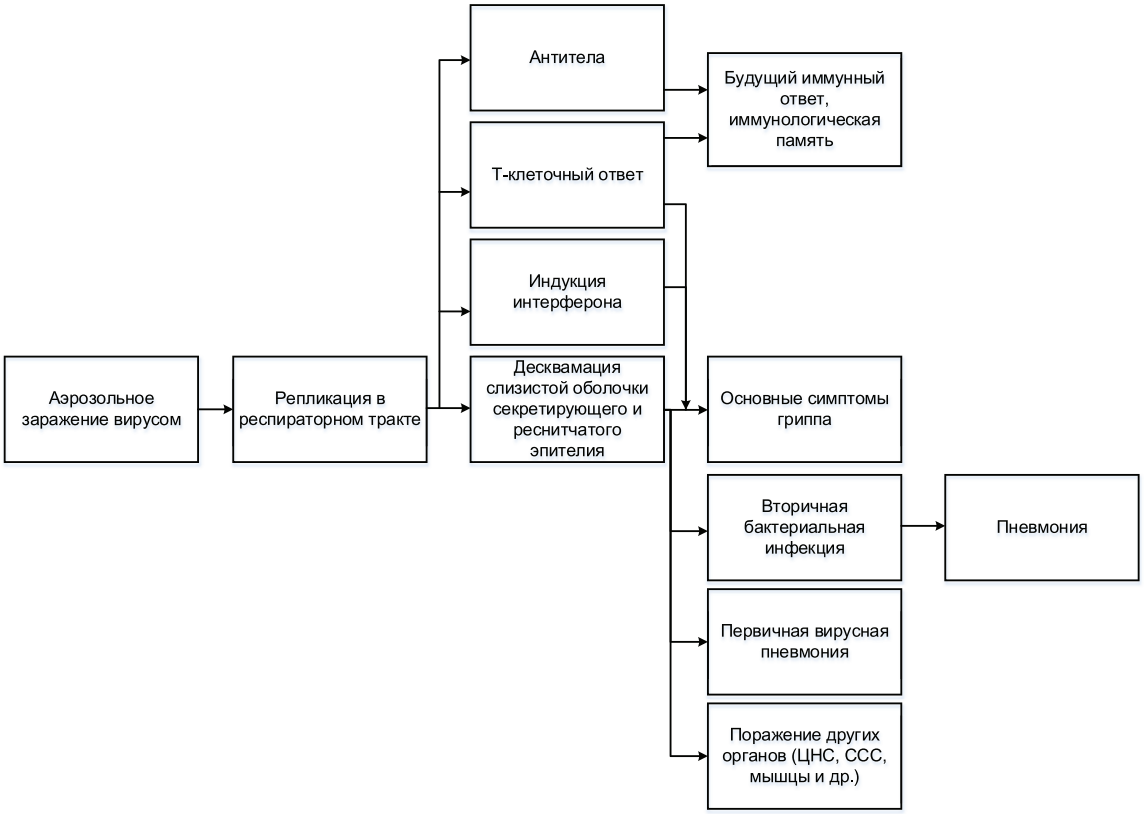


Рисунок 1. Схема патогенеза гриппа

Изучая механизм патогенеза, а также роль каждой структуры в нем, были разработаны этиотропные препараты, направленные на ингибирование, а также блокирование определенных структур. Сейчас в мире используется два поколения препаратов, охватывающих непосредственное влияние на вирусную репродукцию.

К этиотропным препаратам относят: блокаторы ионного канала (Ремантадин), принцип которых основан на подавление активности ионного канала вируса, необходимого для градиентного понижения pH, при котором структуры вириона дезагрегируются и комплексы рибонуклеопротеидов освобождаются от внешних оболочек, что в свою очередь необходимо для дальнейшей реализации вирусной программы в ядрах и цитоплазмы пораженной клетки; ингибиторы нейраминидазы (Озелтамивир, Занамивир), нейраминидаза – это фермент, контролирующий путем отщепления остатков сиаловых кислот от гемагглютинина процессы почкования и высвобождения зрелых вирусных частиц от мембран инфицированных клеток, кроме того, нейраминидаза играет роль на начальных стадия проникновения вируса в клетку [4]; ингибиторы слияния (Арбидол): Арбидол ингибирует слияние липидной оболочки вируса гриппа с плазматическими мембранами клеток. Это обусловлено встраиванием препарата в липидную оболочку и конформационным изменением гемагглютинина (HA). Также стоит отметить, что помимо ингибирования HA, препарат выступает в роли иммуномодулятора, индуцирует продукцию эндогенного интерферона и активизирует фагоцитоз. Кроме того, он оказывает антиоксидантное действие, защищая клетку от воздействия перекисных соединений и радионуклидов [5,6,7].

Помимо этиотропных препаратов существуют множество препаратов, направленных на повышение защиты организма. Среди новых препаратов для лечения и профилактики вирусных инфекций продолжают привлекать особое внимание препараты интерферона, иммуномодуляторы и индукторы интерферона.

Стало очевидным, что положительное действие различных лекарственных веществ можно объяснить их способностью повышать общую сопротивляемость организма или его неспецифический иммунитет, а также влиять на специфические иммунные реакции. В последнее время особо важным стало изучение лимфокинов [5].

Одним из наиболее важных иммуностимуляторов является интерферон, которые являются природной системой защиты клеток от вирусных инфекций. В связи с этим выделяют весьма перспективную группу препаратов – индукторы интерферона, суть которых стимуляция образования интерферона [5].

Также выделяют интерфероны I и II типов, которые защищают здоровые клетки от вирусной инфекции путём воздействия на различных этапах репликации, включая проникновение вируса в клетку, выход РНК в цитоплазму, транскрипцию, трансляцию и выход зрелых вирионов из клетки. Обычно интерфероны воздействуют на несколько стадий репликации [5].

Таблица 1 – Препараты для лечения и профилактики гриппа

Группы лекарственных препаратов	Механизм действия/группы	Препараты
Этиотропные препараты	Блокаторы ионного канала	Ремантадин, Альгирем, Полирем
	Ингибиторы нейраминидазы	Озелтамивир (тамифлю), Занамивир (реленца)
	Ингибиторы слияния	Арбидол
	Ингибиторы протеаз	Контрикал, Амбен, ε-аминокапроновая кислота
Вирулицидные препараты		Теброфен, Флореналь, Оксолиновая мазь
Препараты интерферона		Ингарон, Альфарона, Реаферон
Индукторы интерферона		Арбидол, Циклоферон, Амиксин, Кагоцел
Иммуномодуляторы		Рибомунил, Ликопид, Полиоксидоний
Симптоматические и патогенетические препараты	Жаропонижающие	Парацетамол, Ацетилсалициловая кислота
	Деконгестанты	Фенилэфрин, Псевдоэфедрин, Ксилометазолин
	Антигистаминные	Фенирамин, Супрастин, Тавегил, Димедрол
	Отхаркивающие	Терпингидрат, Гвайфенезин, Ацетилцистеин
	Противокашлевые	Декстрометорфан, Кодеин, Либексин
	Витамины и их аналоги	Витамины А, В, С, Е Поливитамины
Гомеопатические		Грипп-хель Алликор
Общеукрепляющие средства		Женьшень Элеутерококк Эхинацея
Комбинированные препараты		Колдрекс ТераФлю Фервекс Колдакт и др.

Стоит отметить, что существует наследуемость лекарственной устойчивости у штаммов вируса гриппа. Этот феномен связан с фактором массового использования определенного лечебно-профилактического препарата. Для выявления резистентности к определенному виду лекарств, ежесезонно проводят систематический мониторинг. Устойчивость к

тому или иному лекарственному средству определяется положением аминокислот или их замен. В одном случае лекарство применимо, в случае замены использовать такой препарат нельзя [1,5,8].

Таблица 2 – Мутации в белках вируса гриппа, отвечающие за резистентность к противогриппозным препаратам

Фенотип штамма вируса гриппа	Адамантаны M2-белок					Арбидол HA2-субъединица HA				Озельтамивир NA			
	аа 26	аа 27	аа 30	аа 31	аа 34	аа 27	аа 42	аа 51	аа 117	аа 119	аа 275	аа 293	аа 295
резистентный	I/F	A/I	T/S	N	E	H	N	R	N	V	Y	K	S
чувствительный	L	V	A	S	G	Q	Q	K	K	E	H	R	N

К профилактике гриппа относят: неспецифическую сезонную профилактику, специфическую профилактику (вакцинация), экстренную профилактику.

Наиболее эффективным методом профилактики гриппа является специфическая вакцинация. ВОЗ рекомендует проводить ежегодную вакцинацию против гриппа всем лицам входящих в группу риска (беременные женщины, дети в возрасте от 6 мес до 5 лет, взрослые 65 лет и старше, пациенты с хроническими заболеваниями и иммуносупрессивными состояниями, медицинские работники). Несмотря на то, что вирус гриппа подвержен генетическим и антигенным изменениям, даже при полном совпадении штаммового состава вакцин, предлагаемых ВОЗ на предстоящий эпидемиологический сезон, и реально циркулирующих штаммов, эффективность противогриппозной вакцинации высока и составляет не менее 80% [9].

Специфическая иммунопрофилактика гриппа осуществляется посредством живых и инактивированных вакцин, изготавливаемых в России или в других странах (например, вакцина «Ваксигрип», Франция). Инактивированные вакцины представляют собой фрагмент вирусного белка, необходимого для создания иммунного ответа на него в крови человека. После вакцинирования у человека формируется иммунитет против штаммов вируса гриппа и при попадании вируса в организм он распознается иммуннокомпетентными клетками по белковому фрагменту и удаляется из организма.

Гриппозные вакцины вводятся интраназально (через нос в виде капель и спреев) и парентерально (в данном случае подкожно). Подобная вакцинация защищает организм человека от вируса гриппа только на год, и ежегодно ее требуется повторять.

Живые вакцины представляют собой вирус гриппа со сниженной реактивностью. После этой прививки допускается кратковременный подъем температуры, недомогание, но и эти признаки наблюдаются не более чем у 2–5 % привитых. Иммунитет создается также кратковременный, что требует ежегодного ревакцинирования. Противопоказанием являются непереносимость белка куриного яйца (вирусы культивируются в живых средах – куриных эмбрионах) и беременность.

На данный момент существует перспективное направление – технология сайт-специфического мутагенеза, которое можно использовать для модификации PB1-гена вирулентного штамма вируса гриппа А с целью конструирования живых гриппозных вакцин нового поколения. [10]

Вакцинация обладает рядом преимуществ, самая главная из которых это высокая эффективность. Это доказано во время оценки эффективности вакцинации в США с ноября 2018 по февраль 2019 г, которая составила 47% предупреждения госпитализации и была выше у детей (61%), но существенно ниже в возрастной группе от 50 лет (24%). В целом результаты, полученные в результате анализа, говорят о выраженной защитной роли вакцинации против вируса гриппа. [11]

Но несмотря на высокую эффективность в обществе большая часть людей относится с недоверием к вакцинам.

По результатам проведенного анкетирования из 120 человек лишь 35% регулярно прививаются от гриппа, остальные 65% отказываются, полагаясь на другие методы профилактики. [12]

По результатам другого опроса в котором принимали участие медицинские работники результат был выше. 59,2% сотрудников медицинских организаций считают вакцинацию самой эффективной мерой. [13]

Третий опрос среди студентов показал, что лишь 20-25% студентов готовы сделать прививку от гриппа. [14]

Таблица 3 – Типы вакцин против гриппа

Тип вакцины	Название
Живая	«Вакцина гриппозная аллантоисная очищенная живая сухая» (Россия); «Вакцина гриппозная аллантоисная очищенная живая сухая интраназальная» (Россия).
Цельновирионная инактивированная	«Вакцина гриппозная, инактивированная элюатно центрифужная жидкая» (Россия); «Вакцина гриппозная хроматографическая инактивированная жидкая» (Россия).
Расщепленная (Сплит-вакцина)	«Бегривак» (Германия); «Ваксигрипп» (Франция); «Флюарикс» (Бельгия).
Субъединичная	«Инфлювак» (Нидерланды); «Агриппал» (Германия); «Гриппол» (Россия).

На сегодняшний день для борьбы с гриппом существует множество способов лечения и профилактики. Говоря о наиболее эффективных лекарственных средствах следует понимать, что у каждого лекарства есть как свои преимущества, так и недостатки. Также следует учитывать множество факторов, которые необходимо брать во внимание при подборе лекарств.

В случае подбора этиотропного препарата одним из важнейших факторов являются молекулярные маркеры вируса. Подбор осуществляется в соответствии с отсутствием резистентности к средству, которое планируется использовать для лечения [15].

Наиболее популярными являются средства, которые повышают защиту организма за счет интерферона (Интерферон I и II типа, индукторы интерферона).

Отдавая должное препаратам интерферонов и индукторам интерферонов, необходимо иметь в виду, что эти препараты совместимы с антибиотиками, противовирусными средствами и рекомбинантными лимфокинами и занимают совершенно определенное место в терапии вирусных инфекций как корректоры иммунитета в период развития иммунного ответа на инфекционный процесс для эффективного завершения терапии и предотвращения хронизации процесса, осложнений и рецидивов.

Говоря о профилактике, наиболее эффективным методом на сегодняшний день является вакцинация. Выделяют живые вакцины, которые содержат ослабленный до такой степени живой штамм вируса, что он не способен вызывать заболевания, и инактивированные вакцины, которые содержат штамм вируса, предварительно подвергнутому химической инактивации. Первую рекомендуют использовать в первую очередь в небольших коллективах и для иммунизации детей, инактивированные – в больших коллективах на крупных мероприятиях [2].

Вакцинация обладает рядом преимуществ, самая главная из которых это высокая эффективность. Но несмотря на это большая часть населения относится к ней с недоверием. Необходимо улучшить информированность населения о вопросах профилактики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каверин НВ, Киселев ОИ. Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1v-2009 – Санкт-Петербург-Москва, компания «Димитрейд график групп», 2011 // Вопросы вирусологии; 2012; 6: 46-47.

2. Хантимирова ЛМ, Гусева СГ, Шевцов ВА и др. Сравнительный анализ подходов к оценке качества инактивированных вакцин для профилактики гриппа на основе отечественных и международных нормативно-методических документов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика; 2020; 6: 35-46.

3. Кареткина ГН. Грипп, ОРВИ: проблемы профилактики и лечения // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение; 2015; 4 (13): 25-34.

4. Шабанова ЮВ. Нейраминидаза вируса гриппа. Фунадментальная медицина. Журнал Forcipe 2020; (3) 133-134

5. Тельнова ЕА, Щепин ВО, Загоруйченко АА. Противовирусные препараты: от создания до настоящего времени // Бюллетень Национального научно-исследовательского института общественного здоровья имени Н. А. Семашко; 2020; 4: 108-119.

6. Пшеничная НЮ, Булгакова ВА, Волчкова ЕВ и др. Обзор текущих и перспективных направлений противовирусной терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций в России // Терапевтический архив; 2019; 11:105-109.

7. Зубкова ТГ, Токин ИИ, Карнаухова ЕЮ, Лиознов ДА. Этиотропная терапия и химиопрофилактика гриппа ингибиторами нейраминидазы // МС; 2019; 21: 220-226.

8. Киселева ИВ, Ларионова НВ, Баженова ЕА и др. Роль нейраминидазы в формировании чувствительности вирусов гриппа к сывороточным ингибиторам и эффективности реассортации // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология; 2014; 3: 34-40.

9. Холодова ИН. Профилактика гриппа и острых респираторных вирусных инфекций в период сезонного подъема заболеваемости // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum; 2020; 3: 47-51.

10. Кост ВЮ, Сухова ОА, Акопова ИИ и др. Включение сайт-специфических мутаций в PB1-ген вирулентного штамма A/WSN/33 (H1N1) вируса гриппа А меняет его фенотипические характеристики. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ). 2019; (6): 21-29. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-21-29

11. Байдаченко ВЮ. Вакцинация, как защита от гриппа. Фундаментальная медицина. Журнал Forcipe. 2019; (2) 593-594

12. Белоножко АН. Сомов НА. Отношение населения к вакцинопрофилактике гриппа. Науки о здоровье. Журнал Бюллетень медицинских интернет конференций 2019; №9 (9) 383

13. Халиуллина СВ. Аглиуллина СТ. Анохин ВА. Павлова ТЮ. Камашева ГР. Вакцинопрофилактика гриппа. Что думают о ней медицинские работники? Науки о здоровье. Журнал Практическая медицина 2019; №5 (17) 212-218

14. Даниленко ДМ. Соминина АА. Комиссаров АБ. Писарева ММ. И др. Эффективность вакцинации от гриппа в снижении частоты госпитализаций, оцененная на разных стадиях эпидемического цикла. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика 2019; 18 (5) 63-69

15. Шопаева ГА. Адамзатова АБ. Тохтахунова ГХ. Ахмад К. Вакцинация при гриппе: за и против. Науки о здоровье. Вестник Казахского Национального медицинского университета 2015; 571-574

16. Лиознов ДА, Карнаухова ЕЮ, Зубкова ТГ и др. Оценка эффективности схемы лечения орви, включающей этиотропную (энисамия йодид) и симптоматическую терапию // Терапевтический архив; 2020; 3: 50-55.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРО- И НАНОПУЗЫРЬКОВЫХ ГАЗОВЫХ БАРБОТЕРОВ В ПРОЦЕССАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Петров Д.В., маг. 1 года обучения
Руководитель: **Пивоварова Н.С.**, канд. фарм. наук,
доцент каф. промышленной технологии лекарственных препаратов
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация.
E-mail: petrov.daniil@pharminnotech.com

Предложен обзор научных исследований на предмет использования газовых барботеров, генерирующих микро- и нанопузыри, в процессах культивирования клеточных культур.

Ключевые слова: *микропузыри, нанопузыри, барботирование, массообмен, керамическая мембрана, керамический диффузор, культивирование клеточных культур, интенсификация процессов культивирования, размер пузырей, перемешивание культуральной жидкости газом.*

Генерация газовых микро- (МП) и нанопузырей (НП) с использование простых, эффективных и масштабируемых методов является критичной для индустриализации и расширения сферы применения микро- и нанопузырькового распыления газа. Традиционные методы генерации МП и НП основаны на гидродинамической, ультразвуковой, корпускулярной и оптической кавитации, т.е. на кавитационном диспергировании. Для представленных методов генерации МП и НП характерны такие недостатки, как высокий расход энергии, отсутствие гибкости в адаптации к различным условиям проведения ключевого процесса и сложность в эксплуатации.

Оптимальная адаптация ферментационных систем к использованию микропузырей, получаемых из микропористых барботеров, выгодна для процессов культивирования в вязких средах с клетками чувствительным к механическому перемешиванию и гидравлическим ударам, благодаря высоким значениям объемных скоростей массопереноса кислорода, высокому соотношению площади межфазной поверхности газ-жидкость к объему жидкости, высокому времени задержки газа в жидкости и низкой скорости коалесценции.

Целью работы является изучение и анализ существующих исследовательских работ по выбранной теме с составлением прогноза перспектив использования газовых барботеров для генерации микро- и нанопузырьков.

К нанопузырям (НП) недавно возросло внимание со стороны научного сообщества вследствие их уникальных физико-химических свойств и широкой сферы потенциального применения, например, в очистке сточных вод [1], третичном методе нефтедобычи [2], пенном фракционировании [3], минеральной флотации [4], пищевой промышленности [5], внутриклеточной доставке лекарственных средств [6, 7], биомедицинской инженерии [8], медицине [9] и экологии [10, 11], в т.ч. аэрация воды [12]. Среди ряда уникальных свойств НП следует выделить значительное время задержки пузырька газа в жидкости [13], большую суммарную межфазную площадь контакта [14, 12, 13], высокое внутреннее давление газа [15, 12], заряженность поверхности [11], высокую устойчивость к коалесценции, разрушению или лопанию, и формирование пузырьков устойчивой сферической формы [16, 13].

Генерация НП чаще всего происходит в водных растворах путем создания кавитации через четыре распространенных механизма: гидродинамический, ультразвуковой, корпускулярный и оптический [12]. Гидродинамическая кавитация вызывается вариациями жидкостных потоков, которые могут быть получены с использованием устройств различной геометрии, например, мешалками, диафрагмами и дроссельными заслонками [17]. При ультразвуковой кавитации ультразвуковые волны пропускают через объем жидкости, что приводит к образованию локальных областей с различным давлением и, как следствие, формированию пузырей [18]. Оптическая кавитация образуется путем пропускания через объем жидкости высокочастотного луча света, например, лазера [19]. Пропускание таких частиц, как протоны и нейтроны [20], приводит к образованию корпускулярной кавитации [21, 12, 22]. Например, высокоскоростной вихревой поток при подаче воздуха в жидкость с помощью компрессора, сначала растворяет воздух в самой жидкости, т.е. до подачи новой порции газа в объем, а затем приводит к смешиванию новой порции воздуха с растворенным в жидкости газом путем высвобождения первого из пор с образованием НП [23]. При методе разгерметизации-рециркуляции, увеличение эффективности растворения газа в жидкости наблюдается при достаточно высоких значениях давлений от 0,25 до 0,27 МПа, что приводит к пересыщению. Когда давление водного раствора с растворенным в ней газом опускается до атмосферного, это приводит к образованию НП. В другом исследовании проводилась разгерметизация насыщенного воздухом раствора с использованием игольчатого клапана (внутренний диаметр – 2 мм), что приводило к образованию НП диаметром от 200 нм до 720 нм [24].

Для существующих генераторов НП характерны следующие негативные черты, ограничивающие их широкое применение на практике: необходимость в подаче жидкости под высоким давлением, что приводит к увеличению расходов энергии; перемешивание в системе газ-жидкость внутри генераторов неудобно при местной рекультивации воды, например, при работе с грунтовыми водами и в ряде других сфер применений [25]; рециркуляция газо-жидкостной смеси может привести к контаминации генераторной системы; отсутствие методов контроля размеров пузырей и однородности распыления; низкое сопротивление коррозионным веществам, т.е. низкая химическая устойчивость, которые резко ограничивают использование представленных реакторных систем при работе с агрессивными газами и растворами. Для решения указанных недостатков существующих систем генерации НП было предложено использование керамических

мембран с заданным размером пор в нанометровом масштабе [26, 27]. Керамические мембраны достаточно широко используются в качестве диффузоров для очистки сточных вод [28, 29], очистке фильтрата свалок [30] и обработке активного ила [31]. Коммерческие керамические диффузоры образуют пузыри в миллиметровом масштабе с наименьшим диаметром пузыря в 0,51 мм [32].

Однако, в данном направлении наблюдалась острая нехватка фундаментальных исследований касательно контроля размера НП и зависимости от таких свойств керамических мембран, как размер пор и характеристика поверхности. В качестве решения представленной проблемы, а также с целью разработки простого в использовании, эффективного и масштабируемого метода генерации НП, в 2018 году было исследовано образование НП трех газов: воздуха, азота и кислорода, – через керамическую нанопористую мембрану в форме трубки (размер пор – 100 нм) [33]. В ходе исследования было изучено влияние давления подаваемого газа, размера пор мембраны и поверхностного натяжения на z-потенциал и размер НП. В результате исследования установлено, что повышение давления подаваемого газа приводит к уменьшению размера НП и эффективности растворения кислорода, а также к повышению значений pH культуральной жидкости и z-потенциала.

Газовые барботеры, образующие микропузыри (МП), приобрели широкое внимание научного сообщества вследствие их значительного влияния на газо-жидкостный массообмен, оказывающим непосредственное влияние на размер пузырей в биореакторах. В настоящее время в биореакторах используются различные конфигурации микропузырьковых барботеров: перфорированные трубки, сопольные распылители и др. [34, 35].

В 2015 году были проведены исследования влияния МП, полученных из перфорированной трубки, на рост мицелиального гриба *Rhizopus chinensis*, используемого для получения связанной с мицелием липазы. В результате проведенного исследования было обнаружено, что микропузыри улучшают перемешивание культуральной жидкости, что приводит к повышению эффективности ферментации [36].

Размер пузырьков и контроль аэрации являются важными факторами для того, чтобы площадь межфазного контакта была подходящей для обеспечения максимальных значений объемных скоростей массопереноса кислорода. Многочисленные исследования показали, что повышение площади поверхности межфазного контакта приводит к повышению объемных скоростей массопереноса кислорода. Пористые барботеры, включающие спеченные пористые стеклянные, металлические мембраны, пористые керамические мембраны, могут приводить к образованию МП и с каждым исследованием приобретают все большее внимание с точки зрения применения в ферментационных процессах [37, 38, 39, 40, 41, 42]. МП с большой межфазной поверхностью, высокими скоростями растворения газа, пониженным сопротивлением трению, высоким инерционным давлением и низкой скоростью всплытия были успешно применены как в газо-жидкостных, так и в эрлифтных биоректорах [43, 44]. МП увеличивают значения объемных скоростей массопереноса кислорода в эрлифтных биоректорах, что в итоге приводит к получению высокого выхода продукта при ферментации. В результате использования эрлифтного биоректора с замкнутым контуром и микропузырьковым барботером в виде пористой пластины для культивирования микроводоросли *Dunaliella salina* было обнаружено ускорение роста биомассы водорослей [45, 46, 47].

В 2018 году китайскими учеными был разработан биореактор с перемешивающим устройством и микропузырьковым барботером, представляющим собой спеченные металлические лопасти пропеллерной мешалки. Представленный биоректор использовали для продуцирования арахидоновой кислоты мицелиальным грибом *Mortierella alpine*, который является чувствительным к механическому перемешиванию, гидравлическим ударам и требует значительной концентрации кислорода в культуральной жидкости [48]. Особенностью проведения ферментационного процесса данного гриба является то, что он динамически трансформирует питательную среды из Ньютоновской жидкости в Неньютоновскую жидкость, что сразу ограничивает применение крупнопузырьковых систем аэрации в связи с затвердеванием неньютоновской жидкости при высоких значения фазового сдвига. В результате проведенного культивирования установлено, что общее содержание арахидоновой кислоты при использовании представленного биореактора в 2,82 раза больше по сравнению с количеством, полученным в реакторе со стандартным микропористым барботером и турбинной мешалкой. Таким образом, предложенная конфигурация реактора подходит для культивирования культур клеток, требующих высокие концентрации кислорода, чувствительных к механическому перемешиванию и гидравлическим ударам, в плотных средах.

Использование микро- и нанопузырьковых газовых барботеров в процессах культивирования клеточных культур является перспективным направлением в области интенсификации процессов биосинтеза целевого продукта и ускоренного накопления биомассы вследствие увеличения массообменных характеристик среды. Ключевым фактором, определяющим широкое распространение данного способа аэрации среды в биотехнологической промышленность, является необходимость в подборе правильной конфигурации биоректора, обеспечивающим не только высокие показатели эффективности ферментационного процесса, но и простоту и удобство в использовании. Правильно подобранная конфигурация микропористых мембран может позволить отказаться от использования перемешивающих устройств, что в свою очередь обеспечит не только сохранение или повышение значений выхода целевого продукта, но и снижение риска контаминации культуральной жидкости, вероятность образования устойчивой пены и, в производственном масштабе, снижению эксплуатационных расходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wu Z, Zhang X, Zhang X, Sun J, Dong Y, Hu J. In situ AFM observation of BSA adsorption on HOPG with nanobubble. Chinese Science Bulletin [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2007 Jul;52(14):1913–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/s11434-007-0288-8.

2. Bortkevitch SV, Kostrov SA, Savitsky NV, & Wooden WO. (2006). U.S. Patent No. 7,059,591. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

3. Hofmann A, Schembecker G, Merz J. Role of bubble size for the performance of continuous foam fractionation in stripping mode. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [Internet]. Elsevier BV. 2015 May;473:85–94. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.042.

4. Hampton MA, Nguyen AV. Accumulation of dissolved gases at hydrophobic surfaces in water and sodium chloride solutions: Implications for coal flotation. Minerals Engineering [Internet]. Elsevier BV. 2009 Aug;22(9-10):786–92. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2009.02.006.

5. Oshita S, & Liu, S. (2013, August). Nanobubble Characteristics and Its Application to Agriculture and Food. In Int. Symp. Agri-Food Health Wealth (pp. 23-32).

6. Wang Y, Li X, Zhou Y, Huang P, Xu Y. Preparation of nanobubbles for ultrasound imaging and intracelluar drug delivery. International Journal of Pharmaceutics [Internet]. Elsevier BV. 2010 Jan;384(1-2):148–53. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.09.027.

7. Lukianova-Hleb EY, Belyanin A, Kashinath S, Wu X, Lapotko DO. Plasmonic nanobubble-enhanced endosomal escape processes for selective and guided intracellular delivery of chemotherapy to drug-resistant cancer cells. Biomaterials [Internet]. Elsevier BV. 2012 Feb;33(6):1821–6. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.015.

8. Wen D. Intracellular hyperthermia: Nanobubbles and their biomedical applications. International Journal of Hyperthermia [Internet]. Informa UK Limited. 2009 Jan;25(7):533–41. Available at: http://dx.doi.org/10.3109/02656730903061617.

9. Sandhiya S, Dkhar SA, Surendiran A. Emerging trends of nanomedicine – an overview. Fundamental & Clinical Pharmacology [Internet]. Wiley. 2009 Jun;23(3):263–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00692.

10. Yamasaki K, Sakata K, & Chuhjoh, K. (2010). U.S. Patent No. 7,662,288. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

11. Tsuge H, editor. Micro- and Nanobubbles. Jenny Stanford Publishing; 2014 Aug 4. Available at: http://dx.doi.org/10.1201/b17278.

12. Agarwal A, Ng WJ, Liu Y. Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment. Chemosphere [Internet]. Elsevier BV. 2011 Aug;84(9):1175–80. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.054.

13. Uchida T, Oshita S, Ohmori M, Tsuno T, Soejima K, Shinozaki S, et al. Transmission electron microscopic observations of nanobubbles and their capture of impurities in wastewater. Nanoscale Research Letters [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2011 Apr 5;6(1). Available at: http://dx.doi.org/10.1186/1556-276x-6-295.

14. Bowley WW, Hammond GL. Controlling Factors for Oxygen Transfer through Bubbles. Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development [Internet]. American Chemical Society (ACS). 1978 Jan;17(1):2–8. Available at: http://dx.doi.org/10.1021/i260065a002.

15. Tyrrell JWG, Attard P. Images of Nanobubbles on Hydrophobic Surfaces and Their Interactions. Physical Review Letters [Internet]. American Physical Society (APS). 2001 Oct 8;87(17). Available at: http://dx.doi.org/10.1103/physrevlett.87.176104.

16. Ushikubo FY, Furukawa T, Nakagawa R, Enari M, Makino Y, Kawagoe Y, et al. Evidence of the existence and the stability of nano-bubbles in water. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [Internet]. Elsevier BV. 2010 May;361(1-3):31–7. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.03.005.

17. Gogate PR, Pandit AB. A review and assessment of hydrodynamic cavitation as a technology for the future. Ultrasonics Sonochemistry [Internet]. Elsevier BV. 2005 Jan;12(1-2):21–7. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.03.007.

18. Hielscher, T. (2007). Ultrasonic production of nano-size dispersions and emulsions. arXiv preprint arXiv:0708.1831.

19. Tomita, Y., & Shima, A. High-speed photographic observations of laser-induced cavitation bubbles in water. Acta Acustica united with Acustica. 1990;71(3),161-171.

20. Shah YT, Pandit AB, Moholkar VS. Sources and Types of Cavitation. Cavitation Reaction Engineering [Internet]. Springer US; 1999;1–14. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-4787-7_1.

21. FAN M, TAO D, HONAKER R, LUO Z. Nanobubble generation and its application in froth flotation (part I): nanobubble generation and its effects on properties of microbubble and millimeter scale bubble solutions. Mining Science and Technology (China) [Internet]. Elsevier BV. 2010 Jan;20(1):1–19. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s1674-5264(09)60154-x.

22. Manickam S, Ashokkumar M, editors. Cavitation. Jenny Stanford Publishing. 2014 Aug 5; Available at: http://dx.doi.org/10.1201/b15669.

23. Ikeura H, Kobayashi F, Tamaki M. Removal of residual pesticide, fenitrothion, in vegetables by using ozone microbubbles generated by different methods. Journal of Food Engineering [Internet]. Elsevier BV. 2011 Apr;103(3):345–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.11.002.

24. Calgaroto S, Wilberg KQ, Rubio J. On the nanobubbles interfacial properties and future applications in flotation. Minerals Engineering [Internet]. Elsevier BV. 2014 Jun;60:33–40. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2014.02.002.

25. Li H, Hu L, Song D, Lin F. Characteristics of Micro-Nano Bubbles and Potential Application in Groundwater Bioremediation. Water Environment Research [Internet]. Wiley. 2014 Sep 1;86(9):844–51. Available at: http://dx.doi.org/10.2175/106143014x14062131177953.

26. KUKIZAKI M, GOTO M. Size control of nanobubbles generated from Shirasu-porous-glass (SPG) membranes. Journal of Membrane Science [Internet]. Elsevier BV. 2006 Sep 15;281(1-2):386–96. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2006.04.007.

27. Kukizaki M. Microbubble formation using asymmetric Shirasu porous glass (SPG) membranes and porous ceramic membranes–A comparative study. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [Internet]. Elsevier BV. 2009 May;340(1-3):20–32. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.02.033.

28. Kausley SB, Desai KS, Shrivastava S, Shah PR, Patil BR, Pandit AB. Mineralization of alkyd resin wastewater: Feasibility of different advanced oxidation processes. Journal of Environmental Chemical Engineering [Internet]. Elsevier BV. 2018 Jun;6(3):3690–701. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.04.001.

29. Suzuki K. Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration. Water Research [Internet]. Elsevier BV. 2002 Jul;36(12):2991–8. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00536-x.

30. Chaturapruek A, Visvanathan C, Ahn KH. Ozonation of Membrane Bioreactor Effluent for Landfill Leachate Treatment. Environmental Technology [Internet]. Informa UK Limited. 2005 Jan;26(1):65–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1080/09593332608618583.

31. Stasinakis AS, Kotsifa S, Gatidou G, Mamais D. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions. Water Research [Internet]. Elsevier BV. 2009 Mar;43(5):1471–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.040.

32. Siswanto A, Kuvshinov D, Zimmerman WB. Investigation of Bubble Size Distributions in Oscillatory Flow at Various Flow Rates. USES Conference Proceedings [Internet]. USES; 2015 Feb 11. Available at: http://dx.doi.org/10.15445/01012014.40.

33. Ahmed AKA, Sun C, Hua L, Zhang Z, Zhang Y, Zhang W, et al. Generation of nanobubbles by ceramic membrane filters: The dependence of bubble size and zeta potential on surface coating, pore size and injected gas pressure. Chemosphere [Internet]. Elsevier BV. 2018 Jul;203:327–35. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.157.

34. Stone KA, Hilliard MV, He QP, Wang J. A mini review on bioreactor configurations and gas transfer enhancements for biochemical methane conversion. Biochemical Engineering Journal [Internet]. Elsevier BV. 2017 Dec;128:83–92. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.09.003.

35. Karimi A, Golbabaei F, Mehrnia MR, Neghab M, Mohammad K, Nikpey A, et al. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2013 Jan 7;10(1). Available at: http://dx.doi.org/10.1186/1735-2746-10-6.

36. Wang D, Zhu Z, Wang X, Bustamante M, Xu Y, Liu Y, et al. Improving mycelium-bound lipase production by aggregating Rhizopus chinensis on a draft tube in a modified stirred tank fermentor. Process Biochemistry [Internet]. Elsevier BV. 2015 Dec;50(12):2019–28. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.10.004.

37. Wei C, Wu B, Li G, Chen K, Jiang M, Ouyang P. Comparison of the hydrodynamics and mass transfer characteristics in internal-loop airlift bioreactors utilizing either a novel membrane-tube sparger or perforated plate sparger. Bioprocess and Biosystems Engineering [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2014 May 15;37(11):2289–304. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/s00449-014-1207-4.

38. Liu C, Tanaka H, Ma J, Zhang L, Zhang J, Huang X, et al. Effect of microbubble and its generation process on mixed liquor properties of activated sludge using Shirasu porous glass (SPG) membrane system. Water Research [Internet]. Elsevier BV. 2012 Nov;46(18):6051–8. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.032.

39. Khirani S, Kunwapanitchakul P, Augier F, Guigui C, Guiraud P, Hébrard G. Microbubble Generation through Porous Membrane under Aqueous or Organic Liquid Shear Flow. Industrial & Engineering Chemistry Research [Internet]. American Chemical Society (ACS) 2011 Aug 3;51(4):1997–2009. Available at: http://dx.doi.org/10.1021/ie200604g.

40. Labík L, Moucha T, Petříček R, Rejl JF, Valenz L, Haidl J. Volumetric mass transfer coefficient in viscous liquid in mechanically agitated fermenters. Measurement and correlation. Chemical Engineering Science [Internet]. Elsevier BV. 2017 Oct;170:451–63. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2017.04.006.

41. Ansari M, Bokhari HH, Turney DE. Energy efficiency and performance of bubble generating systems. Chemical Engineering and Processing – Process Intensification [Internet]. Elsevier BV. 2018 Mar;125:44–55. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2017.12.019.

42. Azizi F, Al Taweel AM. Mass Transfer in an Energy-Efficient High-Intensity Gas–Liquid Contactor. Industrial & Engineering Chemistry Research [Internet]. American Chemical Society (ACS). 2015 Nov 10;54(46):11635–52. Available at: http://dx.doi.org/10.1021/acs.iecr.5b01078.

43. Muroyama K, Imai K, Oka Y, Hayashi J. Mass transfer properties in a bubble column associated with micro-bubble dispersions. Chemical Engineering Science [Internet]. Elsevier BV. 2013 Aug;100:464–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2013.03.043.

44. Parmar R, Majumder SK. Microbubble generation and microbubble-aided transport process intensification–A state-of-the-art report. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification [Internet]. Elsevier BV. 2013 Feb;64:79–97. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2012.12.002.

45. Hanotu JO, Bandulasena H, Zimmerman WB. Aerator design for microbubble generation. Chemical Engineering Research and Design [Internet]. Elsevier BV.; 2017 Jul;123:367–76. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2017.01.034.

46. AL-Mashhadani MKH, Wilkinson SJ, Zimmerman WB. Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes. Chemical Engineering Science [Internet]. Elsevier BV. 2015 Dec;137:243–53. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2015.06.032.

47. Zimmerman WB, Zandi M, Hemaka Bandulasena HC, Tesař V, James Gilmour D, Ying K. Design of an airlift loop bioreactor and pilot scales studies with fluidic oscillator induced microbubbles for growth of a microalgae Dunaliella salina. Applied Energy [Internet]. Elsevier BV. 2011 Oct;88(10):3357–69. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.02.013.

48. Li G, Li H, Wei G, He X, Xu S, Chen K, et al. Hydrodynamics, mass transfer and cell growth characteristics in a novel microbubble stirred bioreactor employing sintered porous metal plate impeller as gas sparger. Chemical Engineering Science [Internet]. Elsevier BV. 2018 Dec;192:665–77. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2018.08.025.

SUMMARY

PERSPECTIVES FOR THE USE OF MICRO- AND NANOBUBBLE GAS SPARGER IN CELL CULTIVATION PROCESSES

Petrov D.V., 1st year student of master degree
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A review of scientific researches on the use of gas spargers that generate micro- and nanobubbles in cell cultivation processes.

Key words: *microbubbles, nanobubbles, bubbling, mass transfer, ceramic membrane, ceramic diffuser, cell cultivation, intensification of cultivation processes, bubble size, mixing of culture liquid with gas.*

REFERENCES

1. Wu Z, Zhang X, Zhang X, Sun J, Dong Y, Hu J. In situ AFM observation of BSA adsorption on HOPG with nanobubble. Chinese Science Bulletin [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2007 Jul;52(14):1913–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/s11434-007-0288-8.

2. Bortkevitch SV, Kostrov SA, Savitsky NV, & Wooden WO. (2006). U.S. Patent No. 7,059,591. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

3. Hofmann A, Schembecker G, Merz J. Role of bubble size for the performance of continuous foam fractionation in stripping mode. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [Internet]. Elsevier BV. 2015 May;473:85–94. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.042.

4. Hampton MA, Nguyen AV. Accumulation of dissolved gases at hydrophobic surfaces in water and sodium chloride solutions: Implications for coal flotation. Minerals Engineering [Internet]. Elsevier BV. 2009 Aug;22(9-10):786–92. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2009.02.006.

5. Oshita S, & Liu, S. (2013, August). Nanobubble Characteristics and Its Application to Agriculture and Food. In Int. Symp. Agri-Food Health Wealth (pp. 23-32).

6. Wang Y, Li X, Zhou Y, Huang P, Xu Y. Preparation of nanobubbles for ultrasound imaging and intracelluar drug delivery. International Journal of Pharmaceutics [Internet]. Elsevier BV. 2010 Jan;384(1-2):148–53. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.09.027.

7. Lukianova-Hleb EY, Belyanin A, Kashinath S, Wu X, Lapotko DO. Plasmonic nanobubble-enhanced endosomal escape processes for selective and guided intracellular delivery of chemotherapy to drug-resistant cancer cells. Biomaterials [Internet]. Elsevier BV. 2012 Feb;33(6):1821–6. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.015.

8. Wen D. Intracellular hyperthermia: Nanobubbles and their biomedical applications. International Journal of Hyperthermia [Internet]. Informa UK Limited. 2009 Jan;25(7):533–41. Available at: http://dx.doi.org/10.3109/02656730903061617.

9. Sandhiya S, Dkhar SA, Surendiran A. Emerging trends of nanomedicine – an overview. Fundamental & Clinical Pharmacology [Internet]. Wiley. 2009 Jun;23(3):263–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00692.

10. Yamasaki K, Sakata K, & Chuhjoh, K. (2010). U.S. Patent No. 7,662,288. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

11. Tsuge H, editor. Micro- and Nanobubbles. Jenny Stanford Publishing; 2014 Aug 4. Available at: http://dx.doi.org/10.1201/b17278.

12. Agarwal A, Ng WJ, Liu Y. Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment. Chemosphere [Internet]. Elsevier BV. 2011 Aug;84(9):1175–80. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.054.

13. Uchida T, Oshita S, Ohmori M, Tsuno T, Soejima K, Shinozaki S, et al. Transmission electron microscopic observations of nanobubbles and their capture of impurities in wastewater. Nanoscale Research Letters [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2011 Apr 5;6(1). Available at: http://dx.doi.org/10.1186/1556-276x-6-295.

14. Bowley WW, Hammond GL. Controlling Factors for Oxygen Transfer through Bubbles. Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development [Internet]. American Chemical Society (ACS). 1978 Jan;17(1):2–8. Available at: http://dx.doi.org/10.1021/i260065a002.

15. Tyrrell JWG, Attard P. Images of Nanobubbles on Hydrophobic Surfaces and Their Interactions. Physical Review Letters [Internet]. American Physical Society (APS). 2001 Oct 8;87(17). Available at: http://dx.doi.org/10.1103/physrevlett.87.176104.

16. Ushikubo FY, Furukawa T, Nakagawa R, Enari M, Makino Y, Kawagoe Y, et al. Evidence of the existence and the stability of nano-bubbles in water. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [Internet]. Elsevier BV. 2010 May;361(1-3):31–7. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.03.005.

17. Gogate PR, Pandit AB. A review and assessment of hydrodynamic cavitation as a technology for the future. Ultrasonics Sonochemistry [Internet]. Elsevier BV. 2005 Jan;12(1-2):21–7. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.03.007.

18. Hielscher, T. (2007). Ultrasonic production of nano-size dispersions and emulsions. arXiv preprint arXiv:0708.1831.

19. Tomita, Y., & Shima, A. High-speed photographic observations of laser-induced cavitation bubbles in water. Acta Acustica united with Acustica. 1990;71(3),161-171.

20. Shah YT, Pandit AB, Moholkar VS. Sources and Types of Cavitation. Cavitation Reaction Engineering [Internet]. Springer US; 1999;1–14. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-4787-7_1.

21. FAN M, TAO D, HONAKER R, LUO Z. Nanobubble generation and its application in froth flotation (part I): nanobubble generation and its effects on properties of microbubble and millimeter scale bubble solutions. Mining Science and Technology (China) [Internet]. Elsevier BV. 2010 Jan;20(1):1–19. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s1674-5264(09)60154-x.

22. Manickam S, Ashokkumar M, editors. Cavitation. Jenny Stanford Publishing. 2014 Aug 5; Available at: http://dx.doi.org/10.1201/b15669.

23. Ikeura H, Kobayashi F, Tamaki M. Removal of residual pesticide, fenitrothion, in vegetables by using ozone microbubbles generated by different methods. Journal of Food Engineering [Internet]. Elsevier BV. 2011 Apr;103(3):345–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.11.002.

24. Calgaroto S, Wilberg KQ, Rubio J. On the nanobubbles interfacial properties and future applications in flotation. Minerals Engineering [Internet]. Elsevier BV. 2014 Jun;60:33–40. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2014.02.002.

25. Li H, Hu L, Song D, Lin F. Characteristics of Micro-Nano Bubbles and Potential Application in Groundwater Bioremediation. Water Environment Research [Internet]. Wiley. 2014 Sep 1;86(9):844–51. Available at: http://dx.doi.org/10.2175/106143014x14062131177953.

26. KUKIZAKI M, GOTO M. Size control of nanobubbles generated from Shirasu-porous-glass (SPG) membranes. Journal of Membrane Science [Internet]. Elsevier BV. 2006 Sep 15;281(1-2):386–96. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2006.04.007.

27. Kukizaki M. Microbubble formation using asymmetric Shirasu porous glass (SPG) membranes and porous ceramic membranes–A comparative study. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [Internet]. Elsevier BV. 2009 May;340(1-3):20–32. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.02.033.

28. Kausley SB, Desai KS, Shrivastava S, Shah PR, Patil BR, Pandit AB. Mineralization of alkyd resin wastewater: Feasibility of different advanced oxidation processes. Journal of Environmental Chemical Engineering [Internet]. Elsevier BV. 2018 Jun;6(3):3690–701. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.04.001.

29. Suzuki K. Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration. Water Research [Internet]. Elsevier BV. 2002 Jul;36(12):2991–8. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00536-x.

30. Chaturapruek A, Visvanathan C, Ahn KH. Ozonation of Membrane Bioreactor Effluent for Landfill Leachate Treatment. Environmental Technology [Internet]. Informa UK Limited. 2005 Jan;26(1):65–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1080/09593332608618583.

31. Stasinakis AS, Kotsifa S, Gatidou G, Mamais D. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions. Water Research [Internet]. Elsevier BV. 2009 Mar;43(5):1471–9. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.040.

32. Siswanto A, Kuvshinov D, Zimmerman WB. Investigation of Bubble Size Distributions in Oscillatory Flow at Various Flow Rates. USES Conference Proceedings [Internet]. USES; 2015 Feb 11. Available at: http://dx.doi.org/10.15445/01012014.40.

33. Ahmed AKA, Sun C, Hua L, Zhang Z, Zhang Y, Zhang W, et al. Generation of nanobubbles by ceramic membrane filters: The dependence of bubble size and zeta potential on surface coating, pore size and injected gas pressure. Chemosphere [Internet]. Elsevier BV. 2018 Jul;203:327–35. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.157.

34. Stone KA, Hilliard MV, He QP, Wang J. A mini review on bioreactor configurations and gas transfer enhancements for biochemical methane conversion. Biochemical Engineering Journal [Internet]. Elsevier BV. 2017 Dec;128:83–92. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.09.003.

35. Karimi A, Golbabaei F, Mehrnia MR, Neghab M, Mohammad K, Nikpey A, et al. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2013 Jan 7;10(1). Available at: http://dx.doi.org/10.1186/1735-2746-10-6.

36. Wang D, Zhu Z, Wang X, Bustamante M, Xu Y, Liu Y, et al. Improving mycelium-bound lipase production by aggregating Rhizopus chinensis on a draft tube in a modified stirred tank fermentor. Process Biochemistry [Internet]. Elsevier BV. 2015 Dec;50(12):2019–28. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.10.004.

37. Wei C, Wu B, Li G, Chen K, Jiang M, Ouyang P. Comparison of the hydrodynamics and mass transfer characteristics in internal-loop airlift bioreactors utilizing either a novel membrane-tube sparger or perforated plate sparger. Bioprocess and Biosystems Engineering [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2014 May 15;37(11):2289–304. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/s00449-014-1207-4.

38. Liu C, Tanaka H, Ma J, Zhang L, Zhang J, Huang X, et al. Effect of microbubble and its generation process on mixed liquor properties of activated sludge using Shirasu porous glass (SPG) membrane system. Water Research [Internet]. Elsevier BV. 2012 Nov;46(18):6051–8. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.032.

39. Khirani S, Kunwapanitchakul P, Augier F, Guigui C, Guiraud P, Hébrard G. Microbubble Generation through Porous Membrane under Aqueous or Organic Liquid Shear Flow. Industrial & Engineering Chemistry Research [Internet]. American Chemical Society (ACS) 2011 Aug 3;51(4):1997–2009. Available at: http://dx.doi.org/10.1021/ie200604g.

40. Labík L, Moucha T, Petříček R, Rejl JF, Valenz L, Haidl J. Volumetric mass transfer coefficient in viscous liquid in mechanically agitated fermenters. Measurement and correlation. Chemical Engineering Science [Internet]. Elsevier BV. 2017 Oct;170:451–63. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2017.04.006.

41. Ansari M, Bokhari HH, Turney DE. Energy efficiency and performance of bubble generating systems. Chemical Engineering and Processing – Process Intensification [Internet]. Elsevier BV. 2018 Mar;125:44–55. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2017.12.019.

42. Azizi F, Al Taweel AM. Mass Transfer in an Energy-Efficient High-Intensity Gas–Liquid Contactor. Industrial & Engineering Chemistry Research [Internet]. American Chemical Society (ACS). 2015 Nov 10;54(46):11635–52. Available at: http://dx.doi.org/10.1021/acs.iecr.5b01078.

43. Muroyama K, Imai K, Oka Y, Hayashi J. Mass transfer properties in a bubble column associated with micro-bubble dispersions. Chemical Engineering Science [Internet]. Elsevier BV. 2013 Aug;100:464–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2013.03.043.

44. Parmar R, Majumder SK. Microbubble generation and microbubble-aided transport process intensification–A state-of-the-art report. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification [Internet]. Elsevier BV. 2013 Feb;64:79–97. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2012.12.002.

45. Hanotu JO, Bandulasena H, Zimmerman WB. Aerator design for microbubble generation. Chemical Engineering Research and Design [Internet]. Elsevier BV.; 2017 Jul;123:367–76. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2017.01.034.

46. AL-Mashhadani MKH, Wilkinson SJ, Zimmerman WB. Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes. Chemical Engineering Science [Internet]. Elsevier BV. 2015 Dec;137:243–53. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2015.06.032.

47. Zimmerman WB, Zandi M, Hemaka Bandulasena HC, Tesař V, James Gilmour D, Ying K. Design of an airlift loop bioreactor and pilot scales studies with fluidic oscillator induced microbubbles for growth of a microalgae Dunaliella salina. Applied Energy [Internet]. Elsevier BV. 2011 Oct;88(10):3357–69. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.02.013.

48. Li G, Li H, Wei G, He X, Xu S, Chen K, et al. Hydrodynamics, mass transfer and cell growth characteristics in a novel microbubble stirred bioreactor employing sintered porous metal plate impeller as gas sparger. Chemical Engineering Science [Internet]. Elsevier BV. 2018 Dec;192:665–77. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2018.08.025.

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ НА КАЛЛУСНУЮ КУЛЬТУРУ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО

Подборонова А.Г., студ. 4 курса
Руководитель: **Пивоварова Н.С.**, канд. фарм. наук, доцент
Соруководитель: **Шебитченко Т.С.**, ст. преподаватель кафедры ПТЛП
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: i.flame.sasha@gmail.com

Проведено исследование влияния концентрации глюкозы в твердой питательной среде на жизнеспособность каллусных клеток цикория обыкновенного. Результаты опыта подтверждены микроскопией.

Ключевые слова: *каллус, цикорий, жизнеспособность, глюкоза, качественный состав.*

Цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus L.*) – многолетнее травянистое растение семейства Сложноцветные (*Compositae*). Встречается в тропическом и умеренном климате Евразии, на территории России распространен в европейской части, в Сибири и на Кавказе. Произрастает цикорий обыкновенный практически везде: на лугах, полях, около дорог, на пустырях, по берегам рек, рядом с населенными пунктами [1].

Во всех частях цикория содержится множество биологически активных веществ, таких как полисахарид инулин, дубильные вещества, белковые вещества, органические кислоты, гликозиды, витамины (аскорбиновая кислота, каротин, тиамин, рибофлавин), оксикоричные кислоты (цикориевая, или 2,3-дикофеилвинная кислота), кумариновые гликозиды [1].

Культура клеток растений является уникальной биотехнологической моделью живой системы. Изменяя состав среды, условия культивирования возможно изучать влияние различных факторов на рост и биосинтетическую активность клеток. В основном, при культивировании каллусных культур используются среды, содержащие соли по прописям: Мурасиге и Скуга, Гамборга и Эвелега, Уайта или среды, составленные на их основе [2, 3]. Твердофазный способ культивирования чаще используется в лабораторных условиях для первичного получения изолированных растительных культур, предварительной оценки культур в качестве возможных продуцентов БАВ, а также для выращивания посевного материала. При образовании каллуса in vitro происходит неорганизованный рост клеток и их дедифференциация, первоначально свойственные ткани или органу растения функции – теряются. Но при изменении условий культивирования (состав питательной среды, температура, свет) можно вызвать вторичную дифференциацию и получить полноценное растение (или орган) из каллусной ткани. Собственно, в этом заключается преимущество и уникальность каллусных культур высших растений – это отдельный организм, способный автономно развиваться в течение долгого времени. [4, 5, 6].

Цель данной работы: изучение влияния концентрации глюкозы в составе питательной среды на жизнеспособность и морфологию клеток цикория обыкновенного в каллусной культуре.

В работе использованы стандартные методы, принятые в работах по биотехнологии и культуре клеток растений. В качестве эксплантов для получения каллусной культуры выбраны микрочеренки проростков из семян. Стерилизация семян проводилась гипохлоритом натрия 6%-ным, 20 минут и спиртом этиловым 70%. Затем их отмывали водой очищенной. Семена проращивали на фильтрах, смоченных водой очищенной стерильной. Затем в ламинаре отделяли микрочеренки, которые помещали в колбы со средой по прописи Мурасиге-Скуга (MS) с половинным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами 2,4 – Д (6 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). На 14 сутки полученный первичный каллус перенесен на свежую питательную среду. После второго пассажа штаммы пересажены на среды MS с полным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами НУК (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Для изучения влияния концентрации глюкозы на жизнедеятельность каллусной культуры, пересадка осуществлялась на среды MS с разной концентрацией сахара: 3 г/л (A), 7,5 г/л (B), 15 г/л (C), 20 г/л (D).

На рисунке 1 представлен внешний вид каллусных культур цикория (3 пассаж). Каллусная ткань аморфна и не имеет чёткой структуры, может быть разной степени оводненности и рыхлости. Визуально более активный рост наблюдался в образцах с количеством сахара 15 и 20 г/л (рисунок 1). Образцы A и B более водянистые и менее рыхлые, чем образцы C и D. В образце B наблюдалось потемнение клеток (возможно более быстрое старение).

В процессе культивирования были получены следующие результаты:

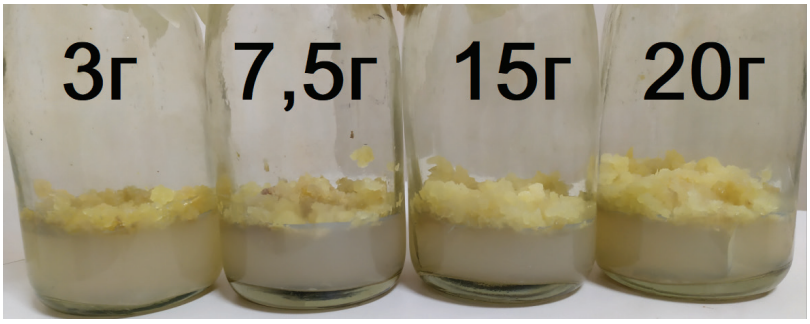
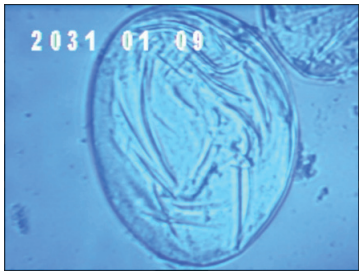
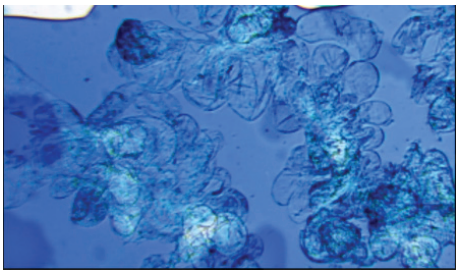
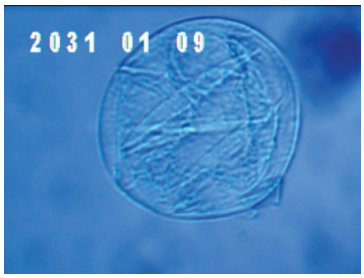
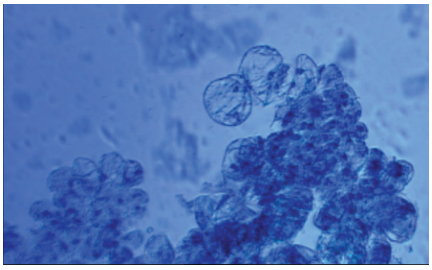
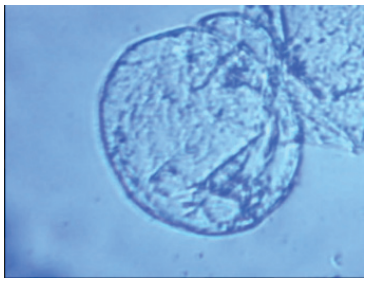
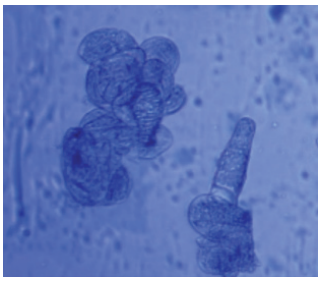
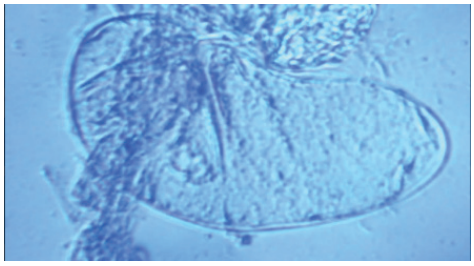
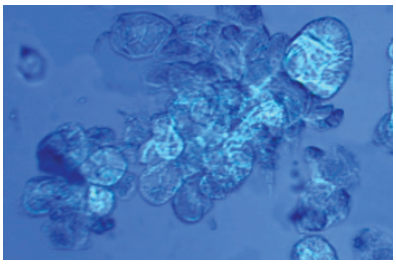
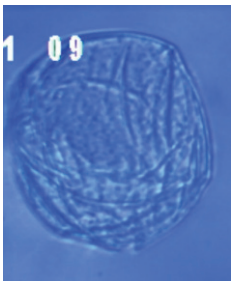
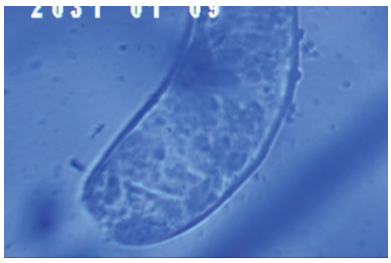
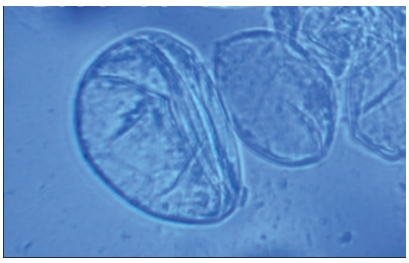
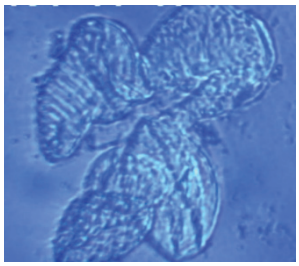
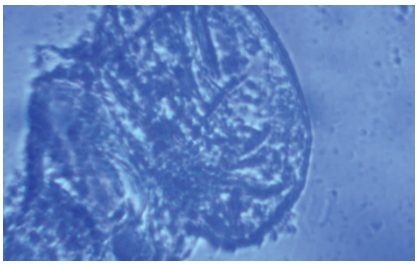


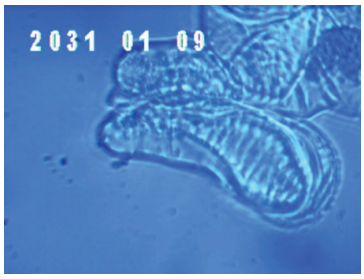
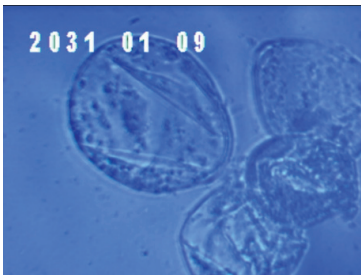
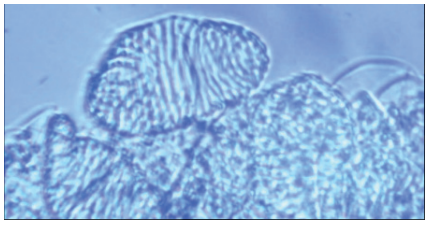
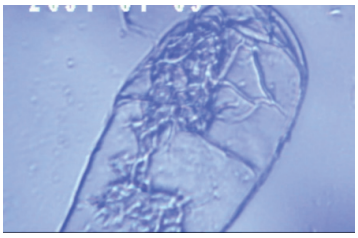
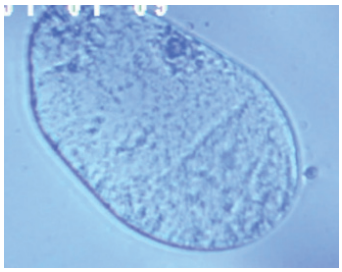
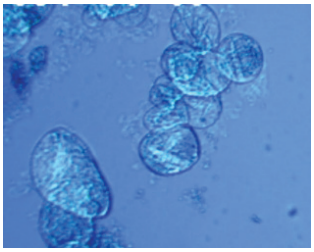
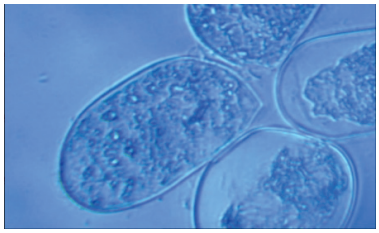
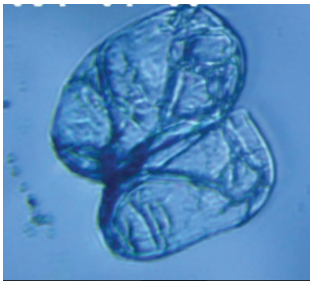
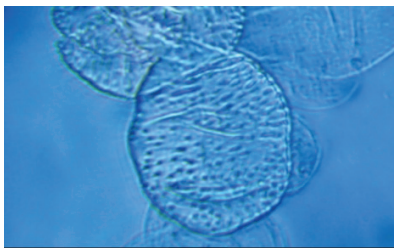
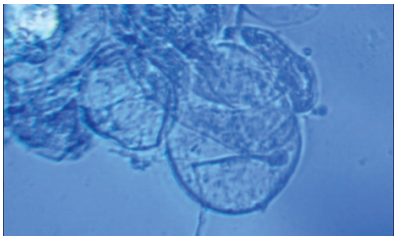
Рисунок 1. Каллус цикория с разной концентрацией сахара в среде

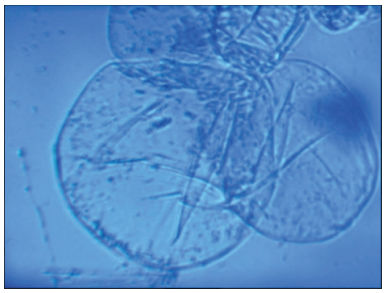
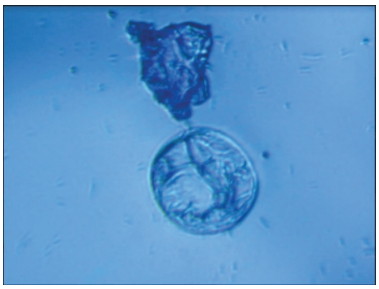
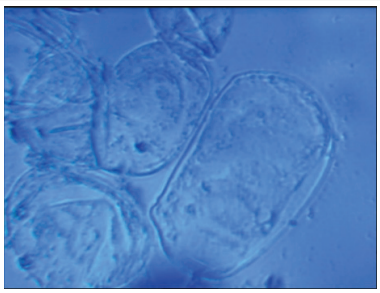
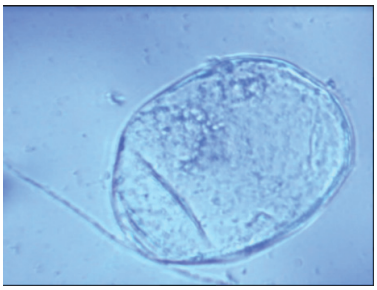
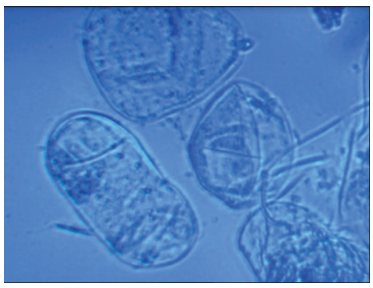
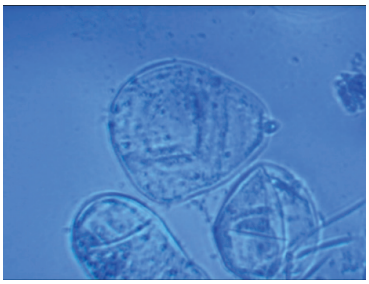
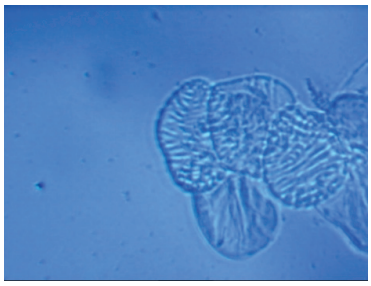
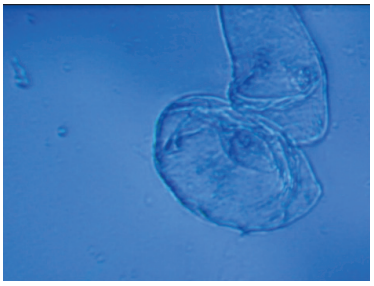
Для изучения жизнеспособности клеток цикория, проведена микроскопия образцов из посевов с разной концентрацией в течение одного пассажа. Клетки образцов окрашивали красителем метиленовый синий. Обнаруженные клетки можно разделить на два типа. Первый тип – клетки меристематического типа, имеют относительно небольшие размеры, крупные ядра, их вакуолизация слабо выражена. Второй тип – клетки паренхимного типа, имеют более крупные размеры и овальную, вытянутую форму. Микроскопия показала, что более 95% всех визуализированных клеток были живыми (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты микроскопического изучения клеток штамма цикория на разных этапах роста

Концентрация глюкозы в среде, г/л	Фотографии и описание	
5 сутки роста		
3	 ув. х 400	 ув. х 200
	Размер клеток: от 75 мкм до 150 мкм Клетки прокрашены хорошо. Способны к делению. Агломераты клеток. Мало отдельных клеток.	
7,5	 ув. х 400	 ув. х 200
	Размер клеток: От 62,5 мкм До 87,5 мкм Клетки прокрашены хорошо. Способны к делению. Отдельные клетки прокрашены лучше, чем агломераты.	

Концентрация глюкозы в среде, г/л	Фотографии и описание	
15	 ув. х 400	 ув. х 200
	Размер клеток: От 87,5 мкм До 100 мкм Клетки прокрашены хорошо. Способны к делению.	
20	 ув. х 400	 ув. х 200
	Размер клеток: От 50 мкм До 75 мкм Клетки прокрашены хорошо. Способны к делению	
12 сутки роста		
3	ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 75 мкм До 100 мкм Наблюдается этап деления.	
7,5	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 75 мкм До 150 мкм Наблюдается этап деления.	
15	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 50 мкм До 150 мкм Наблюдается этап деления	

Концентрация глюкозы в среде, г/л	Фотографии и описание	
20	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 50 мкм До 137,5 мкм Наблюдается этап деления.	
19 сутки роста		
3	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 50 мкм До 87,5 мкм Наблюдается этап деления. Клетки прокрашены хорошо.	
7,5	 ув. х 400	 ув. х 200
	Размер клеток: От 62,5 мкм До 162,5 мкм Клетки прокрашены хорошо. Агломераты клеток. Мало отдельных клеток	
15	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 87,5 мкм До 125 мкм Так же наблюдались мелкие клетки: 37,5 – 56,25 мкм, что говорит об активном делении и росте. Отдельные клетки преобладают. Клетки прокрашены хорошо	
20	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 50 мкм До 87,5 мкм Отдельные клетки преобладают. Клетки прокрашены хорошо.	

Концентрация глюкозы в среде, г/л	Фотографии и описание	
26 сутки роста		
3	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 75 мкм До 125 мкм Клетки прокрашены слабо. Заметно начало отмирания отдельных клеток. Агломераты преобладают.	
7,5	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 50 мкм До 150 мкм Клетки прокрашены слабо.	
15	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 50 мкм До 87,5 мкм Клетки прокрашены хорошо. Отдельные клетки преобладают. Способны к делению	
20	 ув. х 400	 ув. х 400
	Размер клеток: От 37,5мкм До 100 мкм Клетки прокрашены хорошо. Отдельные клетки преобладают. Наблюдается этап деления.	

После трёх пассажей штаммы на средах А и В сильно оводнились, заметно уменьшилось количество биомассы.

В результате проведенной работы получены данные о влиянии концентрации глюкозы на жизнеспособность и морфологию клеток цикория обыкновенного в каллусной культуре. Результаты исследований показали, что клетки, растущие на средах с концентрацией глюкозы 15 и 20 г/л наиболее жизнеспособны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корожан НВ, Теселкина АД. Компонентный состав и противомикробное действие травы цикория обыкновенного. Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2016: 291.

2. Бутенко РГ. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнология на их основе: Учебное пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.

3. Мурашкина ИА. Использование культуры клеток растений в биотехнологии лекарственных средств : учебное пособие. Иркутск: ИГМУ, 2015.

4. Буркова ЕА, Канарский АВ, Канарская ЗА. Перспектива применения фитобиотехнологии для получения биологически активных веществ. Вестник Казанского технологического университета. 2014;14. Доступно по: https://cyberleninka.ru/article/n/perspektiva-primeneniya-fitobiotehnologii-dlya-polucheniya-biologicheski-aktivnyh-veschestv

5. Дышко ВН. Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве: курс лекций для аспирантов. Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014:10-14

6. Решетников В, Спиридович Е, Фоменко Т, Носов А. Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциал. Наука и инновации. 2014;135. Доступно по: https://cyberleninka.ru/article/n/rastitelnaya-bioteh.

SUMMARY

THE EFFECT OF GLUCOSE CONCENTRATION ON THE CALLUS CULTURE OF *CHICORY VULGARIS*

Podboronova A.H., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The influence of glucose concentration in a solid nutrient medium on the viability of callus cells of chicory vulgaris was studied. The results of the experiment are confirmed by microscopy.

Key words: *callus, chicory, viability, glucose, qualitative composition.*

REFERENCES

1. Korozhan NV, Teselkina AD. Component composition and antimicrobial action of the herb chicory vulgaris. Modern problems of health care and medical statistics. 2016:291. (in Russ)

2. Butenko RG. Biology of higher plant cells in vitro and biotechnology based on them: A textbook. Moscow, FBK-PRESS., 1999. (in Russ)

3. Murashkina, IA. The use of plant cell culture in biotechnology of medicinal products: a textbook. Irkutsk: IGMU, 2015. (in Russ)

4. Burkova EA, Kanarsky AV, Kanarskaya ZA. Perspektiva primeneniya fitobiotekhnologii dlya obucheniya biologically active substances Prospects for the application of phytobiotechnology for the production of biologically active substances. 2014;14. Available at:: https://cyberleninka.ru/article/n/perspektiva-primeneniya-fitobiotehnologii-dlya-polucheniya-biologicheski-aktivnyh-veschestv (in Russ)

5. Dyshko VN. Cellular and tissue biotechnology in plant production: a course of lectures for postgraduates. Smolensk: FGBOU VPO "Smolenskaya GSHA", 2014:10-14 (in Russ)

6. Reshetnikov V, Spiridovich E, Fomenko T, Nosov A. Plant biotechnology – a way of rational use of biosynthetic potential. Nauka i innovatsii. 2014;135. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/rastitelnaya-bioteh. (in Russ)

ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИИ НАКОПЛЕНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА И БИОМАССЫ В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ ЖЕНЬШЕНЯ АМЕРИКАНСКОГО

Потычинская У.В., студ. 2 курса, **Бугаев А.С.**, студ. 3 курса
Руководители: **Орехова И.А.**, канд.биол.наук, доц., **Пивоварова Н.С.**, канд.фарм.наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: ulyana.potychinskaya@spcpu.ru

Собраны литературные данные о культуре ткани женьшеня американского, получены количественные значения накопления белка и биомассы в процессе роста.

Ключевые слова: *культура ткани, женьшень американский, белоксинтезирующая способность.*

В настоящее время признано, что фитопрепараты обладают рядом преимуществ по сравнению с химическими лекарствами. Увеличивающаяся популярность лекарственных средств растительного происхождения связана с многочисленными новыми исследованиями, подтверждающими их высокую эффективность, а также, в большинстве случаев, безопасность.

Общеизвестными лекарственными растениями, обладающими полезными свойствами, являются растения из рода Panax (женьшень). В данной работе был исследован один из самых уникальных представителей данного рода, а именно, женьшень американский *(Panax quinquefolius)*. Известно, что данный сорт обладает множеством полезных лекарственных

свойств. Так доказано, что женьшень американский, в отличие от женьшеня китайского, способствует регуляции температуры тела [1], также он способствует улучшению когнитивных функций мозга [2], общего состояния иммунной системы; женьшень может понижать уровень сахара и холестерина в крови, обладает стимулирующими свойствами (показано, что женьшень помогает бороться с усталостью и повышает физическую выносливость). На протяжении многих лет его использовали при простудах, а также для улучшения пищеварения и повышения аппетита; применяли при бородавках, ангинах, артритах и других заболеваниях.

Женьшень содержит два важнейших соединения – гинсенозиды и гинтонин – которые вместе обеспечивают полезные для здоровья свойства данного растения. [3]

Важно отметить связь между метаболизмом основных (к которым относятся белки) и вторичных метаболитов: как правило, предшественники вторичных метаболитов образуются в процессах первичного обмена (рис. 1). В связи с этим важной задачей было также определение общей белоксинтезирующей способности культуры женьшеня, которая напрямую влияет на все стороны обмена веществ.

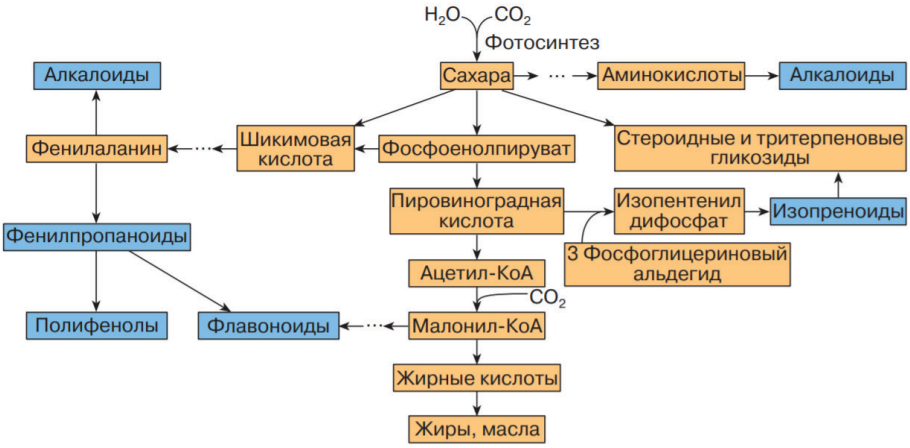


Рисунок 1. Схема путей биосинтеза основных классов вторичных метаболитов из продуктов первичного обмена (названия классов вторичных метаболитов выделены голубым цветом)

При изучении данной темы важной составляющей стал подбор необходимых для проведения исследования, а также подходящих под наши задачи, методик, с помощью которых можно определить содержание белка и накопление биомассы.

Среди всех методов определения общей белоксинтезирующей способности одним из самых чувствительных и доступных является метод определения белка по Лоури, основанный на комбинации биуретового метода и метода Фолина. Данная комбинация двух методов дает чувствительность, превышающую в 100 раз оба метода по отдельности.

Актуальность работы определена возрастающим в последнее время интересом к препаратам на растительной основе, обладающими рядом доказанных уникальных полезных для здоровья свойств.

Целью работы являлось изучение динамики накопления белка и биомассы.

В соответствии с поставленными задачами исследования проводилось: поиск литературных данных о характеристике вида женьшеня американского, его различных свойствах и применении; изучение методов определения общей белоксинтезирующей способности культуры растений.

Объектом исследования являлась культура клеток женьшеня американского *(Panax quinquefolius)*. Штамм выращивали на стандартной агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга [1], при температуре 27±1°С, относительной влажности воздуха 70% в темноте, с циклом культивирования 28 суток.

Препарат получали гомогенизацией навески растительной культуры (*Panax quinquefolius)* в охлажденной ступке с добавлением охлажденного 0,1 М калий-фосфатного буфера с pH 7,4 в соотношении 1:1. Для определения содержания белка использовали супернатант, который получали центрифугированием в течение 40 минут при температуре +4°С на 17 500 оборотов/мин. (30 130 g) в центрифуге Eppendorf 5430R. Полученный супернатант использовали для определения концентрации белка.

Общее содержание белка определяли методом Лоури. Метод основан на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорномолибдено-вольфрамового реактива (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов, интенсивность окраски которых определяют по оптической плотности при длине волны 750 нм. Реактив Фолина взаимодействует с остатками ароматических аминокислот белка, главным образом тирозина, а также триптофана и фенилаланина и, в меньшей степени, цистеина. Развитие окраски достигает максимума через 20–30 мин при комнатной температуре, в дальнейшем идет уменьшение ее интенсивности. Степень окрашивания зависит от природы белка. Поскольку различные виды белков могут давать цветные реакции различной интенсивности, испытуемый белок должен соответствовать стандартному образцу.

Ход определения: Полученный супернатант разводили в 10 раз (0,1 мл задачи на 0,9 мл воды) и в 50 раз (0,02 мл задачи на 0,98 мл воды). Перед началом готовили реактив С путем добавления к 25 мл реактива А (2 % раствора углекислого

натрия в 0,1 М едком натрии) реактива В, который получили путем соединения в пробирке равных объемов (по 1 мл) растворов 2 % виннокислого натрия и 1 % сернокислой меди. Далее к 1 мл каждой из разбавленных задач добавили 5 мл реактива С. Параллельно поставили контрольную пробу: 1 мл воды, 5 мл реактива С. Через 10 минут в каждую пробирку добавили 0,5 мл реактива Фолина, тщательно перемешали и оставили при комнатной температуре на 30 минут. После этого измерили оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 750 нм в кювете на 5мм. Количественную концентрацию содержания белка определяли по калибровочному графику, для чего готовили водные растворы бычьего сывороточного альбумина с известной концентрацией, которые определяли по описанной методике и получали значения экстинкции, соответствующие конкретным концентрациям. По калибровочной кривой рассчитывали содержание белка и выражали в мкг/мл.

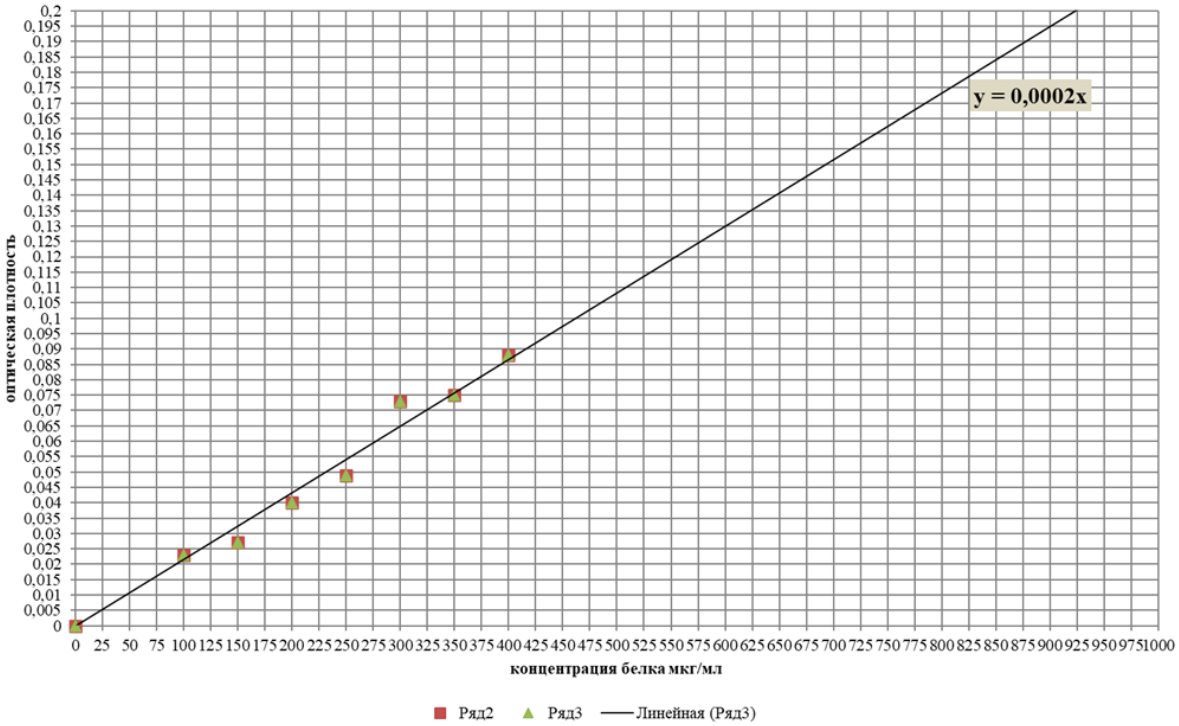


Рисунок 2. Калибровочный график зависимости концентрации белка альбумина от оптической плотности раствора

Исследования культуры клеток женьшеня американского *(Panax quinquefolius)* проводились в рамках нескольких пассажей. Внешний вид каллусной культуры женьшеня на разных сроках культивирования представлен на рис. 3.

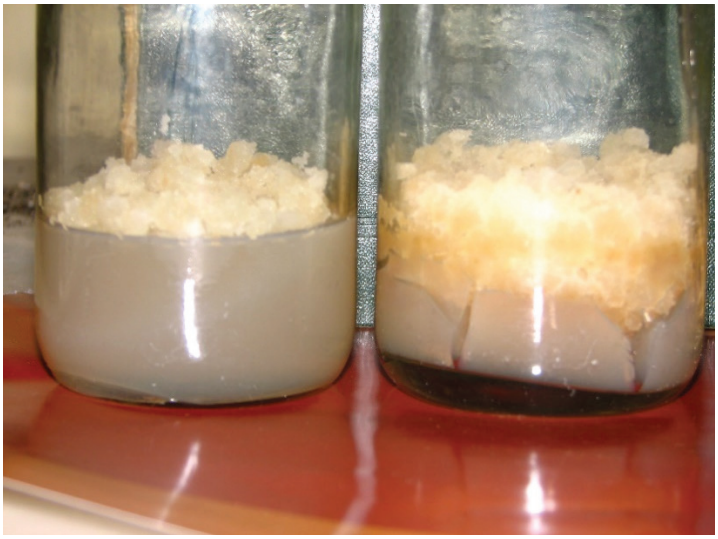


Рисунок 3. Фотография культуры клеток женьшеня американского разного возраста на питательной среде

На протяжении всего времени роста проводились измерения накопления сырой массы и массы сухих веществ, на основании полученных данных были построены графики динамики роста культуры женьшеня (рис. 4). Кривая роста характеризовалась наличием лаг-фазы на 1-2-е сутки; фазы линейного роста – 3-6 сутки; фазы замедленного роста – 7-20 сутки и стационарной фазы – 20-30 сутки. Как показано на графике (рис. 4), наибольший прирост биомассы достигался на 20 сутки от момента пересадки, в тоже время максимальная скорость роста культуры клеток наблюдалась на 11-15 сутки.

Таблица 1 – Динамика показателей роста культуры клеток женьшеня американского

Время	Сырая масса	Прирост биомассы	Индекс роста	Скорость роста	Сухая масса
сутки	г/100 мл среды	г/100 мл среды	отн. Ед.	г/сут	г/100 мл среды
0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,31
3	6,0	2,5	0,7	0,8	0,38
6	10,4	4,4	2,0	1,2	0,80
8	17,3	11,3	3,9	1,7	0,90
11	24,0	18,0	5,9	1,9	1,00
15	29,3	23,3	7,4	1,7	1,10
20	33,4	27,4	8,5	1,5	1,15
30	33,2	27,2	8,5	1,0	1,15

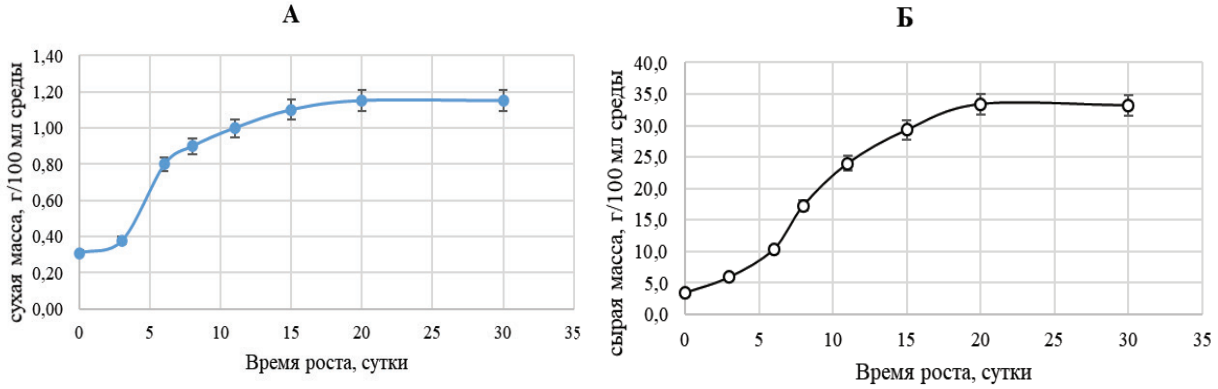


Рисунок 4. Динамика накопления А – сухих веществ; Б – сырой массы

Определение количественного содержания белка в культуре ткани *Panax quinquefolius* производилось на 7, 14, 19 и 30 сутки от момента пересадки. Анализ полученных данных показал, что с 10 по 19 сутки происходит увеличение концентрации белка, что подтверждает наиболее выраженную общую белоксинтезирующую способность культуры клеток в указанный период. Экспериментальные данные свидетельствуют об активном синтезе метаболитов основного обмена веществ, что является необходимым условием обеспечения ростовых процессов. Период с 19 по 30 сутки характеризовался снижением скорости роста ткани при незначительном снижении содержания белка вследствие перехода культуры ткани в стадию старения. Таким образом, установлена положительная корреляция между содержанием общего белка и накоплением биомассы культуры ткани *Panax quinquefolius*

Таблица 2 – Результаты количественного определения содержания белка в культуре ткани женьшеня американского методом Лоури в зависимости от возраста культуры

Возраст	7 суток		14 суток		19 суток		30 суток	
Разведение	В 10 раз	В 50 раз	В 10 раз	В 50 раз	В 10 раз	В 50 раз	В 10 раз	В 50 раз
Содержание белка в мкг/мл	512,5	107,5	580	120	657,5	135	602,5	140

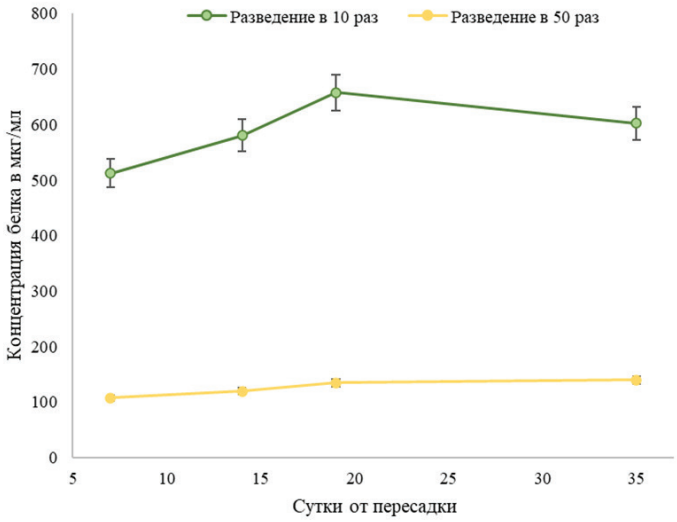


Рисунок 5. Динамика изменения содержания белка (в мкг) на 1 мл гомогената при различном разведении

Изучены литературные данные о характеристике вида женьшеня американского, а также материалы об антиоксидантной системе растений. Получены экспериментальные данные о содержании общего белка в культуре женьшеня американского в зависимости от его возраста. Выявлена положительная корреляция белоксинтетической способности и скорости роста клеток культуры ткани *Panax quinquefolius*. В дальнейшем планируется изучение характеристик антиоксидантной системы, количественная оценка параметров основного и вторичного метаболизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Park E-Y, Kim M-H, Kim E-H, Lee E-K, Park I-S, Yang D-C, et al. Efficacy Comparison of Korean Ginseng and American Ginseng on Body Temperature and Metabolic Parameters. The American Journal of Chinese Medicine [Internet]. World Scientific Pub Co Pte Lt. 2014 Jan;42(01):173–87. Available at: http://dx.doi.org/10.1142/s0192415x14500128 DOI: 10.1142/S0192415X14500128

2. Geng J, Dong J, Ni H, Wu T, Jiang K, Wang G. Ginseng for cognition. Geng J, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2009 Apr 15. Available at: http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd007769 DOI: 10.1002/14651858.CD007769.pub2

3. Im D, Nah S. Yin and Yang of ginseng pharmacology: ginsenosides vs gintonin. Acta Pharmacologica Sinica [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2013 Oct 14;34(11):1367–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/aps.2013.100 DOI: 10.1038/aps.2013.100

SUMMARY

CORRELATION EVALUATION BETWEEN THE ACCUMULATION OF TOTAL PROTEIN AND BIOMASS IN THE CELLS OF THE AMERICAN GINSENG TISSUE CULTURE

Potychinskaya U., 2th year student, **Bugaev A.**, 3th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A review of the literature data on American ginseng tissue culture is carried out, and quantitative values of protein and biomass accumulation during growth were obtained.

Key words: *tissue culture, American ginseng, biomass accumulation, protein synthesis system.*

REFERENCES

1. Park E-Y, Kim M-H, Kim E-H, Lee E-K, Park I-S, Yang D-C, et al. Efficacy Comparison of Korean Ginseng and American Ginseng on Body Temperature and Metabolic Parameters. The American Journal of Chinese Medicine [Internet]. World Scientific Pub Co Pte Lt. 2014 Jan;42(01):173–87. Available at: http://dx.doi.org/10.1142/s0192415x14500128

DOI: 10.1142/S0192415X14500128

2. Geng J, Dong J, Ni H, Wu T, Jiang K, Wang G. Ginseng for cognition. Geng J, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2009 Apr 15. Available at: http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd007769 DOI: 10.1002/14651858.CD007769.pub2

3. Im D, Nah S. Yin and Yang of ginseng pharmacology: ginsenosides vs gintonin. Acta Pharmacologica Sinica [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2013 Oct 14;34(11):1367–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/aps.2013.100 DOI: 10.1038/aps.2013.100

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА ФЕРМЕНТА ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗЫ В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО БИОРЕАКТОРА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ EVIO-LAB, PHARMTECHNOLOGIES

Рыбакова А.И., студ. 4 курса ФПТЛ
Руководитель: **Колодязная В.А.**, канд. биол. наук, доцент, зав. кафедрой биотехнологии
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: rybakova.arina@pharminnotech.com

Для диагностики содержания холестерина в крови человека используется микробная холестеролоксидаза. Приведены сведения об изучении процесса культивирования продуцента холестеролоксидазы в условиях лабораторного биореактора фирмы Сарториус и масштабировании процесса ферментации в биореактор нового поколения EVIO-LAB. Приведены данные по параметрам процесса биосинтеза и накоплении фермента в процессе ферментации.

Ключевые слова: *холестеролоксидаза, Streptomyces lavendulae, режимы стерилизации сред, параметры биосинтеза, лабораторные биореакторы BIOSTAT A и EVIO-LAB.*

Атеросклероз – наиболее распространенное заболевание сердечно-сосудистой системы человека. Гибель более полумиллиона населения в возрасте старше 40 лет от инсультов и инфарктов, являющихся тяжелыми осложнениями атеросклеротического процесса, остро ставит проблему поиска средств профилактики и лечения атеросклероза. Ведущим фактором риска в атеросклеротическом процессе является повышенное содержание богатых холестерином липопротеидов.

Нарушение обмена холестерина приводит к повышению его содержания в плазме крови – одной из основных причин возникновения атеросклероза. Атеросклероз поражает все артерии, но, прежде всего, артерии сердца и мозга.

Одной из важных проблем является выявление на ранней стадии заболевания повышенного содержания холестерина в крови. Для контроля уровня холестерина в организме человека используются тест-системы, в состав которых входит холестеролоксидаза – ФАД-зависимый фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз [1]. Холестеролоксидаза катализирует реакцию окисления холестерина до 4-холестен-3-она, в результате чего образуется перекись водорода, концентрацию которой соотносят с концентрацией холестерина в организме человека. Исходя из этого, этот фермент имеет огромное значение в медицинской практике, а разработка технологии его получения является весьма актуальной задачей, поскольку в России данного производства не существует [2].

Холестеролоксидазу получают только путем микробиологического синтеза. Наиболее эффективными продуцентами являются актинобактерии (*Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces* и т.д.). На сегодняшний день в мире существует диагностическое средство, производимое японской фирмой Toyobo. В его состав входят иммобилизованные ферменты холестеролэстераза и холестеролоксидаза, получаемые микробиологическим синтезом. В России не существует производства фермента холестеролоксидазы, закупка осуществляется через сеть дистрибьюторов в Германии.

Возможность использования микробной холестеролоксидазы в качестве диагностического средства ставит задачу разработки технологии получения этого фермента.

В СПХФУ на кафедре биотехнологии в течение ряда лет ведутся работы с продуцентом фермента холестеролоксидазы. Разработана технология получения данного фермента в лабораторных условиях. Подобраны и оптимизированы составы питательных сред для поддержания культуры в активном состоянии, выращивания посевного материала и ферментации. Проведены работы по определению возраста посевного материала, доли посевного материала при передаче его на стадию ферментации, продолжительности процесса биосинтеза фермента.

Во всех проведенных экспериментах культивирование продуцента проводилось в колбах на качалочной платформе, что имеет свои недостатки: отсутствие возможности подачи воздуха, отведения углекислого газа, регулирования частоты оборотов при вращении качалочной платформы, а также существенным недостатком является ограниченный объем воздуха для аэрации в качалочных колбах. Также использование колб для культивирования является малоэффективным методом, поскольку существенно снижается выход холестеролоксидазы.

Целью данного исследования является осуществление одного из этапов разработки промышленного метода культивирования продуцента холестеролоксидазы *S. lavendulae*. В качестве решения этой проблемы применяется масштабирование – перенос процесса ферментации из качалочных колб в лабораторный биореактор.

Объектом исследования являлся продуцент холестеролоксидазы – культура *Streptomyces lavendulae* штамм ВКМА-840Д из коллекции культур кафедры биотехнологии СПХФУ. Споровый материал, выращенный в пробирках со скошенным картофельным агаром, представлял собой колонии белого и розовато-лилового цвета, воздушный мицелий белый, субстратный пепельно-серого цвета, пигмента не образует.

Процесс выращивания посевного материала и стадия ферментации осуществлялась в качалочных колбах объёмом 750 мл с объёмом питательной среды 150 мл.

При культивировании использовали посевную и ферментационную среду одинакового состава. В питательных средах использовали глюкозу, NH_4NO_3, $CaCO_3$, дрожжи пекарские. Среда растворения – водопроводная вода. pH до стерилизации среды 6,4-6,6.

Для засева одной колбы со 150 мл среды использовали споровый материал. Посевной материал вносили в колбу в размере 6% от объема ферментационной среды. Продолжительность выращивания посевного материала и ферментации составляла 24 часа при температуре (27±1)°С на качалке при интенсивности колебаний 200-220 об/мин.

Бактерии вида *S. lavendulae* накапливают фермент внутриклеточно, что упрощает его очистку по сравнению с выделением из нативного раствора, так как последнее связно с отделением фермента от множества примесей. Из клеток продуцента холестеролоксидазу можно извлечь с помощью мягких поверхностно активных реагентов: Тритон Х-100 и Твин-80, которые служат для разрушения белок-липидных и межлипидных связей мембраны микробной клетки.

Определение активности холестеролоксидазы проводили по методу Ричмонда [3]. Этот метод определения холестерина (ферментативный) считается самым точным. Он основан на действии холестеролоксидазы, в результате чего образуются холестенон и перекись водорода. Оба эти вещества могут быть определены сравнительно простыми методами: холестенон – по изменению светопоглощения при длине волны 240 нм, перекись водорода – теми методами, которые используются при определении глюкозы.

Ранее работы по масштабированию процесса культивирования продуцента холестеролоксидазы проводились в условиях биореактора фирмы Сарториус BIOSTAT A, установленного на кафедре биотехнологии. Посевной материал во всех опытах выращивали в стандартных для данной культуры условиях в качалочных колбах Эрленмейера. Выращенный посевной материал в асептических условиях передавали в биореактор за счет разницы давлений в посевной колбе и в аппарате.

В начальных экспериментах особое значение в экспериментах уделяли стерилизации. Так как в состав питательной среды как источник органического азота входят дрожжи хлебопекарные, содержащие живые клетки культуры *Saccharomyces cerevisiae,* эта среда не может быть пропущена через стерилизующий фильтр в заранее подготовленный и простерилизованный биореактор. Это влечет за собой необходимость стерилизовать биореактор совместно с питательной средой. Однако, при стандартных методах стерилизации аппарата со средой оказалось, что дрожжи полностью не отмирали, режим стерилизации был не эфективным. При высеве стерилизованной среды на агаризованные среды наблюдали рост *Saccharomyces cerevisiae.*

При изучении процесса стерилизации питательных сред для биосинтеза холестеролоксидазы была разработана методика стерилизации биореактора с питательной средой в автоклаве. По предложенной методике вначале была приготовлена суспензия хлебопекарных дрожжей в воде и предварительно простерилизована в автоклаве, затем стерильная суспензия добавлена в состав полноценной питательной среды в биореактор. Далее была проведена повторная стерилизация биореактор со средой. Альтернативный подход к режиму стерилизации оказался успешным. Высевами на агаризованные среды было доказано отсутствие роста дрожжей на чашках Петри.

В работах было уделено внимание таким параметрам, как подача воздуха, режимам перемешивания и времени проведения процесса биосинтеза фермента [4].

Вначале изучения биосинтеза холестеролоксидазы в условиях биореактора было решено максимально приблизить параметры ферментации в аппарате к параметрам процесса в колбах. Таким образом, время ферментации в биореакторе оставили равным времени ферментации в колбах, то есть 24 часа. Температуру оставили равной 28°С. Для расчёта объёма подаваемого воздуха было произведено определение потребления кислорода продуцентом при ферментации в колбах. Приняли, что за 24 часа ферментации расходуется весь кислород, находящийся в колбе. Получилось, что для проведения ферментации в биореакторе необходимо подавать 300 мл воздуха в минуту (объём загрузки – 1500 мл). Число оборотов качалочного стола составляет 220 мин$^{-1}$.

Однако, геометрия колбы значительно отличается от геометрии биореактора. Также в биореакторе имеется двухъярусная мешалка, отбойники, что способствует образованию потоков жидкости, нехарактерных для качалочных колб. Для биореактора выбрали частоту оборотов равную 300 мин$^{-1}$. Во всех опытах для гашения пены в среду перед началом ферментации добавляли 10 мл подсолнечного масла.

Было показано, что увеличение подачи воздуха положительно сказывается на содержании растворённого кислорода в среде. Так, при подаче 300 мл/мин кислород сохраняется в среде на высоком уровне лишь в течение 3 часов от начала ферментации. При подаче же 1200 и 5000 мл/мин высокое содержание кислорода в культуральной жидкости наблюдается в течение 9 и 10 часов соответственно. Стоит отметить, что граница максимальная, изученная в данном исследовании подача воздуха, равная 5000 мл/мин, обусловлена возможностями компрессора, используемого в лаборатории. В табл. 1 представлено влияние различного объёма подаваемого в биореактор воздуха на активность фермента.

Таблица 1 – Сравнение суммарной активности холестеролоксидазы по отношению к контролю при разной подаче воздуха в биореактор

Объём воздуха, подаваемого в биореактор в единицу времени, мл/мин	Σ А холестеролоксидазы по отношению к контролю, %
300	29,4±2
1200	54,0±3
5000	177±9

Очевидно, что большая подача воздуха в биореактор при ферментации оказывает положительное влияние на суммарную активность фермента. Поэтому было решено при проведении оценки влияния частоты оборотов мешалки на процесс использовать максимальную подачу воздуха в биореактор, то есть 5000 мл/мин.

При выборе новых значений частоты вращения мешалки в процессе ферментации в биореакторе было решено оценить влияние как увеличенного числа оборотов по отношению к первоначально подобранному значению 300 мин$^{-1}$ (табл. 2). Верхняя граница – 400 оборотов в минуту. Выбор верхней границы был обусловлен возможностями пеногасителя.

Таблица 2 – Сравнение суммарной активности холестеролоксидазы по отношению к контролю при разной частоте вращения мешалки

Частота оборотов перемешивающего устройства, мин$^{-1}$	ΣА холестеролоксидазы по отношению к контролю, %
300	177±9
400	190±10

Из таблицы 2 видно, что увеличение числа оборотов мешалки также благоприятно сказалось на активности фермента.

Таким образом, в результате оценки влияния подачи воздуха в биореактор в процессе ферментации и влияния частоты оборотов перемешивающего устройства были определены оптимальные параметры для ферментации в биореакторе, представленные в табл. 3.

Таблица 3 – Оптимальные параметры ферментации продуцента холестеролоксидазы *Streptomyces lavendulae* в лабораторном биореакторе

Параметр	Значение
Температура, °С	28
Частота оборотов мешалки, мин$^{-1}$	400
Подача воздуха, мл/мин	5000

В настоящий момент на кафедре биотехнологии СПХФУ установлен новый биореактор Evio производства фирмы ООО «Фармтехнолоджис», который используется для аэробного культивирования клеток (рис 1).

Рисунок 1. Биореактор Evio производства фирмы ООО «Фармтехнолоджис»

В конструкцию биореактора входит барботер, позволяющий контролировать подачу воздуха, а также устройство для отведения углекислого газа и мешалка, нужную частоту оборотов которой можно устанавливать. Ферментер также оснащен возможностью регулирования как в ручном, так и в автоматическом режимах следующих параметров: температура, pH, pO_2, загрузка продукта, пенообразование, давление, смешение газов.

На первых этапах было изучено устройство биореактора Evio производства фирмы ООО «Фармтехнолоджис». Изучены режимы стерилизации как пустого аппарата, так и аппарата со средой.

Все опыты и эксперименты, которые были проведены на биореакторе фирмы Сарториус BIOSTAT A, будут повторены на новом современном биореакторе Evio. В задачу проводимых экспериментов будет входить подбор параметров культивирования продуцента, обеспечивающих получение фермента на уровне не ниже, чем на качалочных колбах. Это позволит продолжить эксперименты по масштабированию процесса биосинтеза фермента холестеролоксидазы и разработке технологии промышленного получения данного фермента в нашей стране.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kumari L, S. Kanwar S. Cholesterol Oxidase and Its Applications. Advances in Microbiology. Scientific Research Publishing, Inc. 2012;02(02):49–65. DOI: 10.4236/aim.2012.22007.

2. MacLachlan J, Wotherspoon ATL, Ansell RO, Brooks CJW. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier BV. 2000 Apr;72(5):169–95. DOI: 10.1016/s0960-0760(00)00044-3.

3. Попова АС, Крюкова КИ, Савельева ПД, Колодязная ВА. Использование ферментов в диагностических системах. Сборник материалов IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая Фармация – потенциал будущего». 2019 22-23 апреля; 434-436.

4. Булдакова ТВ, Барановский АЕ, Дроздов МА, Бутрова ВА. Основы применения дизайна эксперимента для постановки опытов в области биотехнологии. Сборник статей международной исследовательской организации «Cognitio» по материалам III международной научно-исследовательской конференции: «Актуальные проблемы науки XXI века». 2015 октябрь;1: 10-13.

SUMMARY

STUDY OF THE CHOLESTEROL OXIDASE ENZYME BIOSYNTHESIS IN CONDITIONS OF A NEW GENERATION LABORATORY BIOREACTOR EVIO-LAB, PHARMTECHNOLOGIES

Rybakova A.I., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Microbial cholesterol oxidase is used to diagnose the content of cholesterol in human blood. Information of the study of the process of cholesterol oxidase producer cultivation in a laboratory Sartorius bioreactor and the scaling-up of the fermentation into a new generation EVIO-LAB bioreactor are presented. The data of the parameters of biosynthesis and the accumulation of the enzyme during the fermentation are presented.

Key words: *cholesterol oxidase, Streptomyces lavendulae, media sterilization modes, biosynthesis parameters, laboratory bioreactors BIOSTAT A and EVIO-LAB.*

REFERENCES

1. Kumari L, S. Kanwar S. Cholesterol Oxidase and Its Applications. Advances in Microbiology. Scientific Research Publishing, Inc. 2012;02(02):49–65. DOI: 10.4236/aim.2012.22007.

2. MacLachlan J, Wotherspoon ATL, Ansell RO, Brooks CJW. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier BV.; 2000 Apr;72(5):169–95. DOI: 10.1016/s0960-0760(00)00044-3.

3. Popova AS, Kryukova KI, Savelyeva PD, Kolodyaznaya VA. Use of enzymes in diagnostic systems. Collection of materials of the IX All-Russian Scientific Conference of Students and Postgraduates with International Participation "Young Pharmacy – Possibilities of the Future". 2019 April 22-23; 434-436. (in Russ)

4. Buldakova TV, Baranovsky AE, Drozdov MA, Bugrova VA. The basics of using experimental design for setting up experiments in the field of biotechnology. Collection of articles of the international research organization "Cognitio" based on the materials of the III international research conference: "Actual problems of science in the XXI century." 2015 October; 1: 10-13. (in Russ)

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ ИОНООБМЕННОЙ СОРБЦИИ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ОПТИМАЛЬНОГО РЕЖИМА ВЕДЕНИЯ ПРОЦЕССА

Смирнов С.В., студ. 4 курс, **Воронов А.О.**, аспирант 4 года обучения
Руководитель: **Глазова Н.В.**, канд. хим. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: smirnov.sergej@pharminnotech.com

Целью данной работы является оптимизация сорбционной очистки методом ионообменной сорбции с помощью программы, позволяющей исследовать зависимость параметров ведения процесса от входных данных (диаметра частиц, коэффициента внутримолекулярной диффузии, коэффициента распределения, …). Результат работы – приложение, с помощью которого можно определить интервал оптимальных значений параметров режима ведения процесса.

Ключевые слова: *сорбция, оптимизация сорбционной очистки, критерий регулярности, сорбенты, моделирование, ферменты.*

На промышленных предприятиях биотехнологических субстанций оптимизация является одной из существенных задач, поскольку процесс производства следует проводить рационально с максимальной эффективностью и выходом по целевому продукту при минимальных затратах. Следовательно, очевидна актуальность данной работы, заключающаяся в разработке ПО для оптимизации сорбционной очистки. Цель работы – оптимизировать сорбционную очистку высокомолекулярных веществ с определением оптимального режима ведения процесса. Задача данной работы – разработать программу для моделирования хроматографической очистки, позволяющую построить и исследовать зависимость оптимальных параметров ведения процесса от входных данных, являющихся характеристиками технологического процесса и свойств сорбентов.

Для разработки программы использовался дистрибутив Anaconda. Язык программирования, на котором написана программа – Python. Версия 3.8.

Любую систему, можно представлять как черный ящик, который принимает на вход определённые параметры, а на выходе возвращает результаты, отражающие состояние чёрного ящика [1]. Оптимизация – это процесс модификации системы для повышения её эффективности. Если объектом оптимизации является процесс, то задача оптимизации бу-

дет заключаться в поиске некоторой области значений его параметров, в которой критерий оптимальности, зависящий от результатов процесса, будет принимать экстремальное значение.

$$y = f(x_0, x_1, x_2, \ldots, x_n)$$

Рисунок 1. Схематичное изображение чёрного ящика

На кафедре биотехнологии, на основе теории ионного обмена и экспериментальных данных была разработана модель процесса сорбции на ионообменной колонке. В данной модели наиболее важными факторами, влияющими на выходные контролируемые параметры, являются: коэффициент внутримолекулярной диффузии $\overline{D}$, диаметр частиц сорбента $d_{част}$, объёмный коэффициент распределения K_d, скорость пропускания раствора $\omega_{раб}$, высоту насыпного слоя сорбента H_0 и порозность слоя ε [5].

Сорбция может проходить в равновесных и неравновесных условиях. Если рассматривать неравновесную сорбцию, то в любой момент времени равновесие в колонке отсутствует, так как лимитирующей стадией процесса будет диффузией к ядру сорбента. Данный процесс характеризуется коэффициентом внутримолекулярной диффузии $\overline{D}$. Исходя из этого, при технических расчётах ионообменной колонки нужно учитывать кинетический фактор для внутридиффузной кинетики.

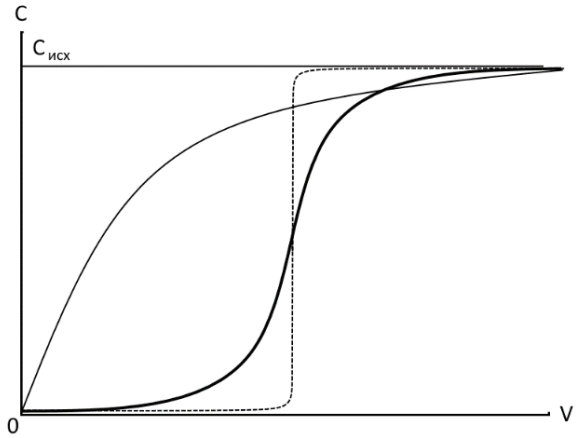


Рисунок 2. Выходные кривые процессов сорбции. Пунктирная линия – сорбция в равновесных условиях. Тонкая сплошная линия – сорбция в неравновесных условиях и нерегулярном режиме. Толстая сплошная линия – сорбция в неравновесных условиях и регулярном режиме

В равновесных условиях (равновесная сорбция) в течение практически всего времени из колонки выходит раствор, не содержащий целевого вещества, так как всё вещество сорбируется на колонке. В момент завершения процесса («проскок») из колонки начинает выходить раствор, концентрация которого равна концентрации исходного. На рисунке 2 пунктирной линией изображена выходная кривая, характеризующая данный процесс.

В неравновесных условиях этот механизм искажается, а именно концентрация выходящего из колонки раствора постепенно возрастает. На рисунке 2 неравновесный процесс характеризуют две выходные кривые: тонкая сплошная и толстая сплошная, которые относятся соответственно к нерегулярному и регулярному режиму неравновесного процесса сорбции. При регулярном режиме выходная кривая искажается симметрично, а при нерегулярном – несимметрично, поэтому для эффективного ведения сорбции и моделирования её процесса необходимы условия, обуславливающие регулярный режим [2].

Условия регулярности режима при внутридиффузионном механизме кинетики ионного обмена (в случае резковыпуклой изотермы сорбции, характеризующую высокую избирательность сорбции) описывается критерием регулярности λ [5]:

$$\lambda = 12 \cdot (1 - \varepsilon_0) \cdot K_d \cdot \frac{\overline{D}}{\omega_{раб} \cdot d^2_{част}} \cdot H, \quad \text{, где}$$

$K_d = \frac{\overline{C}}{C}$ – объёмный коэффициент распределения, где $\overline{C}$ – равновесная концентрация вещества в сорбенте, а C – концентрация вещества в растворе. $K_d = 54$;

$\overline{D}$ – эффективный коэффициент внутренней диффузии, м²/с = 5·10-12 м²/с;

ε_0 – порозность насыпного слоя сорбента, $\varepsilon_0 = 0{,}4$ (для насыпного слоя сферических частиц);

H_0 – высота насыпного слоя сорбента, $H_0 = 1{,}6$ м;

$\omega_{раб}$ – скорость пропускания раствора, м/с;

$d_{част}$ – диаметр зерна сорбента, $d_{част} = 0{,}4$ мм.

Приведенные выше численные значения величин, входящих в уравнение, взяты по данным завода [4].

Данного критерия, характеризующего меру равновесности проводимого процесса, недостаточно для использования в практических целях, поэтому также вводятся следующие оптимизационные критерии, а именно общее число колонн и эффективность работы колонны.

Таким образом, можно уточнить схему «чёрного ящика» процесса ионообменной сорбции:

Рисунок 3. Уточнённая схема «чёрного ящика» процесса ионообменной сорбции

Для определения оптимизационных критериев была разработана программа на языке Python 3, которая выполняет полный расчёт колонны для данных сорбента и раствора. При правильном подборе входных величин значение оптимизационной функции, например, $N = f(d_{част})$ будет меняться незначительно, а положение самой точки будет носить оптимальный характер на кривой (рассматривая функцию $N = f(d_{част})$ значение функции – число единиц оборудования). Принято говорить о таком режиме, как о не зависящем от диаметра частиц зерна сорбента, и, по сути, оптимальном [2].

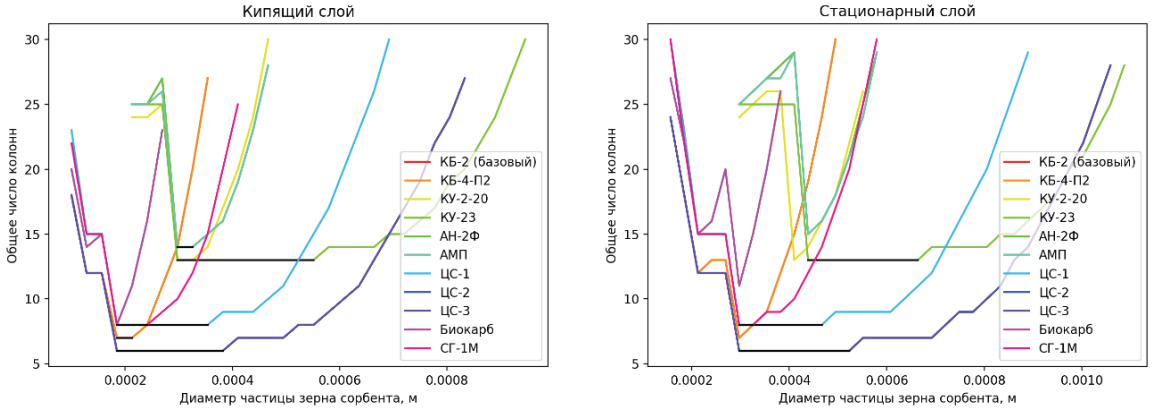


Рисунок 4. На правом графике изображены оптимизационные кривые для разных сорбентов при сорбции в кипящем слое сорбента. На правом, соответственно, кривые для тех же сорбентов, но сорбция проводится в стационарном слое сорбента. Черным цветом на кривых обозначен диапазон оптимальных диаметров частиц сорбента, в котором значение функции (число единиц оборудования) меняется незначительно

На рисунке 4 представлены графики $N = f(d_{част})$ для сорбции в кипящем и стационарных слоях соответственно. В этом случае, решением задачи оптимизации (оптимальным режимом) будет некий диапазон значений диаметров зерен определённого сорбента, при котором число колонн минимально и не меняется (или меняется незначительно).

Точные границы данного диапазона программа выводит в файл “output.txt”. Его содержимое будет выглядеть следующим образом:

Сорбент	Коэф.диф	Наим.диам.	Наиб.диам.	Слой	N	λ сорбции	η десорбции
КБ-2 (базовый)	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$2.271 \cdot 10^{-4}$	$0.360 \cdot 10^{-3}$	Дин.	4	1.39112	40.90711
КБ-2 (базовый)	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$3.101 \cdot 10^{-4}$	$0.443 \cdot 10^{-3}$	Стат.	6	0.54219	41.65389
КБ-4-П2	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$2.271 \cdot 10^{-4}$	$0.360 \cdot 10^{-3}$	Дин.	4	1.39460	40.90711
КБ-4-П2	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$3.101 \cdot 10^{-4}$	$0.443 \cdot 10^{-3}$	Стат.	6	0.54355	41.65389
КУ-2-20	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$0.360 \cdot 10^{-3}$	$0.492 \cdot 10^{-3}$	Дин.	8	1.14985	29.25624
КУ-2-20	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$0.448 \cdot 10^{-3}$	$0.581 \cdot 10^{-3}$	Стат.	11	0.57534	29.17792
КУ-23	$0.5 \cdot 10^{-11}$	$0.736 \cdot 10^{-3}$	$1.200 \cdot 10^{-3}$	Дин.	2	2.13207	52.41216
КУ-23	$0.5 \cdot 10^{-11}$	$0.907 \cdot 10^{-3}$	$1.200 \cdot 10^{-3}$	Стат.	3	0.90974	56.11201
АН-2Ф	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$0.376 \cdot 10^{-3}$	$0.509 \cdot 10^{-3}$	Дин.	9	1.11189	29.20026
АН-2Ф	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$0.465 \cdot 10^{-3}$	$0.592 \cdot 10^{-3}$	Стат.	12	0.56913	29.11448
АМП	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$0.376 \cdot 10^{-3}$	$0.509 \cdot 10^{-3}$	Дин.	8	1.11189	28.95272
АМП	$2.0 \cdot 10^{-13}$	$0.465 \cdot 10^{-3}$	$0.592 \cdot 10^{-3}$	Стат.	12	0.56913	28.87627
ЦС-1	$1.0 \cdot 10^{-11}$	$0.398 \cdot 10^{-3}$	$1.167 \cdot 10^{-3}$	Дин.	2	3.95275	35.84931
ЦС-1	$1.0 \cdot 10^{-11}$	$0.592 \cdot 10^{-3}$	$1.200 \cdot 10^{-3}$	Стат.	2	0.42316	38.61026
ЦС-2	$1.0 \cdot 10^{-11}$	$0.410 \cdot 10^{-3}$	$1.200 \cdot 10^{-3}$	Дин.	1	7.12178	42.44044
ЦС-2	$1.0 \cdot 10^{-11}$	$0.609 \cdot 10^{-3}$	$1.200 \cdot 10^{-3}$	Стат.	1	0.80580	47.88750
ЦС-3	$1.0 \cdot 10^{-11}$	$0.410 \cdot 10^{-3}$	$1.200 \cdot 10^{-3}$	Дин.	1	7.12178	42.44044
ЦС-3	$1.0 \cdot 10^{-11}$	$0.609 \cdot 10^{-3}$	$1.200 \cdot 10^{-3}$	Стат.	1	0.80580	47.88750
Биокарб	$1.0 \cdot 10^{-13}$	$1.884 \cdot 10^{-4}$	$2.603 \cdot 10^{-4}$	Дин.	6	1.08874	44.54596
Биокарб	$1.0 \cdot 10^{-13}$	$2.548 \cdot 10^{-4}$	$0.327 \cdot 10^{-3}$	Стат.	10	0.55150	45.40293
СГ-1М	$0.9 \cdot 10^{-12}$	$2.824 \cdot 10^{-4}$	$0.498 \cdot 10^{-3}$	Дин.	3	1.67668	45.74174
СГ-1М	$0.9 \cdot 10^{-12}$	$0.393 \cdot 10^{-3}$	$0.603 \cdot 10^{-3}$	Стат.	5	0.49884	46.79638

N – число еденицы оборудования (колонн)
λ сорбции – Критерий регулярности при сорбции
η сорбции – Эффективность сорбции

Рисунок 5. Таблица оптимизационных критериев, вычисляемых программой

Однако оптимизационные кривые могут представлять из себя зависимости эффективности сорбции от диаметра частиц $\eta = f(d_{част})$ как представлено на рисунке 6. Наибольшее значение эффективности наблюдается при небольших диаметрах частиц.

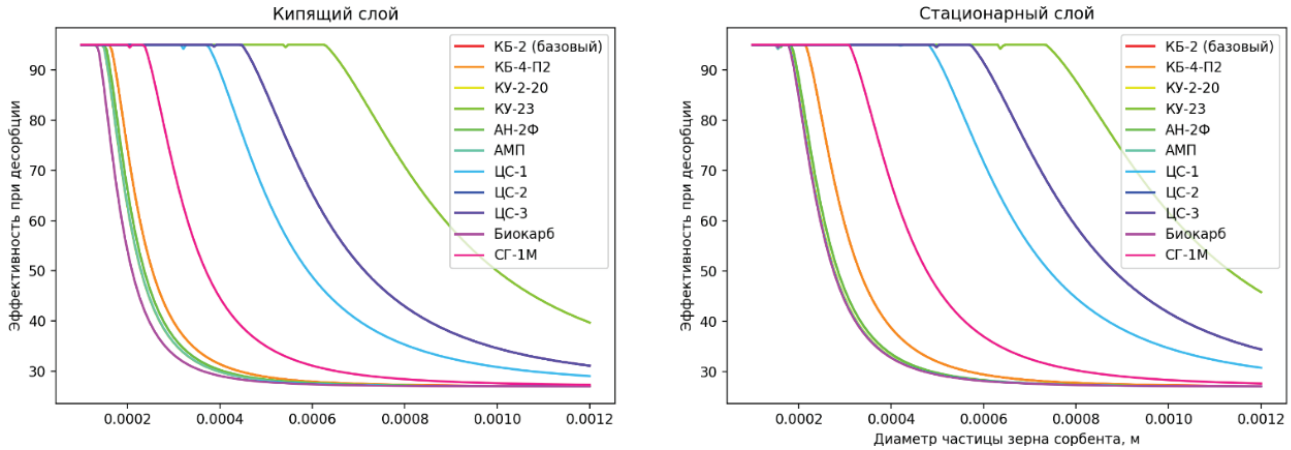


Рисунок 6. Графики зависимостей $\eta = f(d_{част})$ для каждого рассматриваемого сорбента, кипящего и стационарного слоёв соответственно

Однако этим возможности программы не ограничиваются. Допустим, на смоле сорбируются высокомолекулярное и низкомолекулярные соединения, характеризуемые различными объёмным коэффициентом распределения K_d и эффективным коэффициентом внутренней диффузии $\overline{D}$ (в случае высокомолекулярного соединения $K_d = 40$, $\overline{D} = 2*10^{-13}$ м^2/с, а у низкомолекулярного $K_d = 20$, $\overline{D} = 2*10^{-12}$ м^2/с). На рисунке 7 изображены графики с выходными кривыми зависимостей времени проскока от скорости потока $\tau_{проск} = f(\omega_{раб})$. Если на данном графике провести вертикальную линию (то есть зафиксировать определённую скорость), например, $\omega_{раб} = 0.001$ м/с, то время проскока для этих веществ будет различным. Иными словами, при постоянной скорости подачи среды на колонку время проскока (насыщения колонки) различных соединений по своим физико-химическим характеристикам будет различным, что согласуется с экспериментальными данными, полученными на кафедре биотехнологии [4]. Можно предположить, что смеси веществ можно разделять, варьируя скорость подачи среды на колонку. Так же на графике присутствует точка пересечения кривых, соответствующая инверсии порядка выхода компонентов.

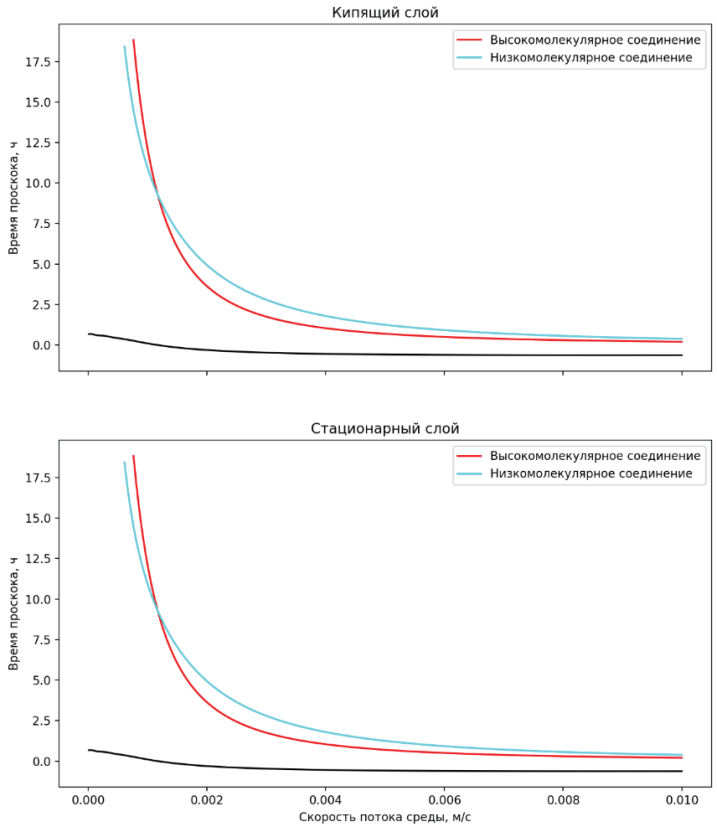


Рисунок 7. Красная кривая соответствует выходной кривой $\tau_{проск} = f(\omega_{раб})$ для высокомолекулярного соединения, а синяя кривая, соответствено, для низкомолекулярного. Чёрная кривая – логарифм отношения значений $\tau_{проск}$ для данных веществ

Таким образом, было разработано программное обеспечение, которое для каждого исследуемого сорбента находит область, при котором число единиц оборудования не зависит от диаметра частиц. Результаты расчётов, получаемые с использованием данного программного обеспечения, соответствуют экспериментальным данным, полученным на кафедре биотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Росс Эшби У. Введение в кибернетику. 1 изд. М.: Издательство иностранной литературы, 1959.

2. Смирнов СВ. Оптимизация сорбционных процессов. Сборник материалов X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». СПб: Изд-во СПХФУ, 2020: 782.

3. Глазова НВ, Куреченко АН, Омельянова АП. Современные технологии выделения, 881-889. DOI: 10.1002/jmv.25041

4. Сальникова СА. Сорбционно-хроматографическая очистка ДНК-азы и цитохрома С в технологии получения фармацевтической композиции: дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербургская Гос. Химико-Фармацевтическая Акад., СПб., 2014.

5. Елькин ГЭ.Концепция регулярности режима сорбции в теории и практике ионного обмена органических ионов. Межвузовский сборник: Ионный обмен и ионометрия. 1990;7:3-15.

6. Глазова НВ. Сорбционное разделение смесей БАВ в квазиравновесных и неравновесных условиях. Тезисы докладов Всерос. симпозиума «Биосепарация-96». СПб. 1996: 11.

7. Glazova NV. Sorption technology protein medicines including of non-equilibrium chromatographic effects. 10-th International Symp. of Chromatography in Industry Bratislava, 1996:173-174

SUMMARY

DEVELOPMENT OF SOFTWARE FOR SIMULATION OF CHROMATOGRAPHIC PURIFICATION OF HIGH-MOLECULAR ORGANIC SUBSTANCES BY THE METHOD OF ION-EXCHANGE SORPTION WITH DETERMINATION OF THE OPTIMAL PROCESS REGIME

Smirnov S.V., 4th year student, **Voronov A.O.**, graduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The purpose of this work is to develop a program that allows you to study the dependence of the parameters of the process on the input data (particle diameter, intramolecular diffusion coefficient, distribution coefficient, ...). The result of the work is an application with which you can determine the interval of values of the parameters of the optimal mode of the process.

Key words: *sorption, optimization of sorption purification, regularity criterion, sorbents, modeling, enzymes.*

REFERENCES

1. Ross Ashby W. Introduction to Cybernetics. 1 ed. Moscow.: Publishing house of foreign literature, 1959. (in Russ)

2. Smirnov SV Optimization of sorption processes. Collection of materials of the X All-Russian scientific conference of students and graduate students with international participation "Young pharmacy - the potential of the future". Saint Petersburg: Publishing house of SPKhFU, 2020 : 782. (in Russ)

3. Glazova NV, Kurechenko AN, Omelyanova AP. Modern Isolation Technologies, 881-889. Doi: 10.1002 / jmv.25041 (in Russian)

4. Salnikova SA. "Sorption-Chromatographic Purification of DNA-Ase and Cytochrome C in the Technology of Obtaining the Pharmaceutical Composition." Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceuical University, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, 2014. (in Russ)

5. Elkin GE. The concept of regularity of the sorption mode in the theory and practice of ion exchange of organic ions. Interuniversity collection: Ion exchange and ionometry. 1990;7:.3-15. (in Russ)

6. Glazova NV. Sorption separation of BAS mixtures in quasi-equilibrium and nonequilibrium conditions. Abstracts of the All-Russia. symposium "Bioseparation-96". Saint Petersburg. 1996 : 11. (in Russ)

7. Glazova NV. Sorption technology protein medicines including of non-equilibrium chromatographic effects. 10-th International Symp. of Chromatography in Industry. Bratislava, 1996:173-174 (in Russ)

СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ РИБОЗИМОВ И РИБОСВИТЧЕЙ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ

Сорокина Н.В., магистрант 1 года обучения, **Зилов Д.С.**, магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Комиссаров А.С.**, к.б.н, ведущий научный сотрудник, НИУ ИТМО
Национальный исследовательский университет ИТМО,
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д. 49, Российская Федерация
E-mail: sorokina@scamt-itmo.ru

Создана обширная база данных рибозимов и рибосвитчей. Она будет использована для генерации синтетических РНК мотивов с помощью методов машинного обучения. Рибозимы и рибосвитчи благодаря их способности регули-

ровать молекулярные процессы в клетке могут быть использованы как инструменты для редактирования генома или регуляции экспрессии генов.

Ключевые слова: *рибозимы, рибосвитчи, РНК, сравнительная геномика, база данных, генная инженерия*

Рибонуклеиновые кислоты (РНК), участвующие в регуляции клеточных процессов, являются перспективными инструментами для создания геннотерапевтических препаратов. Одни из них рибозимы - молекулы, обладающие каталитическими функциями, способные расщеплять или лигировать нуклеотидные цепи РНК [1]. Интерес представляют также рибосвитчи - молекулы, способные регулировать экспрессию гена в ответ на присоединение определенного лиганда [2]. На данный момент открытие новых представителей этих молекул возможно только с помощью вычислительных методов. Но для этого необходим большой объем данных об уже существующих представителях.

Таким образом, целью данной работы является создание базы данных рибозимов и рибосвитчей для сравнительной геномики. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: выбрать семейства рибозимов и рибосвитчей; получить все доступные бактериальные геномы и ковариационные модели; осуществить поиск представителей выбранных семейств в бактериальных геномах.

Данная работа является актуальной, так как на данный момент не существует подобного специализированного ресурса данных. Создание обширной базы данных рибозимов и рибосвитчей необходимо для генерации новых молекул РНК с подобными свойствами с помощью генеративно-состязательной нейросети (GAN).

Для создания базы данных были выбраны 16 семейств рибозимов и 45 семейств рибосвитчей, характерных для бактериальных организмов. Из базы данных NCBI были скачаны 216 118 бактериальных геномов. Для аннотации были использованы ковариационные модели (КМ) каждого семейства, полученные из базы данным Rfam [3]. Это статистические модели, отражающие пространственную структуру определенных РНК. Далее был осуществлен поиск рибозимов и рибосвитчей по предсказанным моделям КМ с использованием программы “Infernal” [4]. Полученные данные были переведены в стандартный формат gff с помощью скрипта, написанного на Python.

В результате было получено 43 118 589 элементов, из которых 10 626 962 - рибозимы, 32 491 627 - рибосвитчи. О каждом элементе известна следующая информация: принадлежность к виду, к классу регуляторной молекулы РНК, локализация в геноме, длина, направление, нуклеотидная последовательность.

Новизна работы заключается в следующем: во-первых, обычно поиск подобных мотивов выполнялся в межгенных участках, мы осуществили полногеномный поиск; во-вторых, были исследованы все доступные бактериальные геномы.

Дальнейшее применение этого исследования состоит в том, чтобы создать генеративно-состязательную нейронную сеть для получения новых, отсутствующих в природе рибозимов и рибосвитчей. Помимо этого, полученная база после ее публикации может быть использована другими учеными, как для изучения эволюции рибозимов и рибосвитчей, так и для подбора нуклеотидных последовательностей для синтеза регуляторных молекул РНК.

В результате была создана обширная база данных рибозимов и рибосвитчей. Представляет собой полезный ресурс данных, так как может быть использована во многих сферах от генной инженерии до филогенетики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Park SV, Yang JS, Jo H, Kang B, Oh SS, & Jung GY. Catalytic RNA, ribozyme, and its applications in synthetic biology. Biotechnology advances. 2019;37(8). 107452. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107452

2. Pavlova N, Kaloudas D, & Penchovsky R. Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria. Gene. 2019;708,38–48. https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.036

3. Nawrocki EP, Burge SW, Bateman A, Daub J, Eberhardt RY, Eddy SR, Floden EW, Gardner PP, Jones TA, Tate J, & Finn RD. Rfam 12.0: updates to the RNA families database. Nucleic acids research. 2015;43(Database issue), D130–D137. https://doi.org/10.1093/nar/gku1063

4. Nawrocki EP, & Eddy, SR. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. Bioinformatics (Oxford, England). 2013;29(22),2933–2935. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt509

SUMMARY

CREATION OF THE DATABASE OF RIBOZYMES AND RIBOSWITCHES FOR COMPARATIVE GENOMICS

Sorokina N.V., 1st year master’s student, **Zilov D.S.**, 2nd year master’s student
University ITMO;
49, Kronverksky Pr., St. Petersburg, 197101, Russian Federation

An extensive database of ribozymes and riboswitches has been compiled. This database will be used for the generation of synthetic RNA motifs using machine learning methods. Ribozymes and riboswitches, due to their ability to regulate molecular processes in the cell, can be used as tools for genome editing or regulation of gene expression.

Key words: *ribozymes, riboswitches, RNA, comparative genomics, database, genetic engineering.*

REFERENCES

1. Park SV, Yang JS, Jo H, Kang B, Oh SS, & Jung GY. Catalytic RNA, ribozyme, and its applications in synthetic biology. Biotechnology advances. 2019;37(8). 107452. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107452

2. Pavlova N, Kaloudas D, & Penchovsky R. Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria. Gene. 2019;708,38–48. https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.036

3. Nawrocki EP, Burge SW, Bateman A, Daub J, Eberhardt RY, Eddy SR, Floden EW, Gardner PP, Jones TA, Tate J, & Finn RD. Rfam 12.0: updates to the RNA families database. Nucleic acids research. 2015;43(Database issue), D130–D137. https://doi.org/10.1093/nar/gku1063

4. Nawrocki EP, & Eddy, SR. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. Bioinformatics (Oxford, England). 2013;29(22),2933–2935. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt509

БИОЭНЕРГЕТИКА СВЕЖЕВЫДЕЛЕННЫХ МИТОХОНДРИЙ КОРКОВОГО СЛОЯ ПОЧЕК ПРИ РАЗВИТИИ СОЛЕЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

Султанова Р.Ф., маг. 2 года обучения[1,2], **Домондон М.**[2], **Никифорова А.Б.**[2], **Шибалски Р.**[2]

Руководители: **Илатовская Д.В.**[2], к.б.н., проф.; **Янкелевич И.А.**[1], к.б.н., с.н.с.

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация

[2] Медицинский Университет Южной Каролины, Кафедра Медицины, Ул. Эшли, д. 171, Чарльстон, Южная Каролина, США 29425

E-mail: regina.sultanova@pharminnotech.com

В ходе работы изучалась биоэнергетика свежевыделенных митохондрий коркового слоя почек животных, в которых индуцировали развитие солечувствительной гипертонии.

Ключевые слова: *животная модель, солечувствительная гипертония, выделительная система, митохондрии, почка, биоэнергетика.*

Солечувствительная гипертония – это заболевание, при котором происходит повышение артериального давления в ответ на потребление соли. В ходе развития данного заболевания формируется дисфункция кровеносной и выделительной систем и наблюдаются гломерулосклероз, а также функциональное и денегеративное повреждение почечных канальцев [1,2]. Ранее мы показали, что в свежеизолированных почечных клубочках в ходе развития солечувствительной гипертонии возникают функциональные и структурные нарушения митохондрий, что может являться причиной развития поражения тканей почки [3]. На основании ранее полученных данных была сформулирована следующая гипотеза: повреждение ткани коркового слоя почек в животной модели солечувствительной гипертонии происходит вследствие изменений в биоэнергетике митохондрий. Целью данной работы была характеризация механизмов, приводящих к нарушению митохондриальной функции в кортикальном слое почки в этом заболевании.

Стандартной животной моделью для изучения солечувствительной гипертонии являются крысы чистой линии Dahl SS. В качестве бъекта исследования использовали митохондрии, выделенные из ткани коркового слоя почек данных животных. Гипертонию вызывали у опытных крыс в возрасте 8 недель, пересаживая их на высокосолевую диету (ВС, 4% NaCl) на 21 день; контрольная группа крыс того же возраста получала диету с нормальным содержанием соли (НС, 0,4% NaCl). В конце 21-дневного протокола крысам измеряли артериальное давление с помощью метода Tail-cuff, проводили операцию по промыванию почек, собирали ткани и органы. Из коркового слоя почек выделяли митохондрии с помощью метода дифференциального центрифугирования. Свежевыделенные митоходрии изучали следующими методами: измерение мембранного потенциала митохондрий с использованием флуоресцентного красителя TMRM (300 нМ), измерение продукции пероксида водорода и супероксидного аниона с использованием красителей Amplex Red (20 мкМ) и MCLA (20 мкМ) соответственно, Вестерн-блот, полимеразная цепная реакция qPCR, измерение активности супероксид дисмутазы, электронная микроскопия, анализ респираторной функции митохондий (т. н. Seahorse). Статистическая обработка данных проводилась методом 1-way ANOVA, уровень значимости принимали за 0.05.

Ожидаемо, артериальное давление было повышено у крыс на высокосолевой диете по сравнению с контрольной группой (171±9 против 148±6 мм рт. ст. в группах ВС и НС соответственно, n=11 в каждой группе), что подтвердило развитие солечувствительной гипертонии в данной модели. Мы показали, что мембранный потенциал митохондрий, продукция митохондриального пероксида водорода и супероксида у группы ВС были выше, чем у группы НС (35±12%, 7±1% и 13±2% опыт выше контроля для мембранного потенциала, продукции пероксида водорода и супероксида соответственно). В то же время мы наблюдали незначительное повышение активности митохондрильной супероксид дисмутазы в кортексе группы ВС (разницы в экспрессии фермента обнаружено не было).

Анализ Seahorse показал, что скорость потребления кислорода, стимулированная добавлением АДФ, запасная и мак-

симальная скорости потребления кислорода митохондриями достоверно (p<0,05) ниже в группе крыс на диете с нормальным содержанием соли по сравнению с опытной группой.

Вестерн-блот продемонстрировал значительное понижение экспрессии белка OPA1, который отвечает за деление митохондрий, в кортексе почки опытной группы; электронная микроскопия подтвердила повреждение митохондрий и нарушения в их слиянии и делении в клетках кортикальных сегментов нефрона.

В данной работе мы впервые исчерпывающе показали нарушение биоэнергетики митохондрий и антиоксидантной системы кортикального слоя почек при развитии солечувствительной гипертонии. Дальнейшие исследования будут направлены на поиск причин данного процесса, и определение этапов временного сопряжения повреждения ткани и митохондрий. Полученные данные могут быть использованы при разработке препаратов для лечения гипертензивного повреждения почки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bihorac A, Tezcan H, Ozener C, Oktay A, Akoglu E. Association between salt sensitivity and target organ damage in essential hypertension. American Journal of Hypertension [Internet]. Oxford University Press (OUP). 2000 Aug 1;13(8):864–72. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s0895-7061(00)00253-3.

2. Morimoto A, Uzu T, Fujii T, Nishimura M, Kuroda S, Nakamura S, et al. Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hypertension. The Lancet [Internet]. Elsevier BV. 1997 Dec;350(9093):1734–7. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(97)05189-1.

3. Domondon M, Polina I, Nikiforova AB, Sultanova RF, Kruger C, Vasileva VY, et al. Renal Glomerular Mitochondria Function in Salt-Sensitive Hypertension. Frontiers in Physiology [Internet]. Frontiers Media SA. 2020 Feb 4;10. Available at: http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01588.

SUMMARY

BIOENERGETICS OF THE FRESHLY ISOLATED RENAL CORTICAL MITOCHONDRIA IN THE ANIMAL MODEL OF THE SALT SENSITIVE HYPERTENSION

Sultanova R., 2nd year MS student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

We analyzed bioenergetics of the freshly isolated renal cortical mitochondria during the induction of the salt sensitive hypertension in the standard animal model.

Key words: *animal model, salt sensitive hypertension, renal system, kidney, mitochondria, bioenergetics.*

REFERENCES

1. Bihorac A, Tezcan H, Ozener C, Oktay A, Akoglu E. Association between salt sensitivity and target organ damage in essential hypertension. American Journal of Hypertension [Internet]. Oxford University Press (OUP). 2000 Aug 1;13(8):864–72. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s0895-7061(00)00253-3.

2. Morimoto A, Uzu T, Fujii T, Nishimura M, Kuroda S, Nakamura S, et al. Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hypertension. The Lancet [Internet]. Elsevier BV. 1997 Dec;350(9093):1734–7. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(97)05189-1.

3. Domondon M, Polina I, Nikiforova AB, Sultanova RF, Kruger C, Vasileva VY, et al. Renal Glomerular Mitochondria Function in Salt-Sensitive Hypertension. Frontiers in Physiology [Internet]. Frontiers Media SA. 2020 Feb 4;10. Available at: http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01588.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИКИ МЕХАНИЗМА ОБРАЗОВАНИЯ МАТРИЦЫ БЕЛКОВО-ПОРИСТОЙ СИСТЕМЫ (НА МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ – БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН)

Романенко М.С., студ. 2 курса, **Шерстнев В.В.**, магистрант 2 года обучения
Руководители: **Кремневская М.И.**, к.т.н., доцент, **Чухно А.С.**, к.х.н., доцент
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И, Мечникова Минздрава России,
195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47, Российская Федерация
E-mail: marina.romanenko.2001@mail.ru

В работе показана возможность получения губчатых криогелей на основе бычьего сывороточного альбумина и принципиальная возможность их использования в качестве биодеградируемой основы для различных биологически активных веществ (антибиотиков), или в качестве матрицы для выращивания культур клеток, с возможностью дальнейшей трансплантации в живой организм.

Ключевые слова: *гелеобразование белков, биодеградируемая матрица, субстрат для цитологических культур, альбумин, биотехнологии, лекарственные средства.*

Актуальность темы заключается в том, что в нашей работе продемонстрировано, как, используя механизм тепловой и индуцированной агрегации модельного белка, возможно получить белковый гель методом криотропного гелеобразования в неглубоко замороженной системе.

Практическая значимость: показана возможность получения БСА-криогелей, их пористое строение открывает возможность использования в качестве носителя различных биологически активных веществ.

Цель и задачи работы: зная кинетику и механизмы агрегации модельного белка, создать биополимер, который найдет широкое применение в медицине и пищевой промышленности; а также изучение и описание его структуры и свойств.

Были использованы: бычий сывороточный альбумин (БСА), мочевина (≥99.5%), ацетилцистеин (≥99.5%), дистиллированная вода. Применялись методы pH-метрии, кондуктометрии, световой микроскопии, вискозиметрии.

Методика проведения экспериментов**.** Мы брали две навески сухого БСА массой 500 мг и растворяли в двух стаканчиках в 50 мл дистиллированной воды в каждом. К полученному раствору добавляли по 600 мг ацетилцистеина в каждый стаканчик, перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения ацетилцистеина. Растворы сливали в одну фарфоровую чашку и упаривали на водяной бане на 50%. К упаренному раствору добавляли водный раствор мочевины (6 г карбамида, растворенного в 20 мл дистиллированной воды).

Раствор упаривали на водяной бане до 10 мл. Приготовленную таким образом реакционную систему порциями по 5 мл набирали в два 5-миллилитровых пластиковых шприца, которые герметизировали колпачками, охлаждали в стакане с водой, после чего погружали в хладагент камеры жидкостного криостата (96% спирт), с температурой (-20 или -25 °С), где выдерживали в течение 20–24 ч. в вертикальном положении.

После этого шприцы разбирали (при комнатной температуре) для оттаивания криогелей, а затем извлекали из шприца.

При изучении под световым микроскопом видно, что микроструктура полученного альбуминового криогеля (ув.16х100), – состоит из массы мелких шариков, между которыми имеется свободное пространство, – т. е. полученный нами гель имеет пористую структуру.

В нашей работе применен ацетилцистеин, способный разрывать дисульфидные связи в макромолекулах БСА и вызывать деполимеризацию, способствуя более полному разворачиванию полипептидных цепей, также применили специальную методику подготовки реагентов, – механизм тепловой агрегации белка при прогревании реакционной смеси на водяной бане перед погружением в хладагент криостата. Это создает предпосылки для облегчения дальнейшей полимеризации белка с образованием криогеля. Присутствие в системе денатурирующего агента, – мочевины, способствует разворачиванию макромолекул БСА, таким образом, диффузия ацетилцистеина к внутримолекулярным SS-мостам внутри глобулы БСА проходит легче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курганов БИ. Кинетика тепловой агрегации белков. Биохимия. 1998;63:430-432.

2. Лозинский ВИ, Кулакова ВК, Петренко АЮ, Петренко ЮА, Ершов АГ, Суханов ЮВ. Пат. РФ № 2594427. Композиция для формирования макропористого носителя, используемого при трехмерном культивировании клеток животных или человека, и способ получения указанного носителя. 2015: 28.

3. Маркосян КА, Курганов БИ. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агресом. Биохимия. 2004;69(9):1196-1212.

4. Родионов ИА. Криогели на основе сывороточного альбумина:синтез, свойства,структура и возможности биомедицинского применения: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. Научный руководитель: доктор химических наук, профессор Лозинский ВИ. Москва, 2017.

5. Сердюк И. Заккаи Н. Заккаи Дж. Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика. Москва: КДУ, 2010;1:1-542.

6. Финкельштейн АВ, Птицын ОБ. Физика белка. М.: КДУ, 2005:138–146.

SUMMARY

RESEARCH OF THE SPECIFICITY OF THE MECHANISM OF FORMATION OF THE MATRIX OF THE PROTEIN-POROUS SYSTEM (ON THE MODEL SYSTEM – BOVINE SERUM ALBUMIN)

Romanenko M.S., 2nd year student, **Sherstnev V.V.**, 2nd year master's degree

FSEI HPE North-Western State Medical University named after I. I, Mechnikov, Ministry of Health of Russia, 195067, 47 Piskarevsky Ave., St. Petersburg, Russian Federation

This research demonstrates the possibility of obtaining albumin cryogels and shows the principal possibility of using spongy BSA cryogels as a biodegradable base for various biologically active substances (antibiotics), or as a matrix for the cultivation of cytological cultures, with the possibility of further transplantation into a living organism, for example, as a framework for the synthesis of bone or skin tissue.

Key words*: gelation of proteins, biodegradable matrix, substrate for cytological cultures, albumin, biotechnology, medicines.*

REFERENCES

1. Kurganov BI. Kinetika teplovoj agregacii belkov. Biohimija. 1998;63: 430-432. (in Russ).
2. Lozinskij VI, Kulakova VK, Petrenko AJu, Petrenko JuA,. Ershov AG, Suhanov JuV. Pat. RF № 2594427. Kompozicija dlja formirovanija makroporistogo nositelja, ispol'zuemogo pri trehmernom kul'tivirovanii kletok zhivotnyh ili cheloveka, i sposob poluchenija ukazannogo nositelja. 2015: 28. (in Russ).
3. Markosjan KA, Kurganov BI. Folding, nepravil'nyj folding i agregacija belkov. Obrazovanie telec vkljuchenija i agresom. Biohimija. 2004;69(9):1196-1212. (in Russ).
4. Serdjuk I, Zakkai N, Zakkai Dzh. Metody v molekuljarnoj biofizike: struktura, funkcija, dinamika. Moskva: KDU, 2010;1:1-542. (in Russ).
5. Rodionov IA dissertation for a candidate of chemical sciences, topic: "Cryogels based on serum albumin: synthesis, properties, structure and possibilities of biomedical application", supervisor: Doctor of Chemical Sciences, Professor V.I. Lozinsky, Moscow, 2017 (in Russ).
6. Finkel'shtejn AV, Pticyn OB. Fizika belka. Moscow: KDU. 2005: 138–146. (in Russ).

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В МУРМАНСКОЙ ОБЛАСТИ МЕТОДОМ СПОЛИГОТИПИРОВАНИЯ

Терентьева Д.Р., студ. 4 курса
Руководитель: **Гурина С.В**., канд. биол. наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
Вязовая А.А., канд. биол. наук, ст. науч. сотр.
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
E.mail: terenteva.darya@pharminnotech.com

Целью данного исследования было изучение генетических характеристик популяции возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* на территории Мурманской области, а также установление возможной взаимосвязи между циркулирующими штаммами и устойчивостью к противотуберкулезным препаратам. Исследованы 64 изолята *M. tuberculosis*, полученные от проживающих на территории Мурманской области. Лекарственная устойчивость определена методом абсолютных концентраций. Методами ПЦР в реальном времени и сполиготипированием штаммы отнесены к семействам: Beijing, Ural, T, LAM. Генотип Beijing был выявлен у 50% изолятов, генотип Ural – у 20,3%, генотип T – у 9,4%, генотип LAM – у 7,8%. Среди полученных изолятов 41% были устойчивы хотя бы к одному противотуберкулезному препарату, 27% являлись мультирезистентными. Генотип Beijing значимо ассоциирован с множественной лекарственной устойчивостью (P=0,004, OR = 7,52). Неблагоприятная эпидемиологическая обстановка на территории Мурманской области связана с циркуляцией резистентных штаммов *M. tuberculosis* генотипа Beijing.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis, Мурманская область, сполиготипирование, мультирезистентность, генотип Beijing, туберкулез.*

По данным «Всемирной организации здравоохранения» (https://www.who.int/ru), туберкулез – одна из основных 10 причин смерти во всем мире, а также ведущая причина смерти от инфекционного заболевания. В настоящее время это заболевание широко распространенно, и с каждым годом число пациентов с таким диагнозом увеличивается. Так, в 2019 году было зарегистрировано 7,1 миллиона новых случаев в мире, что значительно больше по сравнению с 6,4 миллиона в 2017 году. В последнее время наблюдается распространение штаммов возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), что усложняет его лечение и эпидемиологический контроль. В 2019 году в общей сложности в мире насчитывалось 206030 человек с множественной лекарственной устойчивостью или устойчивостью к рифампицину, противотуберкулезному препарату первого ряда. Этот показатель возрос на 10% по сравнению с 2018 годом (186883 человека).

В России очень неблагоприятная эпидемиологическая ситуация с туберкулезом. Россия входит в 20 стран с тяжелым течением этого заболевания, а также в 20 стран с широким распространением множественной лекарственной устойчивости. Продолжается распространение штаммов *M. tuberculosis,* обладающих МЛУ.

Мурманская область расположена на северо-западе России у Северного Ледовитого океана. По данным Центрального НИИ организации и информатизации здравоохранения (https://mednet.ru/), в Мурманской области один из наиболее высоких показателей, характеризующих туберкулез как хроническое заболевание: распространенность составляет 61,4 человека на 100 тыс. населения. Это значение выше среднего для Северо-Западного федерального округа (44,6 человека на 100 000 населения). В период с 2016 по 2019 включительно стабильным и высоким оставался процент МЛУ среди зарегистрированных на этой территории случаев туберкулеза и колебался в пределах 17-20%.

Глобальная структура популяции *M. tuberculosis* включает крупные филогенетические линии, генетические семейства и компактные клональные кластеры близкородственных штаммов, которые различаются по своей клинической или эпидемиологической значимости. Генотип Beijing является одним из наиболее распространенных и изученных. Среди этого геноти-

па выделяют штаммы, которые обладают высокой частотой передачи, мультирезистентностью, высокой вирулентностью и тяжелым течением заболевания [1]. Доля генотипа Beijing варьирует в различных регионах, однако является преобладающей для всей России, как правило составляя от 45 до 60% популяции [2]. Быстрое выявление возбудителя и его наиболее значимых генотипов необходимы для успешной борьбы с туберкулезом. Молекулярно-генетические методы (IS6110-фингерпринтинг, сполиготипирование и другие) позволяют одновременно не только выявлять наличие возбудителя туберкулеза, но и классифицировать его [3]. Это позволяет в короткие сроки оценить эпидемиологически значимые характеристики штамма.

Изучение структуры популяции *M. tuberculosis* и выявление наиболее эпидемиологически значимых генотипов, в том числе тех, которые ассоциированы с множественной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, а также характеризующихся высокой частотой передачи, важно для коррекции региональной программы борьбы с туберкулезом, а также разработки стратегии эпидемиологического надзора.

Целью данного исследования было изучение генетических характеристик популяции *M. tuberculosis* на территории Мурманской области, а также установление возможной взаимосвязи между циркулирующими штаммами и устойчивостью к противотуберкулезным препаратам (ПТП).

Объектом исследования были 64 изолята *M. tuberculosis*, полученные в 2017 году от 48 (75%) мужчин и 16 (25%) женщин, наблюдавшихся в Мурманском областном противотуберкулезном диспансере. 5 (7,8%) пациентов имели положительный ВИЧ-статус. Культуры *M. tuberculosis* выделены из клинического материала на среде Левенштейна-Йенсена. Определение лекарственной чувствительности изолятов *M. tuberculosis* к ПТП проводили методом абсолютных концентраций на плотных питательных средах и методом пропорций на жидкой питательной среде в системе Bactec MGIT 960 (Приказ Минздрава РФ от 21.03.2003 г. № 109) Если штамм *M. tuberculosis* был устойчив к одному ПТП, его считали монорезистентным, если к двум и более – полирезистентным. При наличии одновременной устойчивости и к изониазиду, и к рифампицину штамм определяли как МЛУ. Для экстракции ДНК применяли методику с использованием цетилтриметиламмония бромида (CTAB), протеиназы К, с последующей очисткой смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт и осаждение ДНК изопропанолом. Отнесение штамма *M. tuberculosis* к генотипу Beijing проводили методом ПЦР в формате реального времени для выявления специфической вставки элемента IS*6110* в локусе *dnaA-dnaN* [4]. Изоляты других генотипов (non-Beijing) были субтипированы с помощью сполиготипирования с последующим сравнением сполигопрофилей с международной базой SITVIT_WEB (http://www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVIT2/). Метод сполиготипирования основан на ДНК-ДНК гибридизации меченых биотином продуктов ПЦР локуса CRISPR (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) хромосомы *M. tuberculosis* с 43 специфическими олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на нейлоновой мембране Biodyne C. Выявление продуктов гибридизации по 43 спейсерным последовательностям проводили на основе ферментативной реакции с использованием конъюгата пероксидазы со стрептавидином с последующей детекцией люминесценции на светочувствительной пленке. Для статистической обработки данных использовали ресурс http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php, вычисляя значение P при доверительном интервале 95%. Статистически значимыми считали различия между группами при p <0,05.

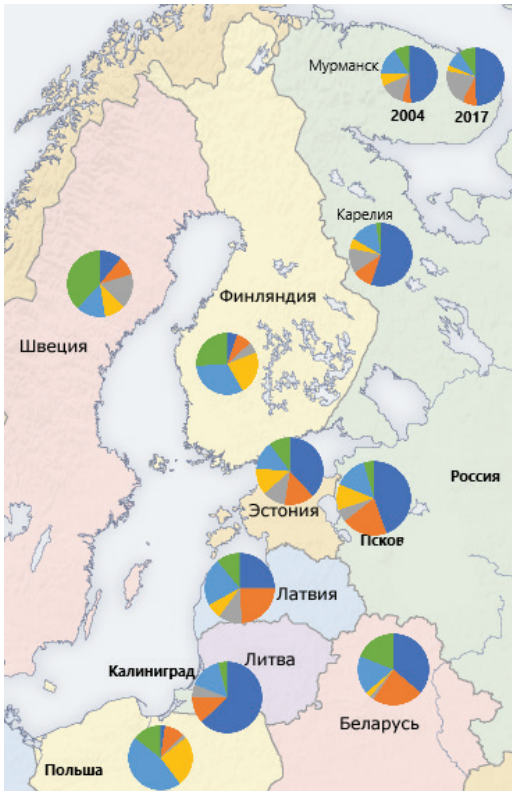


Рисунок 1. Распространенность основных генотипов *M. tuberculosis* в данном исследовании и соседних странах и регионах РФ

Изоляты M. tuberculosis, полученные от больных, были разделены на генотипы, на основе выявления инсерции *dnaA-dnaN*::IS*6110* для определения штаммов генотипа Beijing и с помощью сполиготипирования для дальнейшей дифференциации штаммов других генотипов. Генотип Beijing был выявлен у 50% изолятов (n=32). Это незначительно отличается от предыдущего исследования M. tuberculosis в Мурманской области в котором доля Beijing в 2004 году составляла 44% [5]. Таким образом, генотип Beijing остается преобладающим на территории Мурманской области, что является характерным в целом для всей России [2]. Однако, доля этого генотипа в структуре граничащей с Мурманской областью Финляндии незначительна (5%), как и во многих странах Европы, исключая страны постсоветского пространства (рис. 1) [5, 6].

Генотипирование 32 штаммов non-Beijing позволило выделить 18 сполиготипов, относившихся к пяти генетическим семействам – T, LAM, Ural, X, Haarlem. Пять изолятов было определено как неклассифицированные (Unknown) (табл. 1).

Таблица 1 – Характеристика штаммов *M. tuberculosis* non-Beijing

SIT	Сполигопрофиль	Генотип	Кол-во	Ч	Моно	Поли	МЛУ
35	■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□■□□□□■■■■■■■	Ural	6	4	2	0	0
262	■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□■□□□□■■■■■■■	Ural	6	4	1	1	0
1447	■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■□□□■□□□□■■■■■■■	Ural	1	1	0	0	0
42	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	LAM	3	2	1	0	0
60	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	LAM	1	1	0	0	0
254	■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	LAM	1	1	0	0	0
40	■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T	1	1	0	0	0
52	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	T	1	1	0	0	0
1255	□□■■■■■■■■■■■■■■■■□■□■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T	1	1	0	0	0
122	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■□□□□■■■■■■■	T	2	2	0	0	0
1105	■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T	1	1	0	0	0
2	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■□□□□□□■□□□□■■■■■■■	Haarlem	2	1	1	0	0
4	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	Unknown	2	0	0	0	2
237	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□	Unknown	1	0	0	0	1
1177	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■□□□□□□□□□□□□□	Unknown	1	1	0	0	0
708	■■■□■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	X	1	1	0	0	0
NEW	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■	Unknown	1	1	0	0	0

Примечания к таблице:

SIT – Spoligotype International Type

Ч – чувствительный, Моно – монорезистентный, Поли – полирезистентный, МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

К генотипу Ural были отнесены 13 штаммов (20,3%), среди которых не встречались МЛУ, однако 4 (30,8%) из 13 изолятов были устойчивы хотя бы к одному ПТП. Доля этого генотипа увеличилась по сравнению с 2004 годом, когда она составляла 13,6% [5], хотя и статистически незначимо (P=0,1), что может быть связано с небольшим размером выборки. Также доля этого генотипа более значительна, чем в соседних регионах: на территории Республики Карелия штаммы Ural составляют 12,8%, в Финляндии – 6% [6].

Генотип T был представлен только лекарственно-чувствительными штаммами, и его доля составляла 9,4% (n=6), что незначительно меньше доли в республике Карелия (14,1%), однако существенно отличалась от Европы, в частности Финляндии (32%) [6], где это генетическое семейство является преобладающим в структуре популяции. Группа T являлась наиболее разнообразной по профилю сполиготипирования.

Доля генетического семейства LAM составила 7,8% (n=5), что сопоставимо с полученными ранее данными. В 2004 году к генотипу LAM относилось 5% полученных изолятов [5]. В соседних регионах наблюдалась схожая доля данного семейства, составляя 10,3% в республике Карелия и 5% в Финляндии [6].

Оценка лекарственной чувствительности всех изученных штаммов показала, что 38 (59,4%) из 64 изолятов остались чувствительными (Ч) к ПТП, устойчивость была выявлена у 26 (40,6%) штаммов, 17 (26,6%) из которых были МЛУ (рис. 2). 14 (82,4%) образцов, обладающих МЛУ, относились к генотипу Beijing. На основании полученных данных установлено, что МЛУ была статистически значимо связана с генотипом Beijing 43,8% против 9,4% у штаммов прочих генотипов (суммарно) (P=0,004, OR = 7,52).

Рисунок 2. Распространенность лекарственной устойчивость среди изолятов *M. tuberculosis*

На основе полученных данных и анализа распространенности устойчивости среди различных генотипов *M. tuberculosis* на территории Мурманской области построена диаграмма (рис. 3).

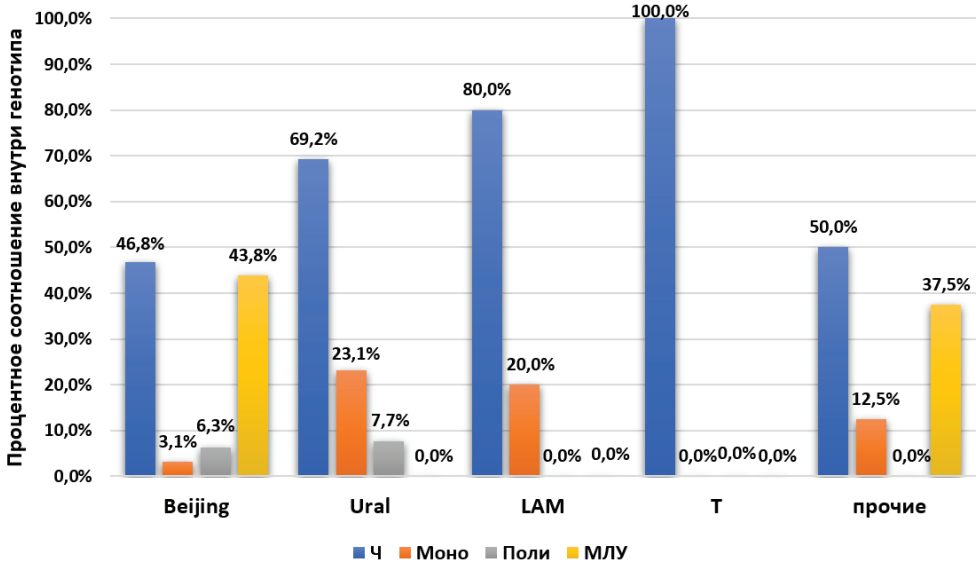


Рисунок 3. Распределение устойчивых штаммов к ПТП среди генотипов *M. tuberculosis* Мурманской области

Наибольший процент чувствительных штаммов (100%) отмечен в семействе T. Меньшая доля чувствительных штаммов была у генотипа LAM (80%), при этом 20% штаммов были монорезистентными. Среди семейства Ural также преобладали чувствительные штаммы (69,2%), однако процент устойчивых изолятов был выше, чем у T и LAM, при этом встречались как монорезистентные (23,1%), так и полирезистентные штаммы (7,7%). Самый низкий процент чувствительных штаммов (46,8%), а также самый высокий процент МЛУ (43,8%) был отмечен у генетического семейства Beijing.

Наиболее часто устойчивость среди изученных изолятов развивалась к изониазиду и рифампицину. К изониазиду были устойчивы 24 (36,9%) из 64 изолятов, при этом 16 (66,67%) из них принадлежали к генотипу Beijing. Меньшее число устойчивых изолятов выявлено к рифампицину – 19 (29,7%) из 64 изолятов, среди которых также преобладал генотип Beijing -15/19 (78,94%).

Показано, что штаммы, обладающие МЛУ, являются распространенными на территории Мурманской области и ассоциированы с генотипом Beijing. Установлено, что в изученной выборке *M. tuberculosis* кроме генотипа Beijing также присутствовали штаммы генетических семейств Ural, LAM, T, среди которых преобладали штаммы чувствительные к ПТП. Наряду с высоким процентом чувствительных, среди изолятов non-Beijing выявлены моно- и полирезистентные штаммы. Неблагоприятная эпидемиологическая обстановка на территории Мурманской области связана с циркуляцией резистентных штаммов *M. tuberculosis* генотипа Beijing.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peters JS, Ismail N, Dippenaar A, Ma S, Sherman DR, Warren RM, Kana BD. Genetic Diversity in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates and Resulting Outcomes of Tuberculosis Infection and Disease. Annu Rev Genet. 2020;54:511-537 DOI: 10.1146/annurev-genet-022820-085940

2. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: insights from Beijing and Ural families. Tuberculosis. 2015;95(1):167–176 DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.031

3. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology. 1997;35(4):907–914 DOI: 10.1128/JCM.35.4.907-914.1997.

4. Mokrousov I, Vyazovaya A, Zhuravlev V, Otten T, Millet J, Jiao WW, Shen AD, Rastogi N, Vishnevsky B, Narvskaya O. Real-time PCR assay for rapid detection of epidemiologically and clinically significant Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype isolates. Journal of Clinical Microbiology. 2014;52(5):1691–1693 DOI: 10.1128/JCM.03193-13

5. Mäkinen J, Marjamäki M, Haanperä-Heikkinen M, Marttila H, Endourova L B, Presnova S E, Mathys V, Bifani P, Ruohonen R, Viljanen MR, Soini H. Extremely high prevalence of multidrug resistant tuberculosis in Murmansk, Russia: A population-based study. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011;30(9):1119–1126. DOI 10.1007/s10096-011-1200-7

6. Mokrousov I, Vyazovaya A, Levina K, Gerasimova A, Zhuravlev V, Viiklepp P, Kütt M. Spatiotemporal dynamics of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis: Contrasting trends and implications for tuberculosis control in EU high-priority country. Transbound Emerg Dis. 2020;00:1–11. https://doi.org/10.1111/tbed.13758

SUMMARY

CHARACTERISTIZATION OF THE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* POPULATION IN THE MURMANSK REGION BY SPOLIGOTYPING

Terentyeva D.R., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation
Vyazovaya A.A., PhD, Senior Scientist
St. Petersburg Pasteur Institute

The aim of this study was to perform molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* population in the Murmansk region, and to find a relation between circulating strains and resistance to anti-tuberculosis drugs. Sixty-four *M. tuberculosis* isolates recovered from tuberculosis patients in Murmansk region were studied. Drug resistance was determined by absolute concentration method. Real-time PCR and spoligotyping methods assigned strains to genetic families Beijing, Ural, T, LAM. The Beijing genotype was identified in 50% of isolates, Ural genotype in 20,3%, T genotype in 9,4%, LAM genotype in 7,8%. 41% of isolates were resistant to at least one anti-tuberculosis drug, multi-drug resistance (MDR) was detected in 21%. The Beijing genotype was associated with MDR (P = 0,004, OR = 7,52). Adverse epidemiological situation in the Murmansk region is strongly influenced by spread of MDR-associated Beijing genotype M. tuberculosis strains.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis, Murmansk region, spoligotyping, multiresistance, genotyping, tuberculosis.*

REFERENCES

1. Peters JS, Ismail N, Dippenaar A, Ma S, Sherman DR, Warren RM, Kana BD. Genetic Diversity in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates and Resulting Outcomes of Tuberculosis Infection and Disease. Annu Rev Genet. 2020;54:511-537 DOI: 10.1146/annurev-genet-022820-085940

2. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: insights from Beijing and Ural families. Tuberculosis. 2015;95(1):167–176 DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.031

3. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology. 1997;35(4):907–914 DOI: 10.1128/JCM.35.4.907-914.1997.

4. Mokrousov I, Vyazovaya A, Zhuravlev V, Otten T, Millet J, Jiao WW, Shen AD, Rastogi N, Vishnevsky B, Narvskaya O. Real-time PCR assay for rapid detection of epidemiologically and clinically significant Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype isolates. Journal of Clinical Microbiology. 2014;52(5):1691–1693 DOI: 10.1128/JCM.03193-13

5. Mäkinen J, Marjamäki M, Haanperä-Heikkinen M, Marttila H, Endourova L B, Presnova S E, Mathys V, Bifani P, Ruohonen R, Viljanen MR, Soini H. Extremely high prevalence of multidrug resistant tuberculosis in Murmansk, Russia: A population-based study. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011;30(9):1119–1126. DOI 10.1007/s10096-011-1200-7

6. Mokrousov I, Vyazovaya A, Levina K, Gerasimova A, Zhuravlev V, Viiklepp P, Kütt M. Spatiotemporal dynamics of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis: Contrasting trends and implications for tuberculosis control in EU high-priority country. Transbound Emerg Dis. 2020;00:1–11. https://doi.org/10.1111/tbed.13758

ПОДБОР СОРБЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

Умбетали А.О., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Глазова Н.В.**, канд.хим.наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: akerke.umbetali@spcpu.ru

Целью настоящей работы является подбор наиболее оптимального сорбента для выделения протеолитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя.

Для разработки сорбционного метода выделения протеолитических ферментов из экстракта поджелудочной железы северного оленя был предварительно проведен подбор оптимальных сорбентов и эффективных условий сорбции из модельного раствора препарата Химопсин. Полученные данные могут быть использованы при выделении протеаз из поджелудочной железы северного оленя.

Ключевые слова: *поджелудочная железа, северный олень, протеаза, химопсин, сорбция, десорбция.*

Протеолитические ферменты играют важнейшую роль в переваривании белков пищи в желудке и кишечнике человека, поэтому в современном мире очень востребованы препараты, содержащие протеазы.

Однако, доля зарубежных ферментных препаратов на фармацевтическом рынке РФ достаточно велика. Поэтому с учетом политики импортозамещения лекарственных средств в России, актуальным представляется выделение протеолитических ферментов не только из крупного рогатого скота, но и из поджелудочной железы северного оленя.

Целью данной работы является выбор наиболее оптимального сорбента для выделения протеолитических ферментов из экстракта поджелудочной железы северного оленя. Было показано, что в экстракте поджелудочной железы северного оленя химопсин содержится в активной форме в достаточном количестве. Условия получения экстракта были разработаны на кафедре биотехнологии и опубликованы [1, 2]. Для выбора наиболее оптимального сорбента в работе был использован не сам экстракт, а модельный раствор препарата химопсин, что дает возможность проводить сорбционную хроматографию на большом количестве сорбентов и не использовать многокомпонентный экстракт.

Для достижения заданной цели необходимо решить следующие задачи:
- провести сорбцию протеазы из модельного раствора препарата Химопсин;
- рассчитать выходы на стадии сорбции и десорбции;
- подобрать оптимальный сорбент для выделения химопсина из экстракта.

Объектом исследования является препарат протеолитического действия Химопсин (ООО «Самсон-Мед», Россия), состоящий из смеси химотрипсина и трипсина.

Трипсин – глобулярный белок, структура которого жестко фиксируется сульфидными связями. Вырабатывается в поджелудочной железе человека и животных в виде неактивного трипсиногена. Катализирует расщепление белков, пептонов, низкомолекулярных пептидов по связям, в образовании которых принимают участие карбоксильные группы L-аргинина и L-лизина. Изоэлектрическая точка трипсина 10,2-10,8, оптимум pH 7,8-8,2.

Химотрипсин – белок, состоящий их трех пептидных цепей, связанных дисульфидными мостиками. Синтезируется поджелудочной железой в виде неактивного предшественника – химотрипсиногена. Изоэлектрическая точка 8,1-8,3, оптимум pH 7,5-8,0 [3].

Для изучения параметров сорбции гидролитических ферментов были использованы сорбенты различных структур:
- сульфокатиониты: Purolite-C150, КУ-23 (PUROLITE international limited, Великобритания);
- карбоксильные катиониты: Purolite-C115EC (PUROLITE international limited, Великобритания);
- неионогенный сорбент PURASORB AP 500 (Corbion, Нидерланды).

В ходе выполнения данной работы были использованы следующие методы:
- определение концентрации общего белка по методу Лоури;
- определение протеолитической активности с помощью модифицированного метода Кунитца.

Известно, что сорбция высокомолекулярных белков проходит в неравновесном режиме, что приводит к малому выходу основного компонента, поэтому на кафедре была создана теория, которая позволяет проводить в режиме близком к равновесному, для этого рассчитывается критерий регулярности режима сорбции (λ).

Критерий регулярности λ является одним из параметров, определяющих эффективность сорбционного процесса. При регулярном режиме $\lambda>0,35$, что считается наиболее благоприятным для хроматографического процесса [4]. Были подобраны эффективные параметры сорбционных процессов, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективные параметры сорбционных процессов

Параметры сорбции	Purolite-C150	КУ-23	Purasorb-AP500	Purolite-C115EC
Высота слоя сорбента, м	0,05	0,135	0,05	0,05
Скорость элюции при сорбции	0,5	0,3	0,5	0,3
Скорость элюции при десорбции	0,25	0,15	0,25	0,15
Элюат для десорбции	раствор аммиака pH=10	раствор аммиака pH=10	раствор аммиака pH=10 + 30% ацетона безводного	раствор аммиака pH=10
λ	0,379	0,352	0,356	0,350

Для изучения процессов сорбции навеску препарата Химопсин растворяли в ацетатном буферном растворе с pH=8. Далее проводили фронтальный процесс сорбции, для этого исследуемый раствор пропускали через слой сорбента до тех пор, пока концентрация, выходящего из колонки раствора не будет постоянной. После чего смывали остатки исследуемого раствора, подавая очищенную воду. Затем проводили десорбцию фермента выбранным элюатом (таблица 1). После окончания процесса десорбции сорбент регенерировали подачей на колонку раствора 1н NaOH.

На выходе из колонки собирали фракции по 0,5 мл, в каждой из которых проверяли содержание общего белка и ферментативную активность.

На основании полученных экспериментальных данных строили выходные кривые в координатах:

$$\frac{A_i}{A_0} = f\left(\frac{V_e}{V_k}\right); \quad \frac{C_i}{C_0} = f\left(\frac{V_e}{V_k}\right)$$

где A_i – ферментативная активность в исследуемой пробе, АЕ(ПЕ)/мл;
A_0 – ферментативная активность в исходном растворе, АЕ(ПЕ)/мл;
C_i – концентрация общего белка в исследуемой пробе, мг/мл;
C_0 – концентрация общего белка в исходном растворе, мг/мл;
V_e – объем элюции, мл;
V_k – объем колонки, мл;

$$V_k = \pi \cdot R^2 \cdot h$$

где R – радиус лабораторной колонки, см (R=0.5 см);
h – высота сорбента, см (h= 5 см);

$$V_k = 3{,}9 \text{ мл}$$

Выходные кривые сорбции и десорбции протеаз на сорбентах представлены на рисунках 1, 2, 3, 4.

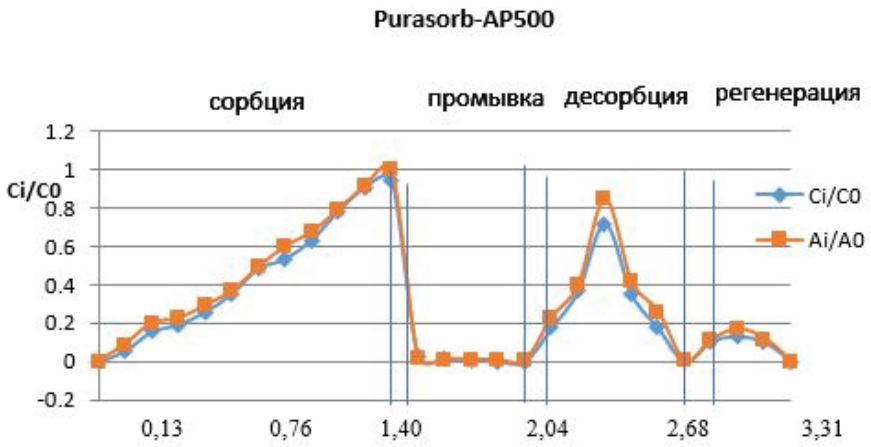


Рисунок 1. Выходная кривая сорбции и десорбции химопсинана сорбенте Purasorb-AP500

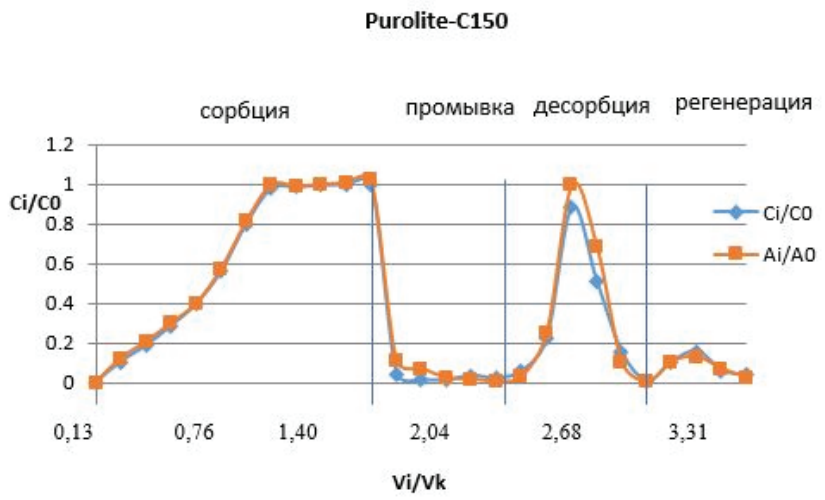


Рисунок 2. Выходная кривая сорбции и десорбции химопсинана сорбенте Purolite-C150

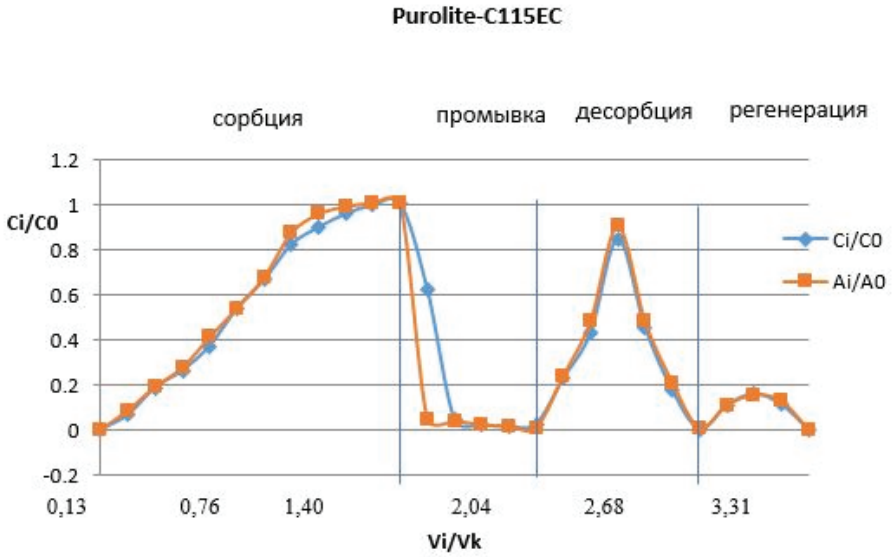


Рисунок 3. Выходная кривая сорбции и десорбции химопсинана сорбенте Purolite-C115EC

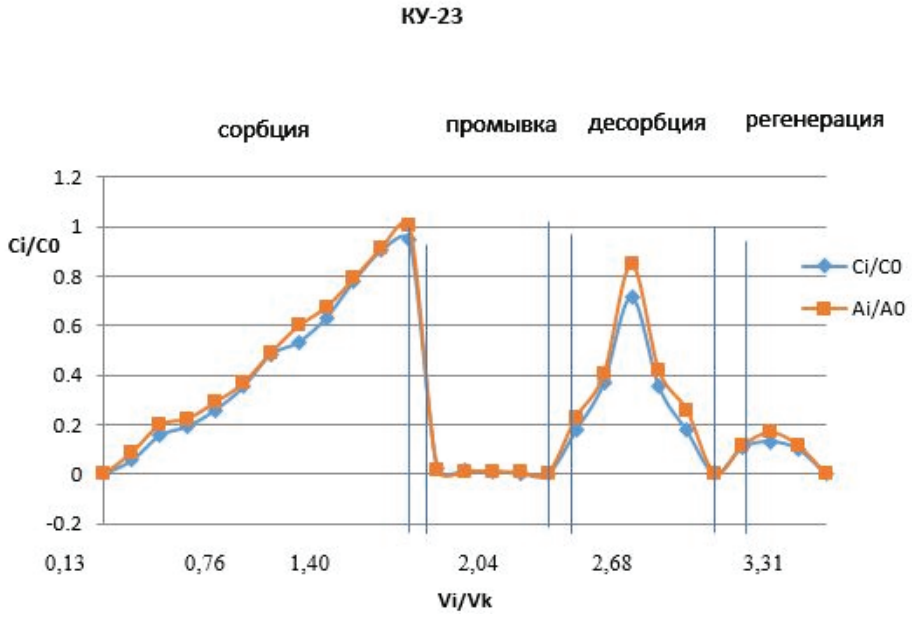


Рисунок 4. Выходная кривая сорбции и десорбции химопсинана сорбенте КУ-23

Как видно из рисунков 1-4, при десорбции значительное количество протеаз остается в сорбенте, что связано с гидрофобной матрицей сорбента. Для полной десорбции необходимо использование органического растворителя, разрушающего гидрофобные связи.

Расчет выхода по стадии десорбции был осуществлен по следующей формуле:

$$\eta = \frac{S_1}{S_2} \cdot 100\%,$$

где η – выход на стадии десорбции;

S_1 – площадь фигуры, ограниченной кривой сорбции и касательной к ней, параллельной оси абсцисс Vi/Vк;

S_2 – площадь фигуры, ограниченной кривой десорбции.

Выходы на стадии десорбции представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Выходы на стадии десорбции

Сорбент	λ	Выход на стадии десорбции, %
Purasorb-AP500	0,356	70
Purolite-C150	0,379	92
Purolite-C115EC	0,350	89
КУ-23	0,352	84

Из таблицы 2 следует, что оптимальным сорбентом для сорбции химопсина является Purolite-C150, при сорбции на котором достигается регулярный режим сорбции с наибольшим выходом при десорбции.

Проведена сорбция протеаз из модельного раствора препарата Химопсин. Рассчитаны выходы на стадии сорбции и десорбции. Подобран эффективный сорбент для выделения протеаз из экстракта поджелудочной железы северного оленя. По полученным экспериментальным данным можно сделать вывод, что наиболее эффективным сорбентом для сорбции химопсина является Purolite-C150. Выход на стадии десорбции составил 92%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Умбетали АО. Разработка технологии выделения, очистка и модификация гидролитических ферментов из животного сырья. Материалы X Всероссийской конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация-потенциал будущего». СПб: Изд-во СПХФУ, 2020: 758-761.

2. Караваева ЛИ, Стучаева АА, Глазова НВ. Модификация гидролитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя с целью разработки сорбционно-хроматографического метода выделения и очистки. Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 28-30 октября 2020: 148-150

3. Глазова НВ, Куреченко АН, Омельянова АП. Современные технологии выделения, очистки и модификации АФС (ферментов). Москва: КНОРУС, 2019.

4. Елькин ГЭ. Концепция регулярности режима сорбции в теории и практике ионного обмена органических ионов. Межвузовский сборник: Ионный обмен и ионометрия. 1990;7;3-15.

SUMMARY

SELECTION OF SORBENTS FOR THE ISOLATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES FROM THE REINDEER PANCREAS

Umbetali A.O., master's student of 2 year of study
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The aim of this work is to select the most optimal sorbent for the isolation of proteolytic enzymes from the reindeer pancreas.

The optimal sorbents and effective conditions of sorption from a model solution of the Chymopsin preparation were preliminarily selected to develop a sorption method for the isolation of proteolytic enzymes from an extract of the reindeer pancreas. The data obtained can be used for the isolation of proteases from the reindeer pancreas.

Key words: *pancreas, reindeer, protease, Chymopsin, sorption, desorption.*

REFERENCES

1. Umbetali AO. Razrabotka tekhnologii vydeleniya, ochistka i modifikatsiya gidroliticheskikh fermentov iz zhivotnogo syr'ya. Materialy KH Vserossiyskoy konferentsii studentov i aspirantov s mezhdunarodnym uchastiyem «Molodaya farmatsiya-potentsial budushchego». Saint Petersburg: Izd-vo SPKHFU, 2020: 758-761 (in Russ).

2. Karavayeva LI, Stuchayeva AA, Glazova NV. Modifikatsiya gidroliticheskikh fermentov iz podzheludochnoy zhelezy severnogo olenya s tsel'yu razrabotki sorbtsionno-khromatograficheskogo metoda vydeleniya i ochistki. Materialy mezhdunarodnogo kongressa «Biotekhnologiya: sostoyaniye i perspektivy razvitiya». 28-30 oktyabrya 2020: 148-150 (in Russ).

3. Glazova NV, Kurechenko AN, Omel'yanova AP. Sovremennyye tekhnologii vydeleniya, ochistki i modifikatsii AFS (fermentov). Moscow: KNORUS, 2019 (in Russ).

4. Yel'kin GE. Kontseptsiya regulyarnosti rezhima sorbtsii v teorii i praktike ionnogo obmena organicheskikh ionov. Mezhvuzovskiy sbornik: Ionnyy obmen i ionometriya. 1990;7:3-15 (in Russ).

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ПРИВЕДЕНИЕ ИХ В ПЛЮРИПОТЕНТНОЕ СОСТОЯНИЕ

Финк М.А., студент 2 курса
Руководитель: **Нечаева Е.А.**, кандидат биологических наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: maksim.fink@pharminnotech.com

Рассмотрены основные принципы репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние. Исследования способов и молекулярных механизмов этого процесса позволяют, в перспективе, разработать универсальный способ получения плюрипотентных стволовых клеток для дальнейшего использования в фундаментальных исследованиях и регенеративной медицине.

Ключевые слова: *Индуцированные плюрипотентные клетки, кодирующие транскрипционные факторы, репрограммирование соматических клеток, генетическая модификация генома клеток, клетки, дифференцировка клеток.*

Плюрипотентные стволовые клетки – уникальный объект для изучения многих процессов, происходящих на раннем этапе развития млекопитающих, а также многообещающим инструментом в клеточной терапии заболеваний человека. Уникальность этих клеток заключается в способности, находясь в культуре, поддерживать самообновление в течение неограниченного времени и давать после дифференцировки все типы клеток, составляющие взрослый организм [1]. Плюрипотентность поддерживается сложной системой сигнальных молекул и генных сетей, специфичных для плюрипотентных клеток. Центральное положение в иерархии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности, занимают гены *Oct4*, *Sox2* и *Nanog*, кодирующие факторы транскрипции [2].

Целью настоящего исследования является изучение механизмов репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния.

Задачи исследования:

- изучить основные генетические механизмы репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние;
- изучить основные эпигенетические механизмы репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние;
- исследовать современные перспективы применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

До недавнего времени эмбриональные стволовые клетки были единственным хорошо изученным источником плюрипотентных стволовых клеток. Плюрипотентные клетки, полученные из соматических клеток, были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). Используя факторы *Oct4, Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* ИПСК были получены из различных типов дифференцированных клеток мыши [3] и человека [4]. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки очень похожи на эмбриональные стволовые клетки по широкому спектру характеристик. Они имеют схожую морфологию и модели роста, одинаково чувствительны к ростовым факторам и сигнальным молекулам. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, как и эмбриональные стволовые клетки, способны дифференцироваться *in vitro* на производные всех трех первичных зародышевых листков (эктодермы, энтодермы и мезодермы), а также образовывать тератомы при подкожной инъекции иммунодефицитным мышам. ИПСК мыши, вводимые в бластоцисты, нормально включаются в процесс развития, что приводит к образованию животных с высокой степенью химеризации. Кроме того, ИПСК мыши способны развиваться в целый организм при введении в тетраплоидные бластоцисты [5]. Таким образом, в руках исследователей оказался замечательный метод, позволяющий получать плюрипотентные стволовые клетки из соматических клеток различных типов, избегая этических проблем.

Некоторые гены, принадлежащие семействам Sox (Sox1, Sox3, Sox15 и Sox18), Myc (l-Myc и p-Myc) и Klf (Klf1, Klf2 и Klf5), способны вызывать репрограммирование соматических клеток мыши в плюрипотентное состояние, но с меньшей эффективностью, чем Sox2, c-Myc и Klf4 [6]. Возможность замены Klf4 и C-Myc на Nanog и РНК-связывающий белок LIN28 в продукции ИПСК из фибробластов человека объясняется сходством функций этих двух пар генов при репрограммировании. Для репрограммирования в плюрипотентное состояние необходимо инактивировать тканеспецифическую программу транскрипции соматических клеток и активировать специфическую транскрипцию генов, ответственных за установление и поддержание плюрипотентности. Таким образом, связывание факторов репрограмми-

рования с промоторами, приводит к репрессии генов, специфичных для соматических клеток, и запускает гены, необходимые для становления и поддержания плюрипотентности. Для репрограммирования особенно важно, что гены, кодирующие факторы репрограммирования, были способны к авторегуляции, а также активировали экспрессию друг друга [7]. Это позволяет белкам, кодируемым генами, введенными в результате трансдукции, активировать на достаточном уровне транскрипцию тех же генов в клетке. Следует отметить, что для продукции ИПСК абсолютно необходима только экспрессия генов Oct4 и Sox2. Продукты генов Nanog, c-Myc, Klf4 и Lin28, играют роль катализаторов, которые ускоряют процесс репрограммирования или повышают его эффективность, но не требуются для индукции плюрипотентного состояния дифференцированных клеток. Факторы репрограммирования во время индукции плюрипотентности могут также иметь другие важные функции, которые не имеют прямого отношения к контролю транскрипции. Таким образом, для гена c-Myc известен ряд плейотропных функций, таких как контроль инициации репликации ДНК [8] и влияние на структуру хроматина, особенно на ацетилирование гистонов [9]. Эти функции, могут быть важны для обеспечения доступа факторов репрограммирования к сайтам-мишеням. Таким образом, репрограммирование к плюрипотентному состоянию – довольно сложный процесс, включающий в себя ряд различных механизмов, позволяющих преодолеть дифференцированное состояние. Изменение морфологии сопровождается потерей экспрессии генов, специфичных для исходного типа дифференцированных клеток. Во время деления между дочерними клетками начинают формироваться плотные адгезионные контакты. Клетки теряют способность к миграции, в них происходит замена промежуточных филаментов цитоскелета и реорганизация комплексов, ответственных за прикрепление к субстрату. На молекулярном уровне эти события сопровождаются репрессией генов цитоскелета, характерных для исходных клеток, таких как Thy-1, Snai1, а также активацией гена E-кадгерина, участвующего в формировании плотных контактов между клетками [10]. Кроме того, наблюдается увеличение экспрессии генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы, которые обеспечивают деградацию белков внеклеточного матрикса. Эта стадия репрограммирования, когда дифференцированные клетки теряют свою мезенхимальную природу и приобретают эпителиальные характеристики, называется мезенхимально-эпителиального перехода [10]. Когда клетки приобретают эпителиальные характеристики, они активируют некоторые минорные гены, характерные для плюрипотентного состояния, такие как щелочная фосфатаза и поверхностные антигены SSEA [11]. После изменения морфологии клетки начинают образовывать микроколонии [12]. В промежуточной фазе репрограммирования подавляется окислительное фосфорилирование митохондрий, за счет чего АТФ синтезируется в дифференцированных клетках. Вместо этого синтез АТФ начинает происходить во время гликолиза, что типично для плюрипотентных клеток [11]. Это связано с увеличением доли ферментов, участвующих в гликолитическом пути метаболизма, и снижением экспрессии белков, участвующих в транспорте электронов на мембранах митохондрий во время окислительного фосфорилирования. Кроме того, на промежуточной стадии восстановление доменов двухвалентного хроматина, характерных для плюрипотентных клеток, происходит постепенно. Успешный переход к завершающей стадии репрограммирования связан с инактивацией конструкций, экспрессирующих введенные репрограммирующие факторы в геном и активацию собственных генов клетки, ответственных за инициацию и поддержание плюрипотентности, таких как Oct4, Nanog, Essrb и др. [13]. Начало заключительного этапа репрограммирования совпадает с появлением первых крупных ЭС-подобных колоний. Основными событиями поздних стадий репрограммирования являются глобальные эпигенетические изменения, связанные с гипометилированием ДНК и формированием структуры хроматина, характерной для плюрипотентных клеток [14]. В рамках этих эпигенетических трансформаций в ИПСК мыши, полученных из дифференцированных клеток самок, происходит процесс реактивации одной из двух Х-хромосом. В клетках с индуцированной плюрипотентностью восстанавливается способность поддерживать удлинение теломер [15]. В связи с этим, интересно отметить, что реактивация теломеразы происходит на ранних стадиях репрограммирования, а теломеры полной длины появляются только при длительном культивировании ИПСК. Детальный анализ транскриптома и протеома показывает наличие двух фаз в репрограммировании – ранней и поздней, во время которых происходит большинство ключевых событий, которые связаны с изменениями экспрессии мРНК и микроРНК, а также активности белков [14]. На ранней стадии происходят изменения экспрессии генов, ответственных за пролиферацию клеток, репликацию ДНК, организацию цитоскелета и метаболизм, кроме того, репрессируются гены, связанные с дифференцировкой. Повышенная экспрессия в основном характерна для генов, контролирующих репликацию ДНК и процесс деления клеток, в то время как гены, контролирующие клеточные контакты и адгезию, инактивируются. Во время поздней фазы активируются гены, контролирующие раннее развитие, а также ключевые гены, необходимые для перехода в стабильное плюрипотентное состояние, такие как Nanog, Oct4, Sox2, Esrrb, Dnmt3l, Tcll. Было отмечено, что некоторые гены, связанные с процессами развития, а также те, которые отвечают за свойства специализированных клеток, могут временно активироваться на ранних этапах репрограммирования и репрессироваться при переходе клеток в плюрипотентное состояние. Кроме того, было показано, что около 400 генов, связанных с плюрипотентностью, включая Alpl, Fbx15, Nr0b1, Tcfcp2l1 и Sall4, активируются в процессе репрограммирования постепенно. Эксперименты с конструкциями, в которых гены Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc находились под контролируемым промотором, который активировался при добавлении доксициклина в культуральную среду [13]. Используя эти конструкции, было установлено, что для успешного репрограммирования факторы транскрипции, введенные в геном соматических клеток мыши путем трансдукции, должны экспрессироваться в течение примерно 10 дней, после чего репрограммирование к плюрипотентное состояние происходит без их участия. Если экспрессия генов, встроенных в вирусы, прекращалась до 10-го дня, ИПСК не формировались. Позже было продемонстрировано, что для эффективного производства ИПСК эктопическая экспрессия c-Myc, в отличие от Oct4, Sox2 и Klf4, может осуществляться в течение более короткого времени, всего за 5 дней [16]. Также было продемонстрировано,

что экспрессия только одного c-Myc через три дня после трансдукции способна инактивировать гены, специфичные для дифференцированных клеток, изменяя их морфологию и пролиферативную активность. Таким образом показано, что факторы репрограммирования не в равной степени участвуют в индукции плюрипотентного состояния. c-Myc действует на ранних этапах репрограммирования, обеспечивая активацию хроматина и регуляцию генов, ответственных за репликацию и клеточный цикл, в то время как Oct4, Sox2 и Klf4 вносят решающий вклад в активацию плюрипотентного состояния на завершающем этапе. Эффективность трансдукции соматических клеток факторами репрограммирования часто достигает 90%. Доля клеток, которые теряют экспрессию тканеспецифических генов, может достигать 70%. Однако только 5-10% исходной клеточной популяции преодолевают мезенхимально-эпителиальный переход, восстанавливая экспрессию вторичных генов, характерную для плюрипотентных клеток. Эффективность получения ИПСК обычно составляет около 0,1%. Таким образом, клетки, вступившие на путь репрограммирования, сталкиваются с множеством препятствий, преодолеть которые могут немногие. Клетки могут стать невосприимчивыми к репрограммированию по разным причинам. Так введение факторов репрограммирования и последующее увеличение пролиферативной активности провоцируют активацию генов-супрессоров опухолей и запуск механизмов, которые обычно предотвращают неконтролируемое деление клеток, часто вызывая их гибель [17]. К продолжению репрограммирования способны только клетки, справившиеся со стрессом. Способность клеток к дальнейшему репрограммированию также зависит от своевременного запуска или инактивации определенных генов. Например, на ранних этапах репрограммирования белок NUP210, который участвует в образовании ядерных пор, играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла и мезенхимально-эпителиального перехода [11]. Если клетки в ответ на экспрессию экзогенных факторов транскрипции не активируют этот белок, то они даже не могут начать репрограммирование. На заключительной стадии репрограммирования важно преодолеть эпигенетические ограничения, которые не позволяют полностью активировать собственные гены клетки, ответственные за формирование и поддержание плюрипотентного состояния [18]. В процессе получения ИПСК выделяют исходное, промежуточное, частично и полностью репрограммированное состояние клеток. Промежуточное состояние характеризуется замолканием генов, специфических для данного типа дифференцированых клеток, началом экспрессии щелочной фосфатазы и поверхностных антигенов SSEA. В частично репрограммированных клетках активируются гены, отвечающие за неограниченную пролиферацию; генетические конструкции, используемые для доставки факторов репрограммирования, активны, тогда как собственные гены клетки, которые обеспечивают индукцию плюрипотентного состояния и его поддержание, имеют низкий уровень экспрессии и высокий уровень метилирования промоторов [17]. Эти клетки способны образовывать тератомы, но не способны образовывать химеры. Кроме того, во время частичного репрограммирования наблюдается активность тканеспецифических генов, таких как Gata6, Sox9 Pax7, которые в норме не экспрессируются как в исходных дифференцированных, так и в плюрипотентных клетках [17]. Использование ингибиторов сигнальных путей, связанных с дифференцировкой, также способствует продукции полностью репрограммированных ИПСК [19]. В целом, недорепрограммированные клетки являются удобным объектом для изучения динамики репрограммирования и препятствий, возникающих на пути возврата к плюрипотентному состоянию. Следует отметить, что ИПСК, которые по формальным критериям можно считать полностью репрограммированными, тем не менее, на ранних пассажах временно сохраняют некоторые элементы эпигеномов и транскриптомов, характерные для того типа соматических клеток, из которых они были получены [20]. Длительное культивирование ИПСК ослабляет различия, связанные с их происхождением, и делает линии, полученные из разных типов соматических клеток, по свойствам более близкими к эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК) и похожими друг на друга. Несмотря на заявленное сходство, ИПСК способны сохранять некоторые незначительные, но воспроизводимые отличия от ЭСК, как по характеру экспрессии генов, так и по эпигенетическому статусу. Скорость репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию прямо коррелирует со скоростью пролиферации исходной культуры дифференцированных клеток [21]. Увеличение скорости пролиферации специализированных соматических клеток за счет ингибирования факторов транскрипции p53/p21 или сверхэкспрессии Lin28 ускоряет перепрограммирование до плюрипотентного состояния. Ретро- и лентивирусные конструкции, используемые для доставки факторов репрограммирования, после проникновения в ядро интегрируются в геном соматической клетки, активно экспрессируются и по мере развития плюрипотентного состояния инактивируются из-за действия факторов транскрипции и модификации хроматина. В области длинных концевых повторов ретровирусов картируется сайт негативной регуляции, состоящий из прямых повторов, а также энхансер и промотор, обогащенные динуклеотидами CPG [22]. Чтобы инактивировать ретровирусную транскрипцию в ЭСК, фактор транскрипции YY1 связывается с сайтом негативной регуляции, ядерный рецептор ELP связывается между сайтом негативной регуляции и энхансером, а белковый фактор A связывается с промотором. Далее, инактивация вирусной транскрипции фиксируется на эпигенетическом уровне за счет образования замкнутой конформации хроматина. Для активных ретро- и лентивирусы характерно ацетилированием гистонов, тогда как гистоны неактивных ретровирусов деацетилированы. По сравнению с гистоном H4 деацетилирование у гистона H3 более выражено [23]. Кроме того, было обнаружено, что инактивированные ретровирусы в промоторной области имеют модификации неактивного хроматина, связанные с обогащением триметилированным H3K9 и гетерохроматин-специфическим белком HP1 [22]. При инактивации лентивирусной транскрипции в линии эмбриональной карциномы мышей было обнаружено деметилирование H3K4 и повышенное метилирование H3K9 [24]. Кроме того, инактивированные ретровирусы [25] и лентивирусные конструкции [24] имеют гиперметилированную ДНК. Экспрессия вирусных векторов может быть препятствием для формирования характерного для плюрипотентных клеток эпигенетического состояния, которое особенно ярко проявляется в нарушениях паттерна метилирования ДНК в линиях частично репрограммированных ИПСК.

Изучение генетических и эпигенетических механизмов приведения соматических клеток к плюрипатентному состоянию являются основой научных исследований в области моделирования патологий. На сегодняшний день фундаментальные исследования системы поддержания плюрипотентности достигли огромного прогресса. Этому прогрессу, несомненно, способствовало получение стабильных линий плюрипотентных клеток у мышей и людей, эти события произвели настоящую революцию в клеточной биологии. Методы молекулярно-генетического анализа, которые активно развиваются в последнее десятилетие, позволили изучить все многообразие взаимодействующих систем, включая систему факторов транскрипции, сигнальных каскадов клетки, систему регуляции на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях. Все эти знания позволяют понять процессы, происходящие в раннем эмбриогенезе, предсказать свойства клеток, а также открыть возможность манипулирования их дифференцировкой. Свойства плюрипотентных клеток открывают широкие возможности для их использования в терапии и моделировании заболеваний, а также для поиска и тестирования новых лекарств. Это открытие решает проблемы, связанные с использованием эмбриональных стволовых клеток, например, проблему несовместимости гистонов и проблему этичности применения клеток, полученных из человеческих эмбрионов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2001;17:435-462.

2. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat. Genet. 2006;38:431-440.

3. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. Science. 2008;321:699-702.

4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007;131:861–872.

5. Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. Cell Stem Cell. 2009;5:135–138.

6. Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107:14152–14157.

7. Voyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Meton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell. 2005;122: 947-956.

8. Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. Nature. 2007;448:445-451.

9. Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN. Myc influences global chromatin structure. EMBO J. 2006;25:2723-2734.

10. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H., Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, Pei D. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. Cell Stem Cell. 2010;7:51–63.

11. Hansson J, Rafiee MR, Reiland S, Polo JM, Gehring J, Okawa S, Huber W, Hochedlinger K, Krijgsveld J. Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. Cell Rep 2012;2:1579– 1592.

12. Smith ZD, Nachman I, Regev A, Meissner A. Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. Nat. Biotechnol. 2010;28;521-526.

13. Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. Cell Stem Cell. 2008;2:151–159.

14. Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, Borkent M, Apostolou E, Alaei S, Cloutier J, Bar-Nur O, Cheloufi S, Stadtfeld M, Figueroa ME, Robinton D, Natesan S, Melnick A, Zhu J, Ramaswamy S, Hochedlinger K. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells . Cell. 2012;151:1617–1632.

15. Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, Blasco MA. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2009;4:141–154.

16. Horvath S, Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Zhou Q, Plath K. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. Cell. 2009;136:364–377.

17. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature. 2008; 454: 49-55.

18. Chen J, Liu H, Liu J, Qi J, Wei B, Yang J, Liang H, Chen Y, Wu Y, Guo L, Zhu J, Zhao X, Peng T, Zhang Y, Chen S, Li X, Li D, Wang T, Pei D. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. Nat. Genet. 2013;45:34-42.

19. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Program of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. PLOS Biol, 2008;6:253.

20. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochedlinger K. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. 2010;28: 848-855.

21. Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creyghton MP, van Ouedenaarden A, Jaenisch R. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. Nature. 2009; 462:595–601.

22. Wolf D, Goff SP. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. Cell. 2007;131:46-57.

23. Yao S, Sukonnik T, Kean T, Bharadwaj R., Pasceri P, Ellis J. Retrovirus silence, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications . Mol. Ther. 2004;10:27–36.

24. He J, Yang Q, Chang L J. Dynamic DNA methylation and histone modifications contribute to lentiviral transgene silencing in murine embryonic carcinoma cells. J. Virol. 2005;79:13497-13508.

25. Minoguchi S, Iba H. Instability of retroviral DNA methylation in embryonic stem cells. Stem Cells. 2008;26:1166-1173.

SUMMARY

GENETIC AND EPIGENETIC MECHANISMS OF SOMATIC CELL REPROGRAMMING AND THEIR PLURIPOTENT STATE

Fink M.A., 2nd year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The basic principles of reprogramming somatic cells into a pluripotent state are considered. Studies of the methods and molecular mechanisms of this process allow, in the future, to develop a universal method for obtaining pluripotent stem cells for further use in basic research and regenerative medicine.

Keywords: *Induced pluripotent cells, encoding transcription factors, somatic cell reprogramming, genetic modification of cell genome, cells, cell differentiation.*

REFERENCES

1. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2001;17:435-462.

2. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat. Genet. 2006;38:431-440.

3. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. Science. 2008;321:699-702.

4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007;131:861–872.

5. Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. Cell Stem Cell. 2009;5:135–138.

6. Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107:14152–14157.

7. Voyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Meton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell. 2005;122: 947-956.

8. Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. Nature. 2007;448:445-451.

9. Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN. Myc influences global chromatin structure. EMBO J. 2006;25:2723-2734.

10. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H., Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, Pei D. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. Cell Stem Cell. 2010;7:51–63.

11. Hansson J, Rafiee MR, Reiland S, Polo JM, Gehring J, Okawa S, Huber W, Hochedlinger K, Krijgsveld J. Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. Cell Rep 2012;2:1579– 1592.

12. Smith ZD, Nachman I, Regev A, Meissner A. Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. Nat. Biotechnol. 2010;28;521-526.

13. Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. Cell Stem Cell. 2008;2:151–159.

14. Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, Borkent M, Apostolou E, Alaei S, Cloutier J, Bar-Nur O, Cheloufi S, Stadtfeld M, Figueroa ME, Robinton D, Natesan S, Melnick A, Zhu J, Ramaswamy S, Hochedlinger K. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells . Cell. 2012;151:1617–1632.

15. Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, Blasco MA. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2009;4:141–154.

16. Horvath S, Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Zhou Q, Plath K. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. Cell. 2009;136:364–377.

17. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature. 2008; 454: 49-55.

18. Chen J, Liu H, Liu J, Qi J, Wei B, Yang J, Liang H, Chen Y, Wu Y, Guo L, Zhu J, Zhao X, Peng T, Zhang Y, Chen S, Li X, Li D, Wang T, Pei D. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. Nat. Genet. 2013;45:34-42.

19. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Program of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. PLOS Biol, 2008;6:253.

20. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochedlinger K. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. 2010;28: 848-855.

21. Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creyghton MP, van Ouedenaarden A, Jaenisch R. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. Nature. 2009; 462:595–601.

22. Wolf D, Goff SP. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. Cell. 2007;131:46-57.

23. Yao S, Sukonnik T, Kean T, Bharadwaj R., Pasceri P, Ellis J. Retrovirus silence, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications . Mol. Ther. 2004;10:27–36.

24. He J, Yang Q, Chang L J. Dynamic DNA methylation and histone modifications contribute to lentiviral transgene silencing in murine embryonic carcinoma cells. J. Virol. 2005;79:13497-13508.

25. Minoguchi S, Iba H. Instability of retroviral DNA methylation in embryonic stem cells. Stem Cells. 2008;26:1166-1173.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Хван А.Э., студ. 2 курса
Руководитель: **Нечаева Е.А.**, канд.биол.наук., доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: alina.hvan@spcpu.ru

Рассмотрены перспективные исследования применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в качестве моделей заболеваний человека. Приведены примеры успешного применения исследований в этой области.

Ключевые слова: *стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные производные клетки, модель заболевания, болезнь, нейрон.*

Первые линии плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека были получены в 1998 г. Огромный интерес ученых привлекла возможность использовать ЭСК и их производные в качестве моделей для исследования патогенеза заболеваний человека, тестирования новых лекарств и заместительной клеточной терапии.

Целью данного исследования является исследование перспектив использования дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Задачи исследования:

- изучить современные проблемы использования эмбриональных стволовых клеток для возможной коррекции различных заболеваний;
- исследовать возможность применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток как альтернативы эмбриональных стволовых клеток;
- рассмотреть возможности применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток на примере модели болезни Паркинсона.

В результате дифференцировки ЭСК можно получать функциональные типы клеток: моторные и дофаминэргические нейроны, кардиомиоциты, предшественники клеток гематопоэтического ряда. Данные клеточные производные по своим биохимическим и физиологическим свойствам потенциально пригодны для терапии сердечно-сосудистых заболеваний, болезней нервной системы, заболеваний крови человека. Более того, производные, полученные из ЭСК, были успешно применены для лечения заболеваний на модельных животных, так, предшественники клеток крови, полученные из ЭСК, для коррекции иммунодефицита у мышей. С помощью фоторецепторов, полученных из ЭСК человека, была восстановлена функция зрения у слепых мышей, а на крысах, моделирующих развитие болезни Паркинсона, с помощью дофаминэргических нейронов, полученных из ЭСК человека, восстановлена нормальная функциональность нервной системы [1], [2], [3], [4].

Несмотря на явные успехи, полномасштабное применение ЭСК в терапии и моделировании заболеваний затруднено, поскольку для этого необходимо создание банков ЭСК, соответствующих всем HLA-гаплотипам, что практически нереально из-за проблем технического и этического характера. Альтернативой ЭСК могут стать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). На сегодня известно, что ИПСК по своим свойствам крайне близки к ЭСК и в то же время могут быть получены в практически неограниченном количестве из дифференцированных клеток каждого конкретного пациента.

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки – это новый тип плюрипотентных клеток, которые могут быть получены путем перепрограммирования дифференцированных клеток животных и человека. Из ИПСК человека путем

направленной дифференцировки in vitro получены дофаминэргические и мотонейроны. Данные виды нейронов повреждаются при многих врожденных и приобретенных заболеваниях человека, таких как механического повреждение спинного мозга, болезнь Паркинсона, мышечная атрофия.

Несколькими группами исследователей из ИПСК мыши и человека получены in vitro функциональные кардиомиоциты (КМ). По своим характеристикам, включающим морфологию, экспрессию маркеров, электрофизиологические показатели и чувствительность к химическим веществам, получаемые из ИПСК кардиомиоциты очень сходны с КМ сердечной мышцы и с КМ, получаемыми при дифференцировке ЭСК. Более того, показано, что инъекции ИПСК мыши могут восстанавливать повреждения мышечной и эндотелиальной тканей сердца, вызываемые инфарктом миокарда [5].

Кроме уже перечисленных типов дифференцированных клеток, к настоящему моменту из ИПСК мыши и человека получены: гепатоцит-подобные клеточные производные, дендритные клетки и макрофаги, кластеры инсулин-продуцирующих клеток, подобные клеткам островков Лангерганса поджелудочной железы, гематопоэтические и эндотелиальные клетки.

Кроме направленной дифференцировки in vitro, большие усилия исследователей направлены на получение пациент-специфичных ИПСК. Наличие плюрипотентных клеток конкретных пациентов позволяет исследовать патогенез и проводить эксперименты по терапии наследственных заболеваний, развитие которых связано с конкретным типом клеток, которые тяжело получить путем биопсии; применение ИПСК дает практически неограниченный ресурс для подобных исследований.

При этом использование ИПСК в качестве моделей для изучения фундаментальных основ болезней, а также поиска и тестирования способов терапии является наукой настоящего дня. С тех пор как ИПСК человека были впервые получены в 2007 г., были созданы десятки клеточных моделей, которые охватывают заболевания практически всех органов и систем человеческого тела. Большинство из полученных клеточных линий являются моделями наследственных заболеваний с моногенной природой, хотя уже созданы модели мультифакториальных болезней, имеющих единичный характер возникновения. В настоящий момент созданы модели спорадической и наследственной формы болезней Альцгеймера и Паркинсона и многих других нейродегенеративных заболеваний, получены модели наследственных сердечно-сосудистых заболеваний, болезней крови, почек, печени, легких кожи и другие. Очень важно, что в значительном числе случаев специфические типы клеток пациентов (нейроны различных типов, кардиомиоциты, клетки эпителия, инсулин-продуцирующие клетки, клетки, подобные гепатоцитам), полученные при дифференцировке ИПСК, воспроизводят черты патологического фенотипа, наблюдаемого у конкретных пациентов. Кроме того, уже существуют экспериментальные данные о том, что производные ИПСК пациентов можно использовать для тестирования уже существующих лекарственных препаратов и поиска новых способов терапии болезней. Большинство из подобных исследований, описанных ниже, состоят из четырех основных этапов.

1. Получение биопсии и репрограммирование соматических клеток пациентов к плюрипотентному состоянию. В подавляющем большинстве случаев в качестве соматических клеток используют фибробласты кожи, а в качестве способа репрограммирования – трансдукцию клеток ретро- или лентивирусами. Соматические клетки либо получают путем биопсии непосредственно в соответствующих лечебных учреждениях, либо приобретают в биобанках.

2. На втором этапе применяют различные протоколы с целью дифференцировки ИПСК в так называемый релевантный тип дифференцировки клеток. Релевантным называют тот тип клеток, который максимально подвержен повреждению при том или ином заболевании. Например, при сердечно-сосудистых болезнях это кардиомиоциты, при нейродегенеративных заболеваниях – это различные типы нейронов или их предшественники. Как правило, после дифференцировки клетки тщательно тестируют на предмет принадлежности к тому или иному типу, применяя анализ экспрессии генов и/или белков маркеров и функциональные тесты (электрофизиологическое исследование, анализ чувствительности к лигандам, их ингибиторам или низкомолекулярным химическим соединениям).

3. Третий этап заключается в тщательном анализе молекулярного и клеточного фенотипа полученных дифференцированных клеток и поиске соответствий с патологическим фенотипом, наблюдаемым у реальных пациентов. В каждом подобном исследовании применяется сравнительный анализ клеток пациентов и условно здоровых доноров. Часто для обнаружения патологий исследователям приходится применять стресс-тесты, т. е. воздействие различными агентами, вызывающими оксидативный стресс (повышение внутриклеточного уровня активных форм кислорода), нарушение в энергетическом метаболизме и ингибирование сигнальных каскадов.

4. На четвертом этапе исследователи пытаются определить, каким образом можно смягчить или устранить патологические симптомы, наблюдаемые на клеточном уровне. Для этого применяют известные и экспериментальные лекарственные соединения, методы генной терапии (например, аллель-специфичной РНК-интерференции), а также исправление генетических мутаций с помощью гомологичной рекомбинации и временной экспрессии белков дикого типа.

Рассмотрим исследование, которое дает представление о масштабах, возможностях и перспективах применения ИПСК в качестве моделей заболеваний человека.

Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. Развитие заболевания связано с гибелью нейронов, в основном черной субстанции головного мозга, которые продуцируют нейромедиатор дофамин. Недостаточность дофамина вызывает целый набор тяжелых симптомов, среди которых брадикинезия, ригидность мышц и тремор. Как правило, БП страдают люди пожилого возраста. Помимо идиопатической формы БП, которая, как правило, имеет позднее начало развития болезни, существует наследственная БП, для которой

известны случаи с ранним началом. С наибольшей популяционной частотой встречаются мутации в таких генах, как LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2), Parkin, SNCA (α-synuclein) и PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1)

Несмотря на многочисленные исследования, на сегодня существует, пожалуй, единственный эффективный терапевтический агент для купирования симптомов БП – это предшественник дофамина – дигидроксифенилаланин (леводопа) в комбинации с ингибиторами периферической дофа-декарбоксилазы. Однако, леводопа не является одинаково эффективной при применении разными пациентами, а также не все симптомы купируются с одинаковом силой. Кроме того, продолжительный прием препарата снижает эффективность его действия и усиливает возникновение побочных симптомов [6].

Здесь возникает та же проблема, которая актуальна для исследований всех нейродегенеративных заболеваний. Для поиска новых средств терапии БП необходимо наличие более совершенных модельных систем. В случае с БП для проведения исследований in vitro нужен источник дофаминергических нейронов среднего мозга. Получение биопсии нейронов среднего мозга пациентов для создания их культур невозможно. И здесь на помощь исследователям приходит технология индуцированной плюрипотентности.

Тремя группами исследователей были получены ИПСК пациентов, имеющих миссенс-мутацию p.G2019S в гене LRRK2, который кодирует лейцин-богатую киназу 2. Данная мутация является одной из самых распространенных доминантных миссенс-мутаций, ассоциированных с БП. На ее долю приходится 0,6–1,6 % и 2–8 % случаев спорадической и наследственной формы БП соответственно [7], [8], [9]. Пенетрантность данной мутации зависит от возраста. У 50-летних пациентов пенетрантность равна примерно 17 %, в то время как у 70-летних – 85% [10].

Изучение дофаминергических нейронов и нейральных стволовых клеток, полученных при направленной дифференцировке ИПСК пациентов, показало, что они имеют повышенную чувствительность к оксидативному стрессу (повышенному уровню активных форм кислорода, вызванному воздействием перекиси водорода). Кроме того, нейрональные клетки, полученные из ИПСК, несущих мутацию, имеют повышенную чувствительность к активации каспазы-3, к веществам, нарушающим функции митохондрий (6-гидроксидофамин), и ингибитору протеасом MG-132 [11]. Кроме того, в мутантных клетках обнаружены нарушения структуры ядерных оболочек и повышенный уровень белка альфа-синуклеин, который является одним из компонентов телец Леви, и нефосфорилированного и фосфорилированного белка TAU [12], [13], [14]. Эксперименты на изогенных парах ИПСК, которые были получены в результате исправления мутации p.G2019S, показали, что мутация приводит к нарушению экспрессии генов CPNE8, MAP7, UHRF2 ANXA1 и C4DPS2. Генный нокаут с помощью РНК-интерференции продемонстрировал, что подавление экспрессии генов CPNE8, MAP7, UHRF2 и CADPS2 приводит к активации каспазы-3 и последующему апоптозу нейронов. Установлено, что нарушение в экспрессии генов CADPS2, CPNE8 и UHRF2 зависит от киназы ERK ½ (extracellular signal-regulated kinase), уровень фосфорилированной формы которой повышен в мутантных клетках. Ингибирование ERK ½ уменьшает проявление симптомов БП на клеточном уровне. Это открывает путь к разработке новых лекарственных соединении для терапии БП. Подобный механистический подход к поиску средств терапии БП был продемонстрирован в работе О. Купера с соавторами [12]. Показано, что патологические проявления, связанные с дисфункцией митохондрий, могут быть существенно подавлены при применении таких веществ, как коэнзим Q_{10}, рапамицин и ингибитор киназы LRRK2-GW5074. Причем на клетках, несущих мутацию в ген с PINK1 (p.Q456X), эффекта удалось добиться только с помощью Q_{10} и GW5074, в то время как на нейрональных клетках с мутацией p.G2019S в гене LRRK2 активность проявляли все три вещества.

Повышенная чувствительность к оксидативному стрессу и нарушение функции митохондрий также были замечены в исследовании нейронов, полученных из ИПСК пациентов с гомозиготными делециями в гене Parkin. Гистохимический анализ тканей головного мозга, полученных после смерти пациентов, показал накопление альфа-синуклсина (формирование телец Леви) в нейронах одного из них. Подобное фенотипическое проявление БП редко встречается у пациентов с мутациями в гене Parkin. Анализ нейронов, полученных из ИПСК данного пациента, также показал повышенное накопление альфа-синуклеина [15].

Приведенные факты говорят о том, что из ИПСК больных БП не только можно успешно получить нейроны, но эти нейроны, кроме того, точно воспроизводят фенотипические особенности проявления болезни у конкретных пациентов и могут служить моделями для поиска новых лекарственных соединений и их сочетаний.

Установлено, что проблема применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и разработка новых моделей для таких нейродегенеративных заболеваний человека, как болезнь Паркинсона, Альцгеймера и ряда других является актуальной и перспективной. Так как для целого ряда заболеваний человека эффективные методы терапии пока еще не разработаны, ИПСК могут стать удобным инструментом для изучения болезней человека, имеющих генетическую предрасположенность, так как их легко можно получить от пациента с необходимым генотипом и использовать для получения неограниченного количества дифференцированных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kim JH et al Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. Nature. 2002;418:50–56.

2. Rideout WM., 3rd, Hochedlinger 1C, Kvba M., Daley G. Q_n Jaenisch R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. Cell. 2002;109:17–27.

3. Yang D, Zhang ZJ, Oldenburg M, Ayala M, Zhang SC. Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. Stem Cells. 2008;26:55–63.

4. Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. Cell stem. 2009;4:73–79.

5. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human sternness factors induced pluripotent stem cells. Circulation. 2009;120:408–416.

6. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. Lancet. 2009;373:2055–2066

7. Hernandez D, et al. The dardarin G 2019 S mutation is a common cause of Parkinson's disease but not other neurodegenerative disease. Neurosci. Lett. 2005;389:137–139.

8. Nichols W. et al. Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. Lancet. 2005;365:410–412.

9. Paisan-Ruiz C, et al. LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. Neurology. 2005;65: 696–700

10. Kachergus J. et al. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. Am. J. Hum. Genet. 2005;76:672–680.

11. Nguyen et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. Cell Stem Cell. 2011;8:267–280.

12. Cooper O. et al Pharmacological rescue of mitochondrial of mitochondrial deficits in iPSC-derived neural cells from patients with familial Parkinson's disease. Sci. Transl. Med. 2012;4:141-l90.

13. Liu GH. et al. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. Nature. 2012;491:603–607.

14. Reinhardt P et al Genetic correction of a LRRK2 mutation in links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes it changes in gene expression. Cell Stem Cell. 2013;12:354–367.

15. ImaizumiV. et al. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein, accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. Mol. Brain. 2012;5:35

SUMMARY

MODELING OF HUMAN DISEASES BASED ON DIFFERENTIATED DERIVATIVES OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

Khvan A.E., 2th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Prospective studies of the use of induced pluripotent stem cells as models of human diseases are considered. Examples of successful application of research in this area are given.

Key words: *stem cells, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, differentiated derived cells, disease model, disease, neuron.*

REFERENCES

1. Kim JH et al Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. Nature. 2002;418:50–56.

2. Rideout WM., 3rd, Hochedlinger 1C, Kvba M., Daley G. Q_n Jaenisch R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. Cell. 2002;109:17–27.

3. Yang D, Zhang ZJ, Oldenburg M, Ayala M, Zhang SC. Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. Stem Cells. 2008;26:55–63.

4. Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. Cell stem. 2009;4:73–79.

5. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human sternness factors induced pluripotent stem cells. Circulation. 2009;120:408–416.

6. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. Lancet. 2009;373:2055–2066

7. Hernandez D, et al. The dardarin G 2019 S mutation is a common cause of Parkinson's disease but not other neurodegenerative disease. Neurosci. Lett. 2005;389:137–139.

8. Nichols W. et al. Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. Lancet. 2005;365:410–412.

9. Paisan-Ruiz C, et al. LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. Neurology. 2005;65: 696–700

10. Kachergus J. et al. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. Am. J. Hum. Genet. 2005;76:672–680.

11. Nguyen et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. Cell Stem Cell. 2011;8:267–280.

12. Cooper O. et al Pharmacological rescue of mitochondrial of mitochondrial deficits in iPSC-derived neural cells from patients with familial Parkinson's disease. Sci. Transl. Med. 2012;4:141-l90.

13. Liu GH. et al. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. Nature. 2012;491:603–607.

14. Reinhardt P et al Genetic correction of a LRRK2 mutation in links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes it changes in gene expression. Cell Stem Cell. 2013;12:354–367.

15. ImaizumiV. et al. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein, accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. Mol. Brain. 2012;5:35

РАЗРАБОТКА СИНБИОТИКА НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИТОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ И ПРЕБИОТИЧЕСКОГО (РАСТИТЕЛЬНОГО) СУБСТРАТА. ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Хохрякова М.Д., асп. 2 года обучения
Научный руководитель: **Несчисляев В.А.**, д.м.н., проф.
ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России,
614900, г. Пермь, ул. Полевая, д.2, Российская Федерация
E-mail: skakodub1997@mail.ru

Работа посвящена разработке синбиотика, включающего в себя растительный субстрат и метаболитную фракцию пробиотических штаммов лактобактерий, и исследованию его биологической активности. Конструирование синбиотика происходит путем подбора оптимального растительного субстрата, использование которого способствует максимальному накоплению биологически активных веществ (метаболитов) лактобактерий.

Ключевые слова: *синбиотик, лактобактерии, растительный субстрат, конструирование, метабиотик, биологическая активность.*

На протяжении последних лет отмечается рост производства БАД и лекарственных препаратов на основе различных пробиотических штаммов микроорганизмов. Перспективным направлением в создании новых препаратов и БАД является конструирование их на основе метаболитов бактерий и растительного субстрата. Растительный субстрат выступает в роли пребиотического компонента, обладающего рядом преимуществ перед классическими пребиотическими составляющими (инулин, лактулоза, олигосахариды и т.д.). Работа над конструированием синбиотика предполагает использование новых технологических подходов в производстве пробиотиков. Использование растительного субстрата способствует интенсивному росту пробиотических штаммов лактобактерий и накоплению их метаболитов. Следует отметить, что номенклатура лекарственных препаратов или БАД, содержащих растительный субстрат и активные метаболиты бактерий, на настоящий момент времени ограничен, поэтому особенно актуальным становится разработка синбиотика данного состава.

Исходя из вышесказанного, цель настоящего исследования – разработка состава синбиотика нового поколения на основе растительного субстрата и метаболитов пробиотических штаммов лактобактерий и оценка биологической активности.

Задачи исследования:

1. Подбор оптимального растительного субстрата и его апробация в процессе ферментации, а также подбор оптимальных условий культивирования лактобактерий на растительном субстрате для достижения максимального накопления биологически активных метаболитов.
2. Оценка биологической активности наработанных образцов синбиотика.

Для конструирования синбиотика были использованы различные варианты растительных субстратов: пшеничные и ржаные отруби, лекарственное растительное сырье (лист шиповника, лист смородины и др.). Пшеничные и ржаные отруби являются источником витаминов (витамины группы В), минералов, клетчатки, перевариваемого протеина, аминокислот (лизина, метионина и цистина), а также растворимых и нерастворимых пищевых волокон. Растительный компонент является весомым преимуществом в составе готового продукта, т.к. минимален риск развития аллергических реакций и возможен прием препарата людьми, страдающими сахарным диабетом или непереносимостью глютена.

Пробиотический компонент в составе синбиотика представлен метаболитами лактобактерий, в числео которых входит молочная кислота, лизоцим, бактериоцины и др. Молочная, уксусная и ряд других продуцируемых этими клетками органических кислот играют важную роль в физиологии макроорганизма, а также в формировании и функционировании микробиоты желудочно-кишечного тракта [1]. Для культивирования с целью получения метаболитов был использован производственный штамм лактобактерий *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3. Бактерии штамма *L. plantarum* 8Р-А3 получали из лиофилизированного препарата Лактобактерин (производство АО НПО «Микроген» филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», Россия). Метаболиты (молочная кислота, бактериоцины) выбранного штамма обладают высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным микроорганизмам и устойчивы в агрессивной среде ЖКТ человека.

Технологические аспекты получения синбиотика не требуют наличие дорогостоящего оборудования. Предполагаемая технология производства синбиотика на основе растительного субстрата и метаболитов лактобактерий включает в себя получение взвеси лактобактерий осуществляется путём ресуспендирования препарата Лактобактерин сухой в 0,9% растворе натрия хлорида с равномерным перемешиванием для распределения клеток по всему объему. Далее следует стадия подготовки растительного субстрата к ферментации (увлажнение, ферментация). В стерильных условиях происходит смешивание растительного субстрата и взвеси лактобактерий. Подготовленные кассеты помещают в термостат при температуре (37±1)°С в течение 48 ч. Далее ферментированный субстрат подвергается тепловой обработке в паровом стерилизаторе, сушке и сухой грануляции через ячейки размером 0,5 мм.

Биологическую активность экспериментальных образцов оценивали с использованием бедной питательной среды по нескольким показателям: коэффициент стимуляции роста и кислотообразования, интенсивность утилизации глюкозы. Для определения параметров роста в качестве питательной среды использовали 0,5% раствор глюкозы. Пробоподготовка экспериментального образца осуществлялась путём приготовления водных экстрактов с последующим фильтрованием полученного извлечения. В 24 мл р-ра 0,5% глюкозы добавляли 3 мл исследуемого образца и 3 мл тест-культуры. Контрольная проба содержит 3 мл 0,9% раствора натрия хлорида, который добавляли вместо исследуемого образца. В качестве тест-культуры использовали пробиотические бактерии *Bibidumbacterium bifidum 1*, полученные путем регидратации с помощью 0,9% раствора натрия хлорида препарата «Бифидумбактерин» (производство – г. Пермь, Россия). Образцы выдерживали при температуре 38±2°С в течение 44±2 ч.

Кислотообразующую активность определяли титриметрическим способом с использование раствора натрия гидроксида 0,1М в качестве титранта [2]. Количественное выражение исследуемой величины характеризуется в градусах Тернера (°Т) и выражается формулой:

$$^{o}T = A*K*10,$$

где °Т – условная величина, выраженная в градусах Тернера;

А – количество миллилитров 0,1М раствора натрия гидроксида, требуемое на титрование 10 мл исследуемой пробы;

К – поправка к титру 0,1М р-ра натрия гидроксида;

10 – объем пробы, мл.

Дополнительно интенсивность роста тест-культуры оценивали по изменению показателя оптической плотности после термостатирования, который определяли с помощью прибора «КФК-3» (Россия).

На основании полученных данных кислотообразования и оптической плотности рассчитывали коэффициент стимуляции кислотообразования и роста соответственно. Численное выражение коэффициента стимуляции (КС) выражается с использованием формулы:

$$КС = \frac{О_{кон} - О_{нач}}{К_{кон} - К_{нач}},$$

где $О_{кон}$ – средний конечный показатель в опытной пробе;

$О_{нач}$ – средний начальный показатель в опытной пробе;

$К_{кон}$ – средний конечный показатель в контрольной пробе;

$К_{нач}$ – средний начальный показатель в контрольной пробе;

Интенсивность потребления глюкозы в самом начале и в конце экспозиции регистрировали с помощью анализатора глюкозы автоматического «Энзискан Ультра» (Россия) с последующим пересчётом в процентное содержание глюкозы в исследуемых образцах.

Используемая бедная питательная среда – 0,5% стерильный раствор глюкозы – позволяет выявить стимулирующий эффект компонентов, вносимых в состав опытных образцов. Результаты, характеризующие параметры роста тест-культуры при добавлении образца синбиотика, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры роста тест-культуры (*B. Bifidum 1*) на 0,5%-ном растворе глюкозы

№ п/п	Параметр роста	Исследуемый образец		Контрольный образец		Значение коэффициента стимуляции (КС)
		до инкубации	после инкубации	до инкубации	после инкубации	
1	Кислотность, °Т	2,12±0,24	9,17±0,71	0,76±0,11	2,21±0,47	**4,75**
2	Оптическая плотность	0,02±0,001	0,210±0,003	0,02±0,001	0,100±0,005	**2,25**
3	Глюкоза, %	18,88±0,22	9,39±0,34	18,52±0,35	15,55±0,31	-
4	pH	5,20±0,01	3,49±0,11	5,17±0,02	3,85±0,01	

Нарастание оптической плотности, закисление питательной среды – величины, значения которых свидетельствуют об эффективном росте тест-культуры на бедной питательной среде с добавлением исследуемого образца-синбиотика. Следствием стимулирующих эффектов водного извлечения из экспериментального синбиотика является увеличение потребности клеток тест-культуры в углеводном компоненте для более интенсивного их развития, выраженное высокой степенью утилизации глюкозы по сравнению с контрольным образцом. Положительные результаты подтверждают целесообразность выбранного состава синбиотика и способа конструирования.

Апробирована методика конструирования синбиотика и его состав, включающий в себя растительный субстрат (в качестве пребиотического компонента) и метаболиты лактобактерий. Полученные результаты исследований биологической активности экспериментального образца свидетельствуют о высокой эффективности синбиотика и являются основой для дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Янковский ДС, Дымент ГС. Бифидобактерии и лактобациллы как оптимальная основа современных пробиотиков. Современная педиатрия. 2006;10(3):1-10.

2. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС 1.7.2.0009.15 «Определение специфической активности пробиотиков». Доступно по: http:// femb.ru/femb/pharmacopea.php

SUMMARY

THE DEVELOPMENT OF THE SYNBIOTIC ON THE BASIS OF LACTOBACTERIA METABOLITES AND PREBIOTIC (PLANT) SUBSTRATE. BIOLOGICAL ACTIVITY ANALYSIS

Hohryakova M.D., second-year graduate student

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy"

The research work is devoted to the development of the synbiotic containing plant substrate and lactobacteria probiotic strains metabolic faction as well as its biological activity analysis. The design of the synbiotic takes place due to the selection of the best possible plant substrate, the use of which facilitates lactobacteria biologically active substances (metabolites) maximum accumulation.

Key words: *synbiotic, lactobacteria, plant substance, desing, metabiotic, biological activity.*

REFERENCES

1. Yankovsky DS, Dyment GS. Bifidobacteria and lactobacilli as the optimal basis for modern probiotics. Sovr. Pediatriya. 2006;10(3):1-10

2. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. Vol. 1. OFS 1.7.2.0009.15 «Determination of the specific activity of probiotics». Available at: http:// femb.ru/femb/pharmacopea.php

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ, БЕЗОПАСНОСТИ И ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ-ПРОДУЦЕНТА РИТУКСИМАБА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ В СООТВЕТСТВИИ С РЕКОМЕНДАЦИЯМИ ICH

Чичарова М.А., студ. 2 курса магистратуры

Руководители: [1,2]**Басовский Ю.И.**, канд. биол. наук, рук. отдела генетической инженерии;

[1,2]**Таранов А.И.**, рук. лаборатории генной аналитики и аттестации клеточных линий

[1]Пущинский государственный естественно-научный институт,

142290, Пущино, проспект Науки, д. 3, Российская Федерация

[2]ЗАО «БИОКАД»,

142380, Московская область, Чеховский район, пос. Любучаны, Российская Федерация

E-mail: chicharova@biocad.ru

Согласно требованиям Всемирной организации здравоохранения, Международной Конференции по Гармонизации (ICH – International Council for Harmonisation) и другим нормативным документам, регистрационное досье на биологический препарат должно содержать информацию о создании и характеризации клеточных банков линии-продуцента [1, 2]. Нами была проведена характеризация генетической стабильности, безопасности и видовой принадлежности банков линии-продуцента терапевтического антитела ритуксимаб молекулярно-генетическими методами согласно рекомендациям ICH. По исследуемым параметрам клеточная линия полностью соответствует нормативным требованиям, предъявляемым к линиям-продуцентам терапевтических антител.

Ключевые слова: *клеточная линия CHO, моноклональное антитело, генетическая стабильность, микоплазмы, вирусная контаминация, видовая принадлежность, полимеразная цепная реакция.*

Ритуксимаб – химерное моноклональное антитело мыши/человека, которое специфически связывается с антигеном CD20 В-лимфоцитов. Ритуксимаб широко используется в клинической практике для терапии неходжкинских лимфом, ревматоидного артрита и других заболеваний [3]. В России биоаналог ритуксимаба выпускается компанией BIOCAD под торговым наименованием Ацеллбия®. Производство препарата Ацеллбия® осуществляется с использованием клеточной линии CHO (*Chinese hamster ovary*). В компании был создан основной банк клеток (ОБК) линии-продуцента. Из ОБК был получен новый рабочий банк клеток (РБК), предназначенный для непосредственного использования в производстве. Для контроля качества клеточной линии на протяжении всего периода культивирования из РБК был получен банк клеток предельного клеточного возраста *in vitro* (КПКВ) – клетки-продуценты, прошедшие максимальное число удвоений, необходимых для осуществления производственного процесса.

Целью работы являлась характеризация генетической стабильности, безопасности и видовой принадлежности банков линии-продуцента ритуксимаба с использованием молекулярно-генетических методов. На основании результатов исследования будет принято решение о применении обновленных банков клеточной линии-продуцента ритуксимаба

для промышленного производства препарата Ацеллбия® на территории Российской Федерации. Данные, полученные в ходе исследования, будут использованы для составления досье на лекарственный препарат Ацеллбия® (ритуксимаб) при его регистрации на зарубежных рынках.

Объектами исследования являлись осадки клеток, клеточная суспензия и культуральная жидкость ОБК, РБК и КПКВ линии-продуцента моноклонального антитела ритуксимаб.

Характеризация генетической стабильности клеточной линии включала:

1) определение нуклеотидных последовательностей кДНК генов легкой и тяжелой цепей ритуксимаба (целевых генов) секвенированием по Сэнгеру и сравнение полученных последовательностей с референсными последовательностями с использованием программы *SnapGene*® (GSL Biotech LLC).

2) определение количества копий целевых генов в геноме линии-продуцента методом количественной ПЦР в реальном времени. С использованием серии разведений линеаризованной плазмидной ДНК, содержащей целевые последовательности, была получена линейная зависимость порогового цикла ПЦР (C_t) от количества копий целевых генов. Определение числа копий генов в клетках ОБК, РБК и КПКВ проводилось путем наложения C_t исследуемых образцов на полученную стандартную кривую.

3) определение относительного уровня экспрессии целевых генов в клетках РБК и КПКВ по сравнению с ОБК методом количественной ПЦР в реальном времени. В качестве матрицы для ПЦР использовалась кДНК, наработанная с выделенной из клеток тотальной РНК. Для выравнивания по количеству анализируемой РНК проводилась амплификация гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в сравниваемых образцах с последующим обсчетом результатов ΔΔCt методом.

4) подтверждение стабильности локализации целевых генов в геноме линии-продуцента методом саузерн-блот гибридизации. Для этого геномную ДНК (гДНК) клеток ОБК, РБК, КПКВ и родительской линии обрабатывали эндонуклеазами рестрикции HindIII и NcoI. Полученные фрагменты разделяли в агарозном геле методом электрофореза, переносили на мембрану из нитроцеллюлозы, после чего инкубировали мембрану с меченным фосфатазой ДНК-зондом, комплементарным гену легкой или тяжелой цепи. Детекцию сигналов, соответствующих целевому гену, проводили с использованием хемилюминесцентного субстрата. В качестве положительного контроля использовались плазмидные ДНК, содержащие последовательности легкой или тяжелой цепи ритуксимаба.

Для подтверждения микробиологической и вирусной безопасности банки клеточной линии были исследованы на контаминацию микоплазмами, везивирусом и малым вирусом мышей методом ПЦР в реальном времени. Для обнаружения микоплазм использовалась TaqMan-проба, специфичная к гену 16S РНК микоплазм [4]. Детекция везивируса и малого вируса мышей проводилась с использованием TaqMan-проб, специфичных к сегментам нуклеиновых кислот данных вирусов. В экспериментах применялся набор контрольных реакций, снижающих риски получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Видовая принадлежность клеточной линии была подтверждена методом «штрих-кодирования» ДНК, основанным на анализе межвидовых различий в нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы *COX1* [5]. Для этого была проведена ПЦР-амплификация фрагмента гена *COX1* и секвенирование продукта реакции. Полученная нуклеотидная последовательность была идентифицирована в базе данных *Barcode of life*, что позволило определить вид, производным от которого является исследуемая клеточная линия.

Для клеточных линий-продуцентов терапевтических антител необходимо подтвердить сохранение генетической стабильности в клетках ОБК, РБК и КПКВ с использованием ряда методов.

Так, для банков линии-продуцента ритуксимаба были определены нуклеотидные последовательности целевых генов. Полученные в результате секвенирования по Сэнгеру последовательности генов легкой и тяжелой цепей ритуксимаба на 100% соответствовали референсным последовательностям.

Результаты определения количества копий генов легкой и тяжелой цепей ритуксимаба в геноме линии-продуцента и уровней их экспрессии приведены на рисунке 1. В соответствии с критериями приемлемости, установленными для данных методик, клеточная линия считается стабильной, если разница в числе копий и уровне экспрессии целевых генов в РБК и КПКВ по сравнению с ОБК составляет не более 30%. В исследуемой клеточной линии количество копий генов легкой и тяжелой цепей ритуксимаба и уровни их экспрессии являются стабильными.

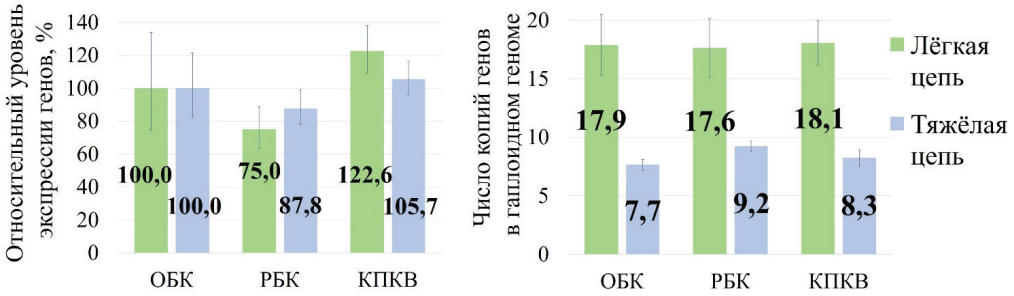


Рисунок 1. Относительные уровни экспрессии и количество копий генов лёгкой и тяжёлой цепей ритуксимаба в геноме линии-продуцента

Результаты анализа стабильности локализации целевых генов в геномах клеток ОБК, РБК и КПКВ с использованием метода саузерн-блот гибридизации приведены на рисунке 2. Количество сигналов, соответствующих целевым генам, и соотношение их интенсивностей одинаково для всех образцов банков линии-продуцента. Таким образом, интегрированные в геном исследуемой клеточной линий-продуцента целевые экспрессионные кассеты с генами тяжелой и легкой цепей ритуксимаба остаются стабильными в ОБК, РБК и КПКВ.

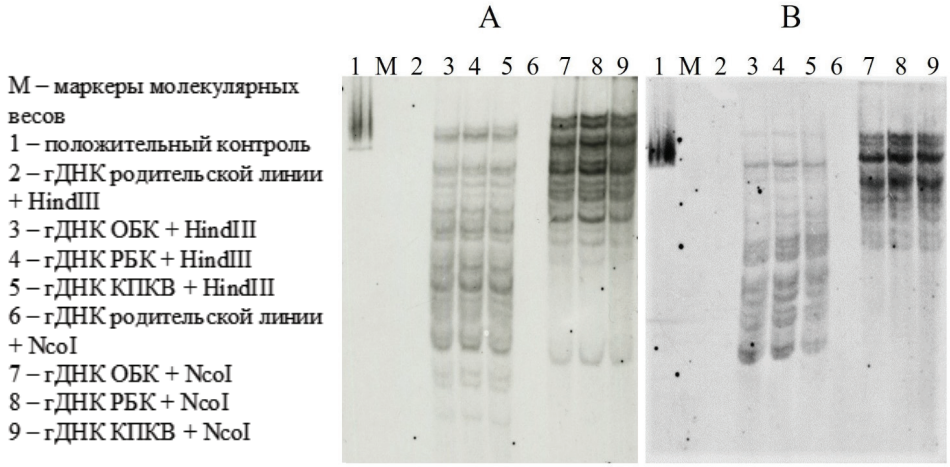


Рисунок 2. Результаты саузерн-блот гибридизации:
А – для гена легкой цепи ритуксимаба, В – для гена тяжелой цепи ритуксимаба. HindIII, NcoI – эндонуклеазы рестрикции

В результате тестирования банков клеточной линии на контаминацию микоплазмами, везивирусом и малым вирусом мышей методом ПЦР в реальном времени были получены значения C_t для образцов и контрольных реакций. Значения C_t соответствуют критериям приемлемости, установленным для данных методик. Таким образом, эксперимент был проведен корректно. ОБК, РБК и КПКВ клеточной линии-продуцента ритуксимаба не имеют признаков контаминации микоплазмами, везивирусом и малым вирусом мышей.

Для определения видовой принадлежности банков клеточной линии-продуцента ритуксимаба нуклеотидная последовательность фрагмента гена *COX1* была идентифицирована в базе данных *Barcode of life*. Анализ последовательности гена *COX1* показал, что клеточная линия-продуцент ритуксимаба является производной от вида *Cricetulus griseus*. Это подтверждает корректное видовое происхождение исследуемой клеточной линии.

Нами проведена характеризация клеточных банков линии-продуцента ритуксимаба молекулярно-генетическими методами. Результаты исследования подтверждают генетическую стабильность клеточной линии на протяжении периода культивирования, необходимого для проведения производственного процесса. Контаминация банков клеточной линии микоплазмами, везивирусом и малым вирусом мышей не обнаружена, что свидетельствует о ее безопасности. Видовая принадлежность клеточной линии соответствует ожидаемой. Таким образом, исследуемые характеристики банков клеточной линии-продуцента ритуксимаба полностью соответствует требованиям ICH.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Available at: https://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf .

2. Guidance ICH. Q5D. Quality of biotechnological/biological products: derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products Available at: https://www.fda.gov/media/71463/download

3. Salles G, Barrett M, Foà R et al. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: A review of 20 years of clinical experience. Adv Ther. 2017;34(10):2232-2273. DOI: 10.1007/s12325-017-0612-x.

4. Pauwels K, Herman P, Svaerenbergh B et al. Animal cell cultures: risk assessment and biosafety recommendations. Applied Biosafety. 2007;12:26–38. DOI: 10.1177/153567600701200105.

5. Cooper J, Sykes G, King S et al. Species identification in cell culture: A two-pronged molecular approach. In vitro cellular & developmental biology – Animal. 2007;43:344-351. DOI: 10.1007/s11626-007-9060-2.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF GENETIC STABILITY, SAFETY AND SPECIES IDENTITY OF CELL LINE PRODUCING RITUXIMAB USING MOLECULAR GENETIC TECHNIQUES ACCORDING TO THE PRINCIPLES OF ICH

Chicharova M.A., master student of the 2 year of education
Pushchino State Institute of Natural Science;
142290, Pushchino, Prospekt nauki, 3, Russian Federation
BIOCAD,
142380, Moscow region, Chekhovsky District, Lyubuchany, Russian Federation

According to the requirements of The World Health Organization, International Council for Harmonisation (ICH) and other regulatory documents, the registration dossier of biological product should include information about development and characterization of producer cell line [1, 2]. We carried out the characterization of genetic stability, safety and species identity of cell line producing rituximab using molecular genetic techniques according to the principles of ICH. All obtained results meet the requirements for cell lines used in therapeutic antibodies production.

Key words: *cell line CHO, monoclonal antibody, genetic stability, mycoplasmas, viral contamination, species identity, polymerase chain reaction.*

REFERENCES

1. World Health Organization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Available at: https://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf .
2. Guidance ICH. Q5D. Quality of biotechnological/biological products: derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products Available at: https://www.fda.gov/media/71463/download
3. Salles G, Barrett M, Foà R et al. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: A review of 20 years of clinical experience. Adv Ther. 2017;34(10):2232-2273. DOI: 10.1007/s12325-017-0612-x.
4. Pauwels K, Herman P, Svaerenbergh B et al. Animal cell cultures: risk assessment and biosafety recommendations. Applied Biosafety. 2007;12:26–38. DOI: 10.1177/153567600701200105.
5. Cooper J, Sykes G, King S et al. Species identification in cell culture: A two-pronged molecular approach. In vitro cellular & developmental biology – Animal. 2007;43:344-351. DOI: 10.1007/s11626-007-9060-2.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ВАКЦИНЫ

Шамаева С.А., студ. 2 курса, **Успанова А.С.**, студ. 2 курса
Руководитель: **Богданова О.Ю.**, канд. биол. наук, доцент каф. микробиологии
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: sofiya.shamaeva@spcpu.ru

Проанализированы статистические данные, относящиеся к динамике распространения заболевания в мире и Российской Федерации, рассмотрены основные подходы современных методов лечения ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: *ВИЧ-инфекция, CD4-лимфоциты, антиретровирусная терапия, вакцинация, широко нейтрализующие антитела.*

ВИЧ-инфекция распространена во всем мире, и в России эта проблема стоит особенно остро. По состоянию на сентябрь 2020 года кумулятивное количество зарегистрированных случаев выявления ВИЧ-инфекции среди граждан РФ составило 1 476 023 человека [1, 2].

Несмотря на то, что в современной медицине всё ещё отсутствует возможность полного излечения от ВИЧ-инфекции, было разработано множество новых препаратов, что позволило существенно улучшить состояние больных и увеличить срок жизни.

Цель работы: проанализировать статистические данные, относящиеся к динамике распространения заболевания в мире и Российской Федерации, рассмотреть основные подходы современных методов лечения ВИЧ-инфекции и возможность создания вакцины.

Задачи работы:

1. Изучить строение вирусной частицы вируса иммунодефицита человека.
2. Рассмотреть новые модификации ВИЧ-частиц.
3. Проанализировать статистические данные распространения ВИЧ-инфекции в России и мире.
4. Ознакомиться с основными положениями антиретровирусной терапии и возможностью создания вакцины.

ВИЧ-инфекция – это вирус, который атакует иммунную систему, естественную защитную систему организма [3]. ВИЧ-инфекция – антропонозное медленно прогрессирующее заболевание. Возбудитель заболевания – вирус иммунодефицита человека, относится к подсемейству Lentivirus семейства Retroviridae. Морфологически патоген похож на сферу размером до 150 нм, по краям которой располагаются шипы. Капсид состоит из белков и вертикальных наростов, благодаря которым может контактировать с другими клетками. На верхней части шляпки располагаются гликопротеины. В основной части вируса располагается геном из 2 молекул, состоящих из 9 генов [4]. Спектр симптомов и заболеваний, которые могут возникнуть, когда ВИЧ-инфекция серьезно ослабляет иммунную защиту организма, называется синдромом приобретенного иммунодефицита или СПИДом. [5]

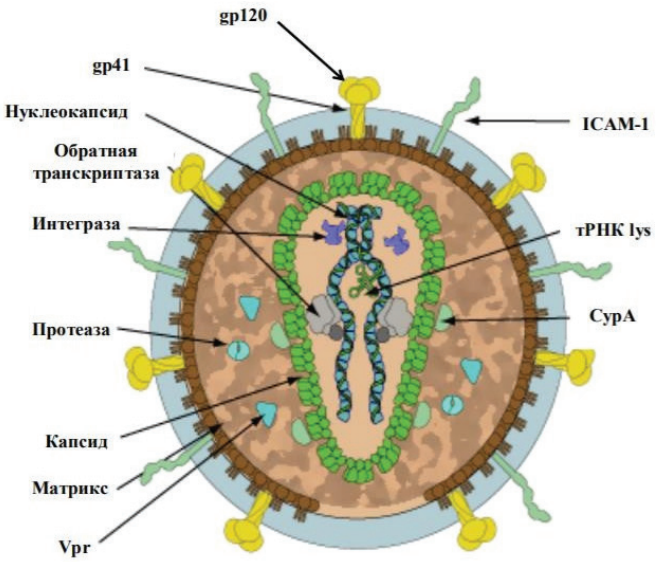


Рисунок 1. Строение нуклеокапсида ВИЧ

Жизненный цикл ВИЧ состоит из нескольких стадий. Стадия проникновения вируса в клетки осуществляется за счет имеющегося у ВИЧ белка gp120, который способен взаимодействовать с белком-CD4 поверхности клетки человека. Выделяют ряд дополняющих друг друга иммунопатологических механизмов взаимодействия ВИЧ с CD4-клетками:

- интенсивный лизис Т-лимфоцитов в результате репродукции и массивного выхода из клеток вирионов (несколько тысяч в генерации одной клетки);
- интеграция геномов вируса и клетки. Хронические инфекции и ряд других воздействий ведут к дополнительной стимуляции CD4, что, в свою очередь, приводит к диссеминации ВИЧ-инфекции и поражению еще большего количества лимфоцитов;
- вирус резко изменяет мембраны Т-лимфоцитов и приводит к их слиянию в нежизнеспособные многоядерные клетки-монстры;
- скорость гибели зараженных клеток пропорциональна количеству CD4-рецепторов на их поверхности. В результате некоторая часть клеток выживает и сохраняет вирус в латентном состоянии в виде провируса;
- в инфицированных клетках снижается количество белков 1-го класса главного комплекса гистосовместимости на их поверхности. Без этого цитотоксические лимфоциты не способны связывать антиген. Таким путем ВИЧ избегает любых воздействий со стороны иммунной системы (ситуация «иммунного паралича»);
- в инфицированных клетках ВИЧ вызывает секрецию растворимого фактора супрессии, который блокирует иммунные реакции. В результате угнетается образование специфических АТ и пролиферация Т-клеток;
- ВИЧ изменяет геном CD4-лимфоцитов, в результате чего они лишаются способности к трансформации и нормальному ответу на ИЛ-2.[6]

На основании четкой связи прогрессирования заболевания со снижением у пациента количества CD4-лимфоцитов, эта черта является главной особенностью патогенеза заболевания [7].

Антиретровирусная терапия – одно из величайших достижений в истории медицины. На начальном этапе развития этиотропной терапии ВИЧ-инфекции, называемой антиретровирусной терапией (АРТ), все АРВ-препараты применялись только в монотерапии из опасения, что совместное применение двух и более препаратов приведет к суммированию (и потенцированию) их токсических свойств. Однако при таком подходе наблюдаемый эффект был кратковременным и быстро сменился формированием медикаментозной устойчивости.

По мере накопления данных о комбинированном применении АРВ-препаратов становилось понятно, что препятствия к комбинированному применению двух АРВ-препаратов можно обойти, выбирая дозы и рациональные комбинации препаратов с различными видами токсичности. [8,9]

В настоящее время основным направлением в терапии ВИЧ-инфекции является применение препаратов, снижающих способность ВИЧ к репродукции.

1. Уменьшение количества таблеток путем использования комбинированных препаратов;

2. Снижение частоты приема препаратов;

3. Уменьшение частоты побочных эффектов путем подбора для комбинации препаратов, не усиливающих токсическое действие друг друга;

4. Разработка новых препаратов, обладающих меньшим количеством побочных эффектов и не усиливающих токсическое действие других лекарств, а также не изменяющих своих характеристик на фоне приема пищи;

5. Разработка новых классов лекарств, не позволяющих вирусу проникать внутрь клетки, как, например, антагонисты CCR5 рецепторов, ингибиторы фузии и др. [10]

Например, 21 декабря 2020 компания ViiV Healthcare в пресс-релизе объявила о выдаче разрешения на продажу первого в Европе полного инъекционного лечения ВИЧ длительного действия. Коктейль из двух антиретровирусных (АРВ) препаратов (рилпивирина и каботегравира) можно принимать каждые несколько месяцев вместо ежедневных таблеток, чтобы держать под контролем ВИЧ-инфекцию. [11]

Кроме того, активно ведутся разработки вакцин. По результатам последних исследований вакцин международным сообществом, некоторые вакцины против ВИЧ действительно могут индуцировать гуморальный иммунный ответ против ВИЧ, но они оказались неэффективными или незначительно эффективными [12,13].

Наиболее перспективным направлением лечения ВИЧ-инфекции следует считать применение широконейтрализующих антител – bNAbs, имеющих удлинения нормальных протеинов антител, позволяющие им проникать сквозь гликановый щит ВИЧ. Однако, антитела bNAb развиваются у меньшинства людей с ВИЧ через годы после инфицирования.[14]

Изучение воздействия bNAb уже проводится в рамках таких исследований, как AntibodyMediatedProtection (AMP), отчет о первых результатах которого должны были появиться в конце 2020 года, однако, из-за сложившейся эпидемиологической обстановки, до данного момента не были обнародованы [15].

Были предоставлены и проанализированы статистические данные, демонстрирующие распространение заболевания в мире и Российской Федерации, рассмотрены иновациионные методы лечения ВИЧ-инфекции и возможность создания вакцины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Справка ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 30 сентября 2020 г.

2. Федеральный научно-методический центр попрофилактике и борьбе со СПИДом. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень. Москва, 2020;45

3. Хаффарессас Я. «ВИЧ-инфекция и коморбидные состояния». Фундаментальная ме- дицина. 2019. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/hiv-infection-and-comorbidities

4. Прокофьева ММ, Кочетков СН, Прасолов ВС. Терапия ВИЧ-инфекции: методы и перспективы. 2016. Доступно по: https://cyberleninka.ru/article/n/terapiya-vich-infektsii-metody- i-perspektivy

5. Руководство по ВИЧ/СПИДу: Причины, симптомы и варианты лечения на 7 апреля 2020 г. Доступно по: https://www.drugs.com/health-guide/hiv-aids.html

6. Жизненный цикл ВИЧ-инфекции на 28 сентября 2020 г. Доступно по: https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/hiv-life-cycle.

7. Berndsen, Zachary T et al. "Visualization of the HIV-1 Env glycan shield across scales." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2020;117(45):28014-28025. doi:10.1073/pnas.2000260117

8. Иманова ЭЭ. Антиретровирусная терапия: успехи, проблемы и перспективы. Биомедицина Баку. 2014;3. Доступно по: https://cyberleninka.ru/article/n/antiretrovirusnaya-terapiya-uspehi-problemy-i-perspektivy.

9. Davoodi S, Bolhassani A, Namazi F. In vivo delivery of a multiepitope peptide and Nef pro- tein using novel cell-penetrating peptides for development of HIV-1 vaccine candidate. Bio- technology Letters [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2021 Jan 1;43(3):547–59. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/s10529-020-03060-3

10. Jaeger H et al. Week 96 efficacy and safety of cabotegravir + rilpivirine every 2 months: ATLAS-2M. Presented at the Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) Virtual; March 6-10 2021

11. Галегов ГА, Андронова ВЛ. АнтиВИЧ/СПИД-препарат 6HP: антивирусная активность, доклиническое изучение. Эффективность у взрослых ВИЧ-инфицированных больных. Вопросы вирусологии. 2019;64(1):12-15 DOI: http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2019-64-1- 12-15

12. Feinberg M. Are we getting closer? Preventive vaccine and passive immunization strategies. HIV Research for Prevention (HIVR4P) virtual conference, plenary PL02.02, 2021

13. Wen, Ziyu, and Caijun Sun. "A Zigzag but Upward Way to Develop an HIV-1 Vaccine." Vaccines vol. 8,3 511. 8 Sep. 2020, doi:10.3390/vaccines8030511

14. Huang, Deli et al. "Vaccine elicitation of HIV broadly neutralizing antibodies from engi- neered B cells." Nature communications vol. 11,1 5850. 17 Nov. 2020, doi:10.1038/s41467- 020-19650-8

15. Mothe, Beatriz, and Christian Brander. "Small steps forward for HIV vaccine development." Nature medicine vol. 26,4 (2020): 466-467. doi:10.1038/s41591-020-0837-0

SUMMARY

CURRENT STATE OF THE PROBLEM OF TREATMENT OF HIV INFECTION AND PROSPECTS FOR CREATION OF A VACCINE

Shamaeva S.A., 2nd student, **Uspanova A.S.**, 2nd student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation
E-mail: sofiya.shamaeva@spcpu.ru

The statistical data related to the dynamics of the spread of the disease in the world and the Russian Federation are analyzed, the main approaches of modern methods of treating HIV infection are considered.

Key words: *HIV infection, CD4 lymphocytes, antiretroviral therapy, vaccination, broadly neutralizing antibodies.*

REFERENCES

1. Federal Scientific and Methodological Center for the Prevention and Control of AIDS FBSI Central Research Institute of Epidemiology Rospotrebnadzor. Certificate HIV infection in the Russian Federation as of September 30, 2020 (in Russ)
2. Federal Scientific and Methodological Center for the Prevention and Control of AIDS. HIV infection. Newsletter No. 45. Moscow, 2020 (in Russ)
3. Haffaressas J. HIV infection and comorbid conditions.Fundamental medicine. 2019. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/hiv-infection-and-comorbidities (in Russ)
4. Prokofieva MM, Kochetkov S.N., Prasolov V.S. Therapy of HIV infection: methods and prospects. 2016. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/terapiya-vich-infektsii-metody- i-perspektivy
5. Guidelines for HIV / AIDS: Causes, Symptoms and Treatment Options as of April 7, 2020 URL: https://www.drugs.com/health-guide/hiv-aids.html (in Russ)
6. Life cycle of HIV infection as of 28 September 2020. Available at: https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/hiv-life-cycle (in Russ)
7. Berndsen, Zachary T et al. "Visualization of the HIV-1 Env glycan shield across scales." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2020;117(45):28014-28025. doi:10.1073/pnas.2000260117
8. Imanova EE. Antiretroviral therapy: successes, problems and prospects. Biomedicine (Baku). 2014;3. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/antiretrovirusnaya- terapiya-uspehi-problemy-i-perspektivy (in Russ)
9. Davoodi S, Bolhassani A, Namazi F. In vivo delivery of a multiepitope peptide and Nef pro- tein using novel cell-penetrating peptides for development of HIV-1 vaccine candidate. Bio- technology Letters [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2021 Jan 1;43(3):547–59. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/s10529-020-03060-3
10. Jaeger H et al. Week 96 efficacy and safety of cabotegravir + rilpivirine every 2 months: ATLAS-2M. Presented at the Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) Virtual; March 6-10 2021
11. Galegov G.A., Andronova V.L. Anti-HIV / AIDS drug 6HP: antiviral activity, preclinical study. Efficacy in adult HIV-infected patients. Virology issues. 2019; 64 (1): 12-15 DOI: http://dx.doi.org/ 10.18821 / 0507-4088-2019-64-1-12-15 (in Russ)
12. Feinberg M. Are we getting closer? Preventive vaccine and passive immunization strategies. HIV Research for Prevention (HIVR4P) virtual conference, plenary PL02.02, 2021
13. Wen, Ziyu, and Caijun Sun. "A Zigzag but Upward Way to Develop an HIV-1 Vaccine." Vaccines vol. 8,3 511. 8 Sep. 2020, doi:10.3390/vaccines8030511
14. Huang, Deli et al. "Vaccine elicitation of HIV broadly neutralizing antibodies from engi- neered B cells." Nature communications vol. 11,1 5850. 17 Nov. 2020, doi:10.1038/s41467- 020-19650-8
15. Mothe, Beatriz, and Christian Brander. Small steps forward for HIV vaccine development. Nature medicine vol. 26,4 (2020): 466-467. doi:10.1038/s41591-020-0837-0

ЭКСПРЕССИЯ β-ДЕФЕНСИНА 3 В ТКАНЯХ ГИПОТАЛАМУСА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЭМОЦИОНАЛЬНО-ФИЗИЧЕСКОГО СТРЕССА

Шустов М.В., студ. 4 курса
Руководитель: **Янкелевич И.А.**, к.б.н.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: shustov.mark@pharminnotech.com

Исследовано изменение уровня экспрессии β-дефенсина 3 на уровне мРНК в условиях покоя и хронического эмоционально-физического стресса в тканях гипоталамусов крыс.

Ключевые слова: *β-дефенсин 3, дефенсины, антимикробные пептиды, хронический стресс, стресс, нейроиммунные взаимодействия.*

Одним из важнейших вопросов, возникшим в процессе исследования как нервной, так и иммунной систем, стал вопрос о функционировании связи между ними, так, в частности, на сегодняшний день уже имеются данные, свидетельствующие о чувствительности иммунных клеток к медиаторам нервной системы, а также о способности клеток, традиционно относящихся к нервной ткани участвовать в реакциях воспаления. Однако несмотря на все полученные в последние годы данные и выдвинутые на их основе гипотезы и теории вопрос о молекулярных механизмах взаиморегулирования нервной и иммунной систем по-прежнему остается открытым. [1]

Одним из немногочисленных сигналов способных приводить к ответу как со стороны нервной, так и со стороны иммунной системы является стресс. Так действие стресса приводит к перераспределению иммунокомпетентных клеток в крови и другим многочисленным эффектам иммунной системы, и вместе с тем вызывает активацию различных структур центральной нервной системы. [2]

На данный момент существуют данные о способности стресса индицировать экспрессию эндогенных антимикробных пептидов – дефенсинов. [3] Однако, данные о представленности дефенсинов в центральной нервной системе и их роли в ней не многочисленны, в частности отсутствуют данные об экспрессии β-дефенсина 3 как в условиях покоя, так и в условиях стресса. На основании описанного, необходимым является изучение участия дефенсинов в регуляции нейроиммунных взаимодействий, следовательно, целью данного исследования является изучение влияния хронического эмоционально-физического стресса на уровень экспрессии β-дефенсина 3 в тканях гипоталамуса экспериментальных животных.

Для достижения данной цели была поставлена следующая задача: провести анализ экспрессии β-дефенсина 3 в клеточных гомогенатах тканей гипоталамусов экспериментальных животных методом количественной полимеразной цепной реакции, после аппликации десятидневного стрессирования.

Исследование было произведено на взрослых крысах самцах чистой линии Wistar массой 290-311 г., содержащих в стандартных условиях вивария, с 12-часовым световым циклом, со свободным доступом к пище и воде. В качестве модели хронического эмоционально-физического стресса применяли ежедневное принудительное плаванье в холодной воде температурой +2°-4°C в течение 2 минут. Процедуру стрессирования повторяли в течение 10 дней строго в одно и тоже время с целью избегания влияния циркадных ритмов. В качестве контроля использовали крыс, не подвергавшихся никаким воздействиям. После окончания десятидневной процедуры стрессирования, на 11-й день, животных выводили из эксперимента путём декапитации, после чего извлекали гипоталамусы и замораживали их при температуре -80°C.

Выделение РНК из тканей гипоталамуса проводили с помощью набора Gene Elute Mammalian total RNA mini preparation kit, Sigma-Aldrich, затем с помощью метода обратной транскрипции синтезировали кДНК с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, после чего методом полимеразной цепной реакции реального времени определили относительную степень экспрессии гена крысиного β-дефенсина 3 при помощи готовой смеси реактивов БиоМастер Hs-qPCR (2x). Уровень экспрессии β-дефенсина 3 оценивали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы.

В результате анализа полученных данных было выявлено статистически значимое понижение экспрессии гена β-дефенсина 3 у группы животных подверженных экспериментальному стрессу, в сравнении с контрольной группой. Достоверность различий была установлена с применением критерия Манна-Уитни (уровень статистической значимости $p<0,05$). Данные представлены на рисунке 1.

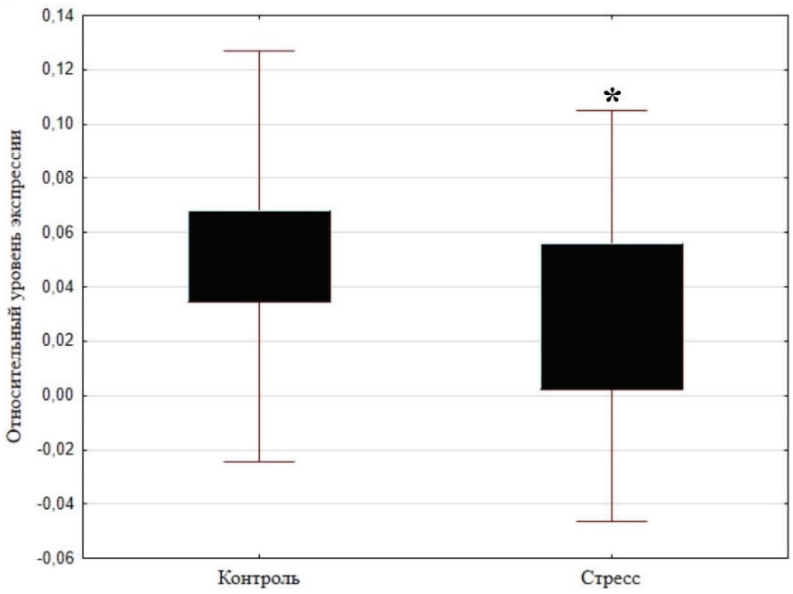


Рисунок 1. Экспрессия гена β-дефенсина 3 в гипоталамических структурах головного мозга крыс.
*** – отличается от контрольной группы**

Ввиду отсутствия сведений об экспрессии антимикробных пептидов и, в частности, β-дефенсина 3 в гипоталамических структурах, полученные результаты дают основания для формирования новых научных траекторий в области нейроиммунных взаимодействий.

Установлено статистически достоверное понижение экспрессии гена β-дефенсина 3 в тканях гипоталамуса экспериментальных животных в условиях хронического эмоционально-физического стресса, что дает основания полагать что хронический эмоционально физический стресс супрессирует экспрессию β-дефенсина 3 в тканях гипоталамуса, а также создает основу для исследования молекулярных механизмов нейроиммунных взаимодействий, в которые вовлечены антимикробные пептиды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корнева ЕА. Пути взаимодействия нервной и иммунной систем: история и современность, клиническое применение. Медицинская иммунология. 2020;22(3):405–418.

2. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. Annual Review of Immunology.; 2001;20:125–163

3. Martin-Ezquerra G, Man MQ, Hupe M, Rodriguez-Martin M, Youm JK, Trullas C, et al. Psychological stress regulates antimicrobial peptide expression by both glucocorticoid and β-adrenergic mechanisms. European Journal of Dermatology. 2011;21(2):48–51.

SUMMARY

β-DEFENSIN 3 EXPRESSION IN HYPOTHALAMIC STRUCTURES UNDER CONDITIONS OF CHRONIC EMOTIONAL-PHYSICAL STRESS

Shustov M.V., 4th year student
Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

The change in the level of β-defensin 3 expression at the mRNA level was studied under conditions of rest and chronic emotional-physical stress in the tissues of the hypothalamus of rats.

Key words: *β-defensin 3, defensins, antimicrobial peptides, chronic stress, stress, neuroimmune interactions.*

REFERENCES

1. Korneva EA. Puti vzaimodejstviya nervnoj i immunnoj sistem: istoriya i sovremennost', klinicheskoe primenenie. Medicinskaya immunologiya. 2020;22(3):405–418. (in Russ)

2. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. Annual Review of Immunology.; 2001;20:125–163

3. Martin-Ezquerra G, Man MQ, Hupe M, Rodriguez-Martin M, Youm JK, Trullas C, et al. Psychological stress regulates antimicrobial peptide expression by both glucocorticoid and β-adrenergic mechanisms. European Journal of Dermatology. 2011;21(2):48–51.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ АФИЛЛОФОРОВЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Юсупова А.А., студ. 4 курса
Руководители: **Ананьева Е.П.**, канд. биол. наук, зав. кафедрой;
Псурцева Н.В., канд. биол. наук, зав. лабораторией
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: yusupova.anastasiya@pharminnotech.com

Проведен скрининг штаммов афиллофоровых базидиомицетов, в процессе которого были изучены морфологические, физиологические и биохимические свойства макромицетов. Выявлены закономерности роста и развития исследованных базидиомицетов. Получены данные о биосинтетическом потенциале штаммов на основе изучения протеолитической (а именно, желатиназной), целлюлозолитической и оксидоредуктазной активностей.

Ключевые слова: *афиллофоровые базидиомицеты, скорость роста, ферментативная активность, гваякол, сирингалдазин.*

Базидиальные макромицеты занимают особое место в промышленной фармацевтической биотехнологии, поскольку они являются продуцентами биологически активных веществ таких как ферменты, антибиотики, полисахариды и др. Более того, отсутствие спороношения при культивировании исключает возникновение профессиональных аллергических заболеваний. В связи с этим, увеличился интерес к исследованиям макромицетов как источников биологически активных соединений с целью получения эффективных и безопасных биотехнологических продуктов [1].

Благодаря широкому спектру химических, биологических свойств, изучение афиллофоровых грибов – это необходимый вектор не только для современной биотехнологии, но и для промышленной технологии лекарственных средств [2]. Вследствие этого, целью данного исследования является отбор перспективных штаммов афиллофоровых базидиомицетов с большим биосинтетическим потенциалом для дальнейшего более подробного изучения их в условиях глубинного культивирования.

Объектами исследования служили 32 штамма афиллофоровых базидиомицетов, выделенных в Приморском крае в 2020 г. и сохраняемых в Коллекции культур базидиомицетов БИН РАН. Штаммы хранятся в коллекционном фонде с использованием трех методов: 1) методом суб-культуры в пробирках на скошенном сусло-агаре, 2) дисковым методом на микропробирках с дистиллированной водой, 3) методом криоконсервации на криопробирках в 10% водном растворе глицерина.

Штаммы выращивали на чашках Петри диаметром 60 мм на среде сусло-агар, плотностью 2% при температуре 25 °С. Посев осуществляли дисками мицелиальным слоем вниз с краю чашки. Скорость роста грибов оценивали в мм по величине прироста мицелия за сутки [2].

Макро- и микроморфологию колоний изучали стандартными методами при выращивании штаммов на агаризованном сусле. При описании колоний использовали принятую в экспериментальной микологии терминологию [3]. Микроскопию исследуемых штаммов проводили с применением светового микроскопа Axio Scope A1 (Zeiss, Germany).

Биосинтетический потенциал штаммов оценивали качественными методами на основании активностей протеолитических, целлюлозолитических и окислительных ферментов.

Для определения целлюлозолитической активности (ЦА) был использован метод аппликации, основанный на оценке диаметра зон лизиса (в двух взаимно перпендикулярных направлениях), при инкубации мицелиальных дисков на чашки Петри с агаризованной 1% микрокристалической целлюлозой в течение 48 часов при 25 °С; для выявления зон лизиса в чашки Петри добавляли раствор йода (0,5% р-р I в 2% KI) [4].

Проведено исследование желатиназной активности (ЖА) с использованием метода аппликации, который базировался на измерении размера зон разжижения желатина [5]. Мицелиальные диски инкубировали на чашки Петри с застывшим 5% раствором желатина в течение 48 часов при 25 °С. Зоны разжижения желатина замеряли в двух взаимно перпендикулярных направлениях (в миллиметрах), и по их величине судили о наличии протеолитических ферментов.

Активность окислительных ферментов оценивали с помощью спот-теста. Около растущего края колонии вырезали мицелиальные блоки диаметром 7 мм, переносили в лунки микробиологических планшетов и по каплям наносили растворы гваякола (“Sigma”, США) 2 мл/100 мл воды и 0,1% сирингалдазина (“Sigma”, США) в спирте этиловом. Активность оценивали визуально по интенсивности цвета образующегося красно-фиолетового пигмента в результате перекисного окисления реактивов: от “–” – нет активности до “+++” – высокая активность, через 5 мин., 1 и 3 ч. [6]

Исследование проводили в 3-х проворностях. Статистическую обработку данных вели с использованием Microsoft Office Excel.

Исследование скорости роста показало, что все штаммы обладали различной скоростью роста. На рисунке 1 представлено процентное соотношение штаммов по величине суточного прироста мицелия. Было показано, что наибольшее число штаммов (50%) обладали низкой скоростью роста (1 – 3 мм/сут), тогда как всего 9% штаммов показали высокую скорость (более 6 мм/сут) и 41% характеризовались средней скоростью роста (4-6 мм/сут).

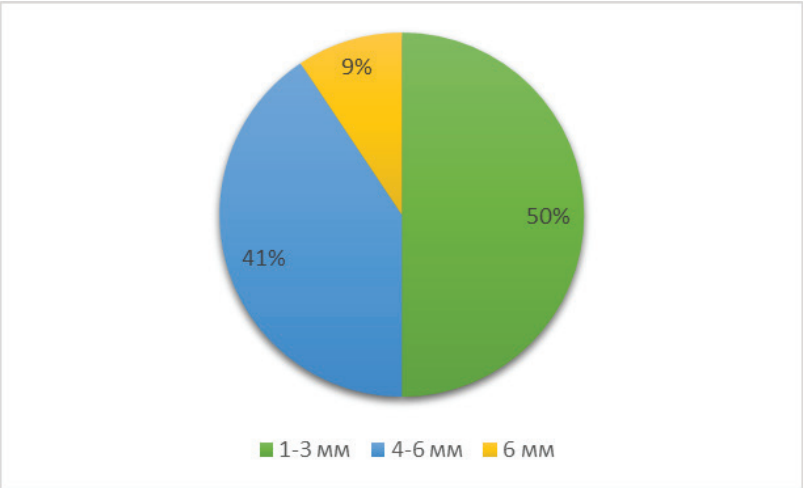


Рисунок 1. Соотношение штаммов (%) по скорости роста

В результате морфологических исследований, все штаммы были охарактеризованы по макро- и микроморфологическим признакам. Выявлены особенности их мицелиальных колоний и микроструктур. Все полученные результаты были задокументированы. Обнаружены различные морфологические особенности гиф исследуемых штаммов, в частности, пряжки, которые хотя и являются характерной особенностью высших базидиомицетов, но встречаются не у всех видов [2].

Результаты изучения целлюлозолитической активности показали, что исследуемые штаммы имели разную степень активности. На рисунке 2 продемонстрировано соотношение штаммов по диаметру зон лизиса микрокристаллической целлюлозы, выраженному в процентах. Было выявлено, что половина исследуемых штаммов обладали средней ЦА (18-25 мм), в тоже время высокой ЦА обладают 31% (более 25 мм), а низкой – 19% (1-17 мм) штаммов. Был обнаружен штамм *Auricularia 92-НВП-20*, не обладающий ЦА.

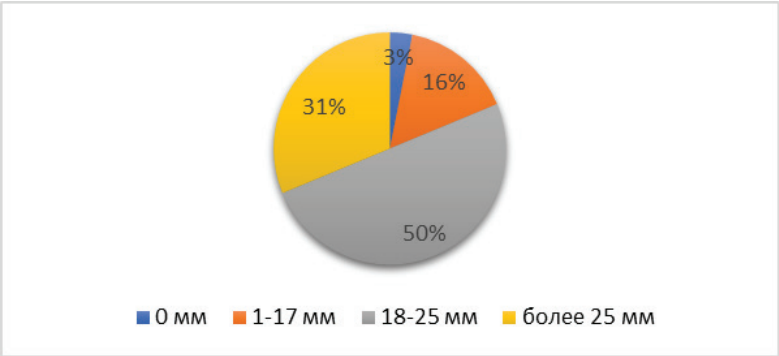


Рисунок 2. Соотношение штаммов по интенсивности ЦА

Результаты изучения желатиназной активности показали, что штаммы обладали различной степенью активности. Были обнаружены штаммы, не обладающие ЖА, которые составляли 16% от общего числа исследуемых штаммов. В тоже время, наиболее активные штаммы составляли 19% (более 29 мм), а штаммы, обладающие средней активностью, 31% (22-29 мм). Тогда как, штаммы с низкой активностью составили 34 % (1-21 мм).

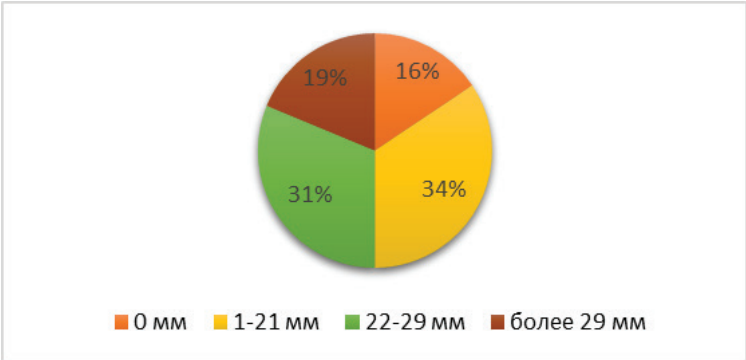


Рисунок 3. Соотношение штаммов по интенсивности ЖА

Результаты изучения оксидоредуктаз показали, что у 5 исследованных штаммов не было обнаружено активности по использованным субстратам, что свидетельствует об их принадлежности к грибам бурой гнили. Остальные штаммы обладали активностью в различной степени.

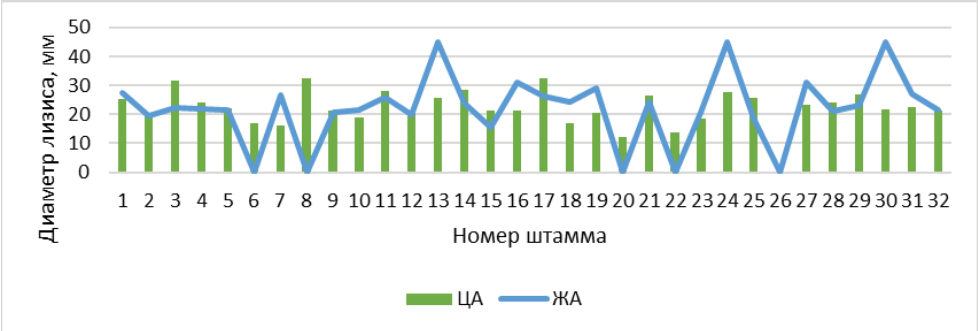


Рисунок 4. Соотношение ЦА и ЖА исследуемых штаммов. На оси абсцисс представлены полевые номера штаммов

На основании результатов скринингового исследования также был сделан вывод о соотношении протеолитических и целлюлозолитических активностей. Результаты отображены на рисунке 4. У штамма *Auricularia sp.* 92-НВП-20 не было выявлено указанных активностей. Однако большинство штаммов обладали как ЦА, так и ЖА. Как видно из рисунка, у большинства штаммов наблюдалась корреляция степени обеих активностей. Однако у 4-х штаммов при отсутствии ЖА была обнаружена ЦА, причем штамм *Trametes sp.* 30-НВП-20 показал одну из самых высоких значений ЦА.

Сравнительный анализ результатов показал, что не наблюдалось прямой зависимости между скоростью роста и ферментативной активностью штаммов. Так, штаммы, обладающие наивысшей скоростью роста, демонстрировали либо средние, либо низкие значения активностей ферментов.

На основании данных результатов были отобраны 6 штаммов, обладавших средней скоростью роста, однако проявивших высокую ферментативную активность. Характеристика ростовой и ферментативной активности этих штаммов представлена на рис. 5. Указанные штаммы будут использованы для дальнейших исследований их таксономической верификации с применением молекулярно-генетических методов, а также изучение их биотехнологического потенциала в условиях глубинного культивирования.

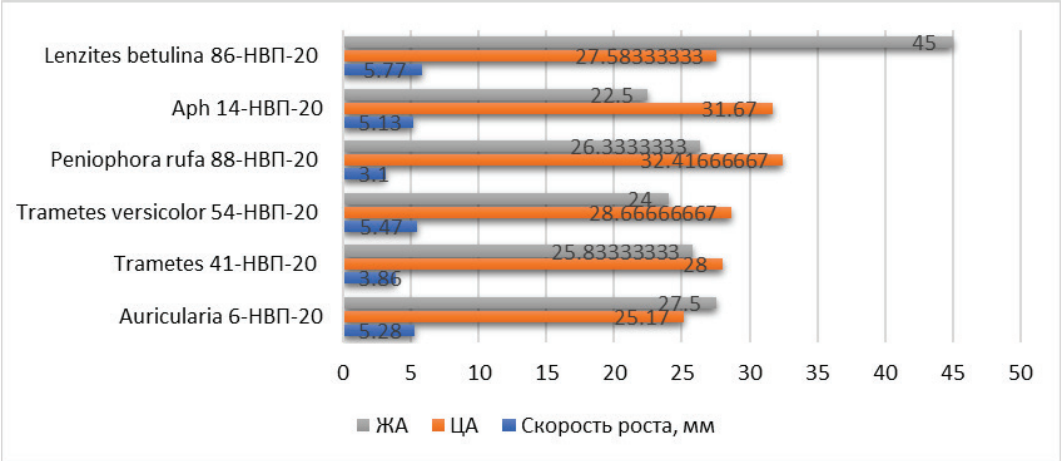


Рисунок 5. Показатели роста и ферментативной активности (ЖА и ЦА) отобранных штаммов

Таким образом, было показано, что некоторые исследуемые штаммы афиллофоровых базидиомицетов Приморского края обладают высоким ростовым и ферментативным потенциалом. На основании данных скрининга отобраны наиболее перспективные штаммы для дальнейшего исследования их биосинтетической активности, в том числе в условиях глубинного культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Псурцева НВ, Белова НВ, Алехина ИА. Биотехнологические, возможности использования коллекционных культур базидиомицетов. Биотехнология. 1994;7:35-39.

2. Дудки ИА. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. Киев: Наук. думка, 1983.

3. Дудка ИА, Вассер СП. и др. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Киев: Наук. думка, 1982.

4. Shakhova N. Revealing new active and biotechnologically perspective producers of oxidative and cellulolytic enzymes among pure cultures of xylotrophic Agaricomycetes from the Southern Non-Chernozem zone of the European part of Russia. Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology). Mushroom Research Foundation. 2020;10(1):113–9. DOI:10.5943/cream/10/1/12.

5. Колкер ТЛ, Псурцева НВ, Сазанова КВ, Власов ДЮ. Биохимические особенности домовых грибов, поддерживаемых в коллекции культур базидиомицетов БИН РАН. Микология и фитопатология. Pleiades Publishing Ltd. 2018;52(6):398–407. DOI:10.1134/s0026364818060041.

6. Фёдорова ТВ, Шахова НВ, Кляйн ОИ, Глазунова ОА, Малошенок ЛГ, Куликова НА, et al. Сравнительный анализ лигнолитического потенциала базидиальных грибов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам. Прикладная биохимия и микробиология. Akademizdatcenter Nauka. 2013;49(6):570–9. DOI:10.7868/s0555109913060081.

SUMMARY

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF SOME APHYLLOPHORIC BASIDIOMYCETES

Yusupova A.A., 4th year student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Screening of strains of aphyllophoroid basidiomycetes was investigated. Morphological, physiological and biochemical properties of macromycetes were studied in dynamic. Characters of growth and development of the studied basidiomycetes were revealed. Data on the biosynthetic potential of strains were obtained based on the study of proteolytic (namely, gelatinase), cellulolytic and oxidoreductase activities.

Key words: *aphyllophoric basidiomycetes, growth rate, enzymatic activity.*

REFERENCES

1. Psurtseva NV, Belova NV, Alekhina IA. Biotechnological, the possibility of using collection cultures of basidiomycetes. Biotechnology. 1994;7:35-39.

2. Dudki IA. Higher edible basidiomycetes in surface and deep culture. Kiev: Nauk. Dumka, 1983.

3. Dudka IA, Wasser SP. et al. Methods of experimental mycology. Handbook. Kiev: Naukova Dumka, 1982.

4. Shakhova N. Revealing new active and biotechnologically perspective producers of oxidative and cellulolytic enzymes among pure cultures of xylotrophic Agaricomycetes from the Southern Non-Chernozem zone of the European part of Russia. Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology). Mushroom Research Foundation. 2020;10(1):113–9. DOI:10.5943/cream/10/1/12.

5. Kolker TL, Psurtseva NV, Sazanova KV, Vlasov DYu. Biochemical characteristics of house fungi maintained in the collection of cultural basidiomycetes of the BIN RAS. Mycology and phytopathology. Pleiades Publishing Ltd. 2018;52(6):398-407. DOI: 10.1134 / s0026364818060041.

6. Fedorova T.V., Shakhova N.V., Klein O.I., Glazunova O.A., Maloshenok L.G., Kulikova N.A. et al. Comparative analysis of lignolytic basidiomycetes belonging to different taxonomic and ecological groups. Applied Biochemistry and Microbiology. Academizdatsentr Science; 2013; 49 (6): 570-9. DOI: 10.7868 / s0555109913060081.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ТАНГЕНЦИАЛЬНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ α-ДЕФЕНСИНОВ КРЫСЫ

Юшина А.Д., асп. 2 года обучения; **Андреева Е.А.**, биотехнолог НОЦ МКТ; **Сарсенова Е.А.**, маг. 2 года обучения
Руководитель: **Янкелевич И.А.**, канд. биол. наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: alena.yushina@pharminnotech.com

Разработана методика выделения α-дефенсинов крыс из экстрактов экссудативных нейтрофилов крыс с помощью метода тангенциальной фильтрации. Выделенная смесь пептидов содержит компоненты с молекулярными массами до 10 кДа, основными компонентом полученной смеси являются α-дефенсины крысы RtNP-3 и RtNP-4.

Ключевые слова: *тангенциальная фильтрация, дефенсины, низкомолекулярные пептдиды, выделение и очистка.*

В настоящее время одними из наиболее важных молекулярных регуляторов систем организма рассматриваются пептидные молекулы. Примером таких молекул являются дефенсины, которые представляют собой молекулярные факторы врожденного иммунитета пептидной природы и обладают полифункциональной активностью. У человека обнаружено 2 вида дефенсинов: α- и β- дефенсины. α-дефенсины обнаруживаются в основном в нейтрофилах и клетках Панета [1]. Актуальным вопросом становится разработка методик, способствующих эффективному синтезу дефенсинов, а также их последующему выделению и очистке с целью получения высокоочищенных фракций для дальнейших исследований их функциональной активности. Особенностью дефенсинов является их малый размер (примерно 3,4 кДа), а также наличие положительного заряда, что следует учитывать при выделении и очистке данных пептидов из растворов. Одним из методов, позволяющим произвести первичную очистку растворов пептидов от высокомолекулярных примесей с сохранением особенностей строения и функционирования, является тангенциальная фильтрация. Данный метод позволяет вести процесс в непрерывном режиме, без блокирования пор мембраны, сохраняя стабильность процесса. В связи с чем целью данной работы является разработка методики выделения и очистки α-дефенсинов крысы с помощью тангенциальной фильтрации.

Объектом исследования служили экстракты из клеточной биомассы индуцированного перитонеального экссудата крыс, 90% клеток которого, составляли нейтрофилы. Для выделения дефенсинов из нейтрофилов была произведена экстракция и гомегенизация на электрогомогенизаторе стекло-тефлон с помощью 10% уксусной кислоты (в соотношении 4 объема уксусной кислоты по сравнению с объемом осадка клеток). После центрифугирования обирали супернатант и называли его «экстракт»[2].Для проведения тангенциальной фильтрации полученный экстракт предварительно разбавляли ультра очищенной водой в 100 раз.

Тангенциальная фильтрация проводилась на установке для тангенциальной фильтрации Sartorius Vivaflow 50R на ячейках с порогом отсечения 10 кДа. Раствор, прошедший через мембрану ячейки называли «фильтрат», раствор не прошедший сквозь мембрану называли «концентрат».

Спектр белков и пептидов во фракциях, полученных во время тангенциальной фильтрации оценивали с помощью метода нативного электрофореза в кислой буферной системе (КЭФ) в присутствии мочевины в слое полиакриамидного геля (ПААГ) [3], а также с помощью денатурирующего электрофореза в щелочной буферной среде (SDS-электрофорез) в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na) [4]. Проверку наличия целевых дефенсинов в растворах (экстракта, фильтрата и концентрата) осуществляли с помощью ESI-MS масс-спектрометрии [5].

На установку тангенциальной фильтрации загружали 100 мл экстракта из нейтрофилов, полученных из перитонеальных экссудатов. В результате получали 80 мл фильтрата, содержащего частицы размером до 10 кДа, а также 20 мл кон-

центрата, оставшегося после прохождения разбавленного экстракта через поры ячейки. Концентрация белка в исходном экстракте (разбавленном в 100 раз) составила 0,251 мг/мл, концентрация белка в пропущенном через ячейку фильтрате составила 0,078 мг/мл, концентрация белка в концентрате составила 0,244 мг/мл. Таким образом, в фильтрат перешло 6,24 мг белка, что составляет 25,86 % от исходного количества белка в экстракте.

На рисунках 1 и 2 представлены результаты электрофоретического анализа исходного экстракта, а также концентрата и фильтрата, полученных в результате тангенциальной фильтрации. С помощью SDS-электрофореза (рис. 1) было показано, что при прохождении раствора экстракта через мембрану с порогом отсечения 10 кДа в фильтрат переходит только низкомолекулярная фракция, содержащая пептиды массой около 3,5 кДа, что соответствует массе целевых α-дефенсинов.

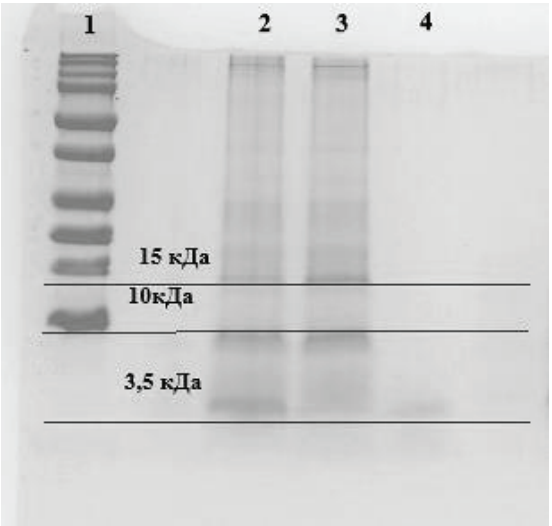


Рисунок 1. Электрофореграмма (SDS-электрофорез) исследуемых белковых растворов
1 –контроль (молекулярные маркеры); 2- исходный экстракт; 3 – концентрат, не прошедший сквозь мембрану ячейки; 4 – фильтрат, прошедший через поры 10 кДа

Для проверки наличия дефенсинов в исследуемых растворах также был проведен нативный электрофорез, результаты которого представлены на рисунке 2. На дорожке геля, содержащей фракцию, прошедшую через ячейки с диаметром пор 10 кДа (фильтрат), наблюдались два характерных доминирующих бенда (отмечены полосами). Следует отметить, что часть низкомолекулярных пептидов, включая пептиды массой около 3,5кДа, задерживается на порах ячейки с порогом отсечения 10 кДа и остается в концентрате, что видно на электрофореграммах (рисунок 1 и 2 соответственно). Таким образом, в фильтратах, полученных методом тангенциальной фильтрации, присутствует, преимущественно, 2 низкомолекулярных (массой около 3,5 кДа) пептида, которые по своим характеристикам соответствуют дефенсинам крысы.

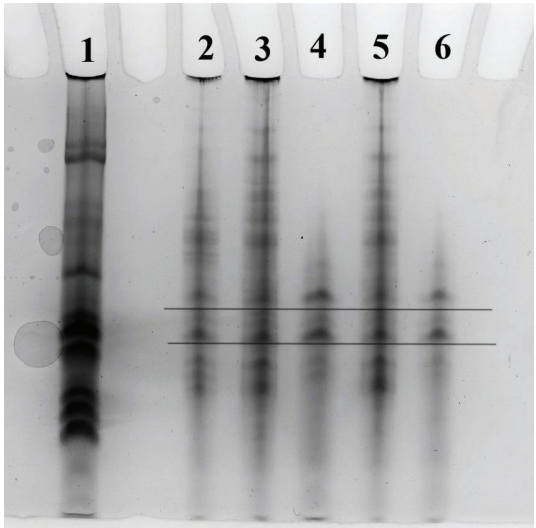


Рисунок 2. Электрофореграмма (КЭФ) исследуемых белковых растворов
1 – раствор сравнения (высокоочищенные дефенсины кролика); 2- исходный экстракт;
3,5 – концентраты, не прошедшие сквозь мембрану ячейки; 4,6 – фильтраты, прошедшие через поры 10 кДа.
Полосами обозначены предполагаемые фракции дефенсинов крысы

Чтобы подтвердить наши выводы, пробы (исходного экстракта, концентрата, а также фильтарта) были проанализированы методом ESI-MS масс-спектрометрии. Данный анализ подтвердил наличие дефенсинов крыс как в исходном

экстракте, так и в полученных фильтратах. При этом при проведении анализа полученного фильтрата, в качестве доминирующих молекулярных компонентов определялись α-дефенсины крысы RtNP-3 и RtNP-4.

Выполнена первичная очистка α-дефенсинов крысы RtNP-3 и RtNP-4 из экссудативных нейтрофилов крыс с помощью метода тангенциальной фильтрации на ячейках с диаметром пор 10 кДа, наличие данных пептидов в полученных фильтратах подтверждено с помощью масс-спектрометрического анализа. При этом, в полученных фильтратах наблюдается высокая степень очистки целевых пептидов от других примесей, что подтверждают данные электрофоретических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Contreras G, Shirdel I, Braun MS, Wink M. Defensins: Transcriptional regulation and function beyond antimicrobial activity. Developmental & Comparative Immunology [Internet]. Elsevier BV; 2020 Mar;104:103556. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2019.103556

2. Янкелевич ИА. Антимикробные белки и пептиды как эндогенные иммуномодуляторы при экспериментальном стрессе : дис. СПб. : дис.… канд. биол. наук, 2014.

3. Panyim S, Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Archives of Biochemistry and Biophysics [Internet]. Elsevier BV. 1969;130:337–46. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(69)90042-3

4. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 1970 Aug;227(5259):680–5. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/227680a0

5. Henderson W, McIndoe JS. Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds. John Wiley & Sons, Ltd; 2005 Feb 11. Available at: http://dx.doi.org/10.1002/0470014318

SUMMARY

METHOD FOR OBTAINING DEFENSINS FROM RAT EXUDATE EXTRACTS USING TANGENTIAL FILTRATION

Yushina A.D., second-year postgraduate student
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University;
14, Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

A method of isolation of rat α-defensins from extracts of rat exudates using the tangential filtration method has been developed. The isolated mixture of peptides contains components with molecular mass up to 10 kDa, the main components of the resulting mixture are rat α-defensins RtNP-3 and RtNP-4.

Keywords: *tangential filtration, defensins, peptides with low molecular weight, isolation and purification.*

REFERENCES

1. Contreras G, Shirdel I, Braun MS, Wink M. Defensins: Transcriptional regulation and function beyond antimicrobial activity. Developmental & Comparative Immunology [Internet]. Elsevier BV; 2020 Mar;104:103556. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2019.103556

2. Yankelevich IA. Antimikrobnye belki i peptidy kak endogennye immunomodulyatory pri eksperimental'nom stresse : dis. Saint Petersburg : dis.… kand. biol. nauk, 2014 (in Russ).

3. Panyim S, Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Archives of Biochemistry and Biophysics [Internet]. Elsevier BV. 1969;130:337–46. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(69)90042-3

4. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 1970 Aug;227(5259):680–5. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/227680a0

5. Henderson W, McIndoe JS. Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds. John Wiley & Sons, Ltd; 2005 Feb 11. Available at: http://dx.doi.org/10.1002/0470014318

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММА *STREPTOMYCES SP. VIZR 18* – ПРОДУЦЕНТА НОВОГО ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОГО БИОПРЕПАРАТА

Воронина Я.А., маг. 1 года обучения
Руководитель**: Котова Н.В**., доцент кафедры биотехнологии, к.х.н.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: yana.voronina@spcpu.ru

Ключевые слова: *вредители, инсектоакарицидное действие, актиномицеты, антагонистическая активность, вторичные метаболиты.*

Специфика почвенно-климатических условий регионов Российской Федерации определяет набор возделываемых культур и видовой состав членистоногих, наносящих им существенный вред.

Существенные различия в биологии вредителей сельскохозяйственных культур, их высокая экологическая пластичность, приводящая к появлению резистентных к пестицидам форм, изменение видового разнообразия вследствие изменений климата и технологий возделывания различных культур, усиление антропогенных воздействий на агроэкосистемы в последние десятилетия и появление агрессивных инвазионных видов, определяли ранее и определяют в настоящее время необходимость постоянного совершенствования химического метода защиты растений.

В связи с этим, актуальной представляется проблема разработки новых экологически безопасных и эффективных биопрепаратов на основе микробных метаболитов с широким спектром инсектоакарицидного действия. Наиболее перспективными в этой связи представляются почвенные микроорганизмы, в частности актиномицеты.

Целью настоящей работы было обосновать использование вторичных метаболитов штамма *Streptomyces sp.* VIZR 18 для создания на их основе нового инсектоакарицидного полифункционального биопрепарата.

Объектом исследования выбран штамм стрептомицета Streptomyces *sp.* VIZR 18, характеризующийся наличием хорошо развитого воздушного мицелия. По данным исследований распространенности и видового разнообразия актиномицетов, среди известных биоактивных микробных вторичных метаболитов подавляющее большинство продуцируются актиномицетами, 70% которых относятся к роду *Streptomyces*.

Биологические инсектициды на основе стрептомицетов зарекомендовали себя, как эффективные средства борьбы с вредными членистоногими. Им присуща специфичность, низкая токсичность, простота культивирования, а также способность к деградации в естественных круговоротах веществ. Разнообразие их химической природы обуславливает низкую степень адаптации к ним вредных насекомых.

Для реализации настоящей научно-исследовательской работы был составлен план исследования. Согласно которому, сначала проводят клонирование штамма *Streptomyces sp.* VIZR 18 и определение антагонистической активности штамма *Streptomyces sp.* VIZR 18 по отношению к грибам (родов *Alternaria* и *Fusarium*) и к бактериям. После чего отбирают колоний с наиболее выраженной антагонистической активностью. Главным этапом исследования является наработка на основе активных клонов лабораторного образца полифункционального препарата и проведение испытания образца препарата по отношению к тле, паутинному и красному плодовому клещу и другим сосущим вредителям сельскохозяйственных культур в лабораторных и полевых условиях.

Таким образом, реализуя цель и данный план исследования, будет получен новый продуцент полифункционального биопрепарата для защиты растений от сосущих вредителей.

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В КОТРОЛЕ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН

Герасимова В.А.[1], магистрант 1 года обучения,
Тумаев А.В.[2], старший химик сектора конъюгации полисахаридов научно-производственного комплекса «Комбинированные вакцины» департамента фармацевтической разработки СПбНИИВС
Руководитель: **Салимова Е.Л.**[2,3], старший преподаватель НОЦ «Иммунобиотехнология», руководитель департамента фармацевтической разработки СПбНИИВС
[1]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»,
634050, г. Томск, ул. Ленина, д. 30, Российская Федерация
[2]Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» Федерального медико-биологического агенства,
198320, г. Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д. 52, Российская Федерация
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: vag32@tpu.ru

Конъюгированные вакцины получили широкое распространение в качестве вакцин для предотвращения инфекционных заболеваний, вызванных такими бактериями, как *Haemophilus influenzae* типа b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*. Заболеваемости подвержены все дети в возрасте до 5 лет, особо тяжелая форма инфекции приходится на возраст 6-12 месяцев. Известно, что полисахаридные вакцины менее иммуногенны, чем полисахаридные вакцины, дополнительно конъюгированные с белками, поскольку они не вызывают Т-независимый иммунный ответ и не эффективны для защиты детей младше двух лет от некоторых инфекционных заболеваний. Конъюгация полисахаридов с белком обеспечивает стимуляцию Т-клеток, которые необходимы для созревания полисахарид-специфичных В-клеток, что приводит к улучшению иммунного ответа на возбудитель. Однако процесс изготовления вакцин на основе конъюгированных полисахаридов с белком сложен и включает в себя много этапов для конъюгации и последующей очистке. Конъюгат представляет собой полисахарид ковалетно связанный с белком. Чтобы получить конъюгированную вакцину, необходимо очищенный полисахарид химически активировать для связывания с модифицированным белком-носителем. После конъюгации очищают конъюгат от несвязанного полисахарида, так как его присутствие будет дестабилизировать полученный продукт и влиять на количество получаемой вакцины

Количественное определение неконъюгированного свободного полисахарида является важным показателем контроля качества и изучения стабильности полисахаридной вакцины. Для количественной оценки свободного полисахарида в конъюгированных вакцинах применяется ряд этапов по подготовке образцов: для осаждения конъюгата, концентрирование и диализ, при ультрафильтрации, а также твердофазная экстракция. Экстрагированные свободные полисахариды гидрализуют перед анализом с помощью колориметрии. Сложная пробоподготовка затрудняет разработку аналитического метода для анализа свободных полисахаридов. Есть ряд требований, которые должны обеспечить точность и воспроизводимось при контроле качества продукта. Для этих целей чаще выбирают системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Так, для определения диапазона значений концентраций свободных полисахаридов в полисахаридных конъюгированных вакцинах, применяют два вида жидкостной хроматографии: эксклюзионная хроматография и обращенно-фазовая жидкостная хроматография.

Эксклюзионная хроматография представляет собой вариант жидкостной хроматографии, в которой разделение происходит за счет распределения молекул между растворителем, находящимся внутри пор сорбента, и растворителем, протекающим между его частицами. Неподвижной фазой служит пористый гель, а различное удерживание веществ обусловлено различием в размерах молекул веществ, их формы и способности проникать в поры неподвижной фазы. Колонки для эксклюзионной хроматографии обеспечивают быструю, надежную, точную и эффективную работу при анализе. Они могут быть легко интегрированы в любой процесс, так как выпускаются в широком диапазоне размеров пор и размерностей, что обеспечивает превосходное разделение в любом случае. Для анализа крупных молекул в эксклюзионной хроматографии применяется многодетекторный блок, который определяет точные молекулярные массы, размер и форму биомолекул, что повышает чувствительность определения. Данный метод не требует отбора проб или проведения гидролиза свободных полисахаридов при контроле полисахаридных конъюгированных вакцин.

Обращенно-фазовая хроматография – вариант ВЭЖХ, в которой подвижная фаза более полярна, чем неподвижная, и удерживание определяется непосредственным контактом молекул сорбата с поверхностью сорбента. По статистики около 80-90 % всех разделений ВЭЖХ проводятся в обращенно-фазовых условиях. Причины этого, простота, универсальность, а также, возможность работы с широким спектром соединений различной полярности и массы. Обращенно-фазовая хроматография используется для анализа полисахаридных вакцин. При жидкостной обращенно-фазовой хроматографии используется колонка с привитой обращенной фазой, которая разделяет свободный полисахарид по размеру, а конъюгат и свободный белок по гидрофобности.

Одна из проблем при использовании колонки ВЭЖХ для отделения свободного полисахарида от конъюгата состоит в том, что колонка может быстро засорятся при инъекции конъюгатов чрезвычайно большой молекулярной массы от 150 до 450 кДа, вызывая скачок давления и повреждение колонки. Эта проблема может быть частично решена путем разбавления пробы или уменьшения объема вводимого конъюгата.

Для иммуногенности конъюгированных полисахаридных вакцин важным параметром является соотношение свободного и связанного полисахарида. Чем выше содержание свободного полисахарида, тем ниже иммуногенность получаемой вакцины, а значит будет не достаточный иммунный ответ в организме ребенка. Поэтому необходимо контролировать этот параметр. Для этого используют системы ВЭЖХ, эксклюзионную и обращенно-фазовую хроматографию, которые обеспечивают простой подход для определения свободного полисахарида в конъюгированных полисахаридных вакцинах. Приведенные подходы демонстрируют хорошую специфичность, чувствительность и точность аналитического метода.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ НАРАБОТКИ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ rAAV ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ А

Двинина Ю.С., маг. 2 года обучения
Руководители: **Перепелкина М.П.,** к.б.н., доцент НОЦ ТРБ[1];
Аббат А.В., руководитель группы наработки вирусных векторов ЗАО «БИОКАД»[2].
[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.14, Российская Федерация
[2] ЗАО «БИОКАД»,
198515, Санкт-Петербург, п. Стрельна, ул. Связи, 34-а, Российская Федерация
E-mail: yuliya.dvinina@spcpu.ru

Ключевые слова: *генная терапия, аденоассоциированный вирусный вектор, гемофилия А, фактор свертываемости крови VIII, транзиентная трансфекция, культура клеток HEK293.*

Гемофилия А – Х-сцепленное, врожденное заболевание, возникающее в результате дефицита белка фактора свёртываемости крови VIII (FVIII). Обычно у больных гемофилией А активность FVIII снижена или отсутствует полностью, что приводит к пожизненным кровотечениям. Заболевание составляет примерно 85% всех случаев гемофилии.

Классические методы лечения гемофилии А предполагают регулярное введение пациентам препаратов, содержащих FVIII. Генная терапия позволит избежать регулярных инъекций, заменив их на однократное введение рекомбинантных вирусных частиц, несущих в себе ген фактора свертываемости крови VIII. В настоящее время широкой популярностью в области разработки генотерапевтических препаратов пользуются рекомбинантные аденоассоциированные вирусные частицы (rAAV). Использование AAV имеет объясняется тем, что вирус не вызывает иммунного ответа в организме человека и не ассоциируется с известными заболеваниями, а также тем, что для полноценной репликации вируса в клетках необходим вирус-помощник.

Цель работы – оптимизировать условия транзиентной трансфекции культуры клеток HEK293 для наработки препаратов rAAV, содержащих ген белка FVIII.

В качестве клеток-продуцентов взята культура клеток HEK293. Пассирование клеток осуществлялось на коммерческой среде известного состава. Для наработки рекомбинантных вирусных частиц применялась трехплазмидная трансфекция. Количество вирусного генома VG/ml определялось постановкой полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR).

Выбор комплексообразующего реагента. Согласно литературным данным наиболее подходящими комплексообразующими реагентами могут быть катионные полимеры PEI Max и PEIpro и катионный липополимер Lipofectamine 3000.

В эксперименте исследовали три комплексообразующих реагента, две нагрузки по ДНК (Нагрузка №1, Нагрузка №2); каждому исследуемому варианту соответствовало две реплики (К1-К12). На рисунке 1 представлены результаты qPCR образцов эксперимента. Разница в значениях VG/ml между двумя репликами находится в пределах погрешности метода qPCR (30 %).

Результаты qPCR доказывают эффективность использования PEI Max в качестве трансфекционного реагента при нагрузке по ДНК №2.

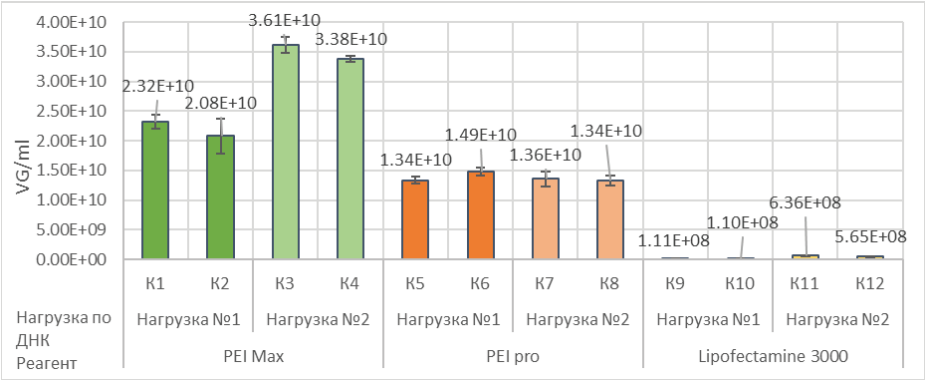


Рисунок 1. Результаты qPCR образцов эксперимента по подбору комплексообразующего реагента

Подбор соотношения ДНК:PEI Max. Постановка эксперимента нацелена на определение соотношения ДНК:PEI, при котором наблюдаются наибольший выход VG/ml по сравнению с контролем.

В эксперименте исследовали четыре соотношения ДНК:PEI в сравнении с контрольным соотношением, две нагрузки по ДНК (Нагрузка №1, Нагрузка №2); каждому исследуемому варианту соответствовало две реплики (К1-К16). Результаты эксперимента представлены на рисунке 2. Разница в выходах VG/ml между двумя репликами находится в пределах погрешности метода qPCR (30 %).

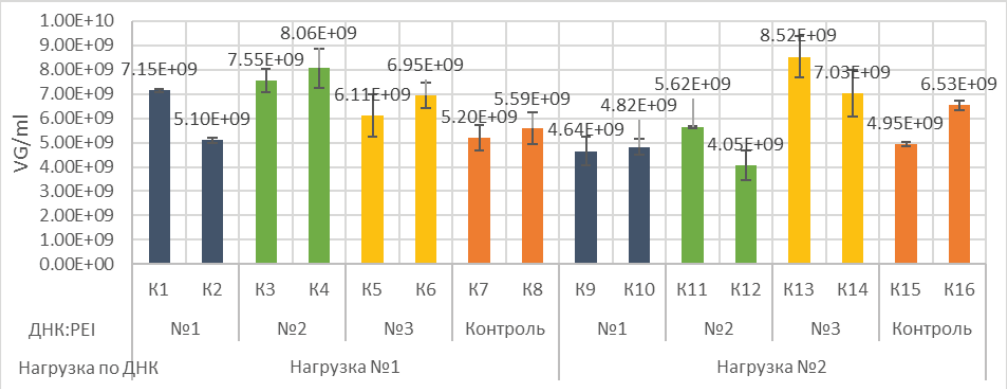


Рисунок 2. Результаты qPCR образцов эксперимента по подбору соотношения ДНК:PEI

По результатам qPCR соотношение ДНК:PEI №2 для нагрузки по ДНК №1 более эффективно по сравнению с контролем, а для нагрузки по ДНК №2 более эффективно соотношение №3

Результаты проведенных экспериментов подтверждают эффективность применения PEI Max в качестве трансфекционного реагента.

Для различных нагрузок по ДНК должно быть подобрано индивидуальное соотношение ДНК:PEI Max.

СТАБИЛИЗИРУЮЩИЙ ОТБОР И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *STREPTOMYCES SP. VIZR 52*

Евстафьева В.С., маг. 1 года обучения
Руководитель: **Колодязная В.А.**, зав. кафедрой биотехнологии, к.б.н., доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.14, Российская Федерация.
E-mail: veronika.evstafeva@spcpu.ru

Ключевые слова: *Streptomyces sp., антагонистическая активность, моноклоны.*

Ежегодно пропадает до 40 % общемирового урожая продовольственных культур из-за вредителей и болезней растений, и это приводит к потерям в торговле сельскохозяйственной продукцией на сумму более 220 млрд. долларов.

Ставя в цель нести благо в общество и обладая навыками и знаниями биотехнологии, можно внести лепту для поиска решений вышеперечисленных проблем. Сокращение потерь и порчи пищевой продукции на любом этапе позволит снизить ресурсные затраты и сократить процент нехватки продовольствия.

Например, наиболее опасные вредители для таких культурных растений, как картофель, баклажаны и томаты – это жуки-листоеды и колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata*). Заселенность кустов пасленовых культур в разные годы может достигать 50-70%, а потери урожая 25-35%.

Несмотря на прогресс в науке, насекомые продолжают наносить весьма большой ущерб сельскому хозяйству. По сей день лидирующее место для борьбы с вредителями занимают пестициды. Чрезмерное их использование оказывает отрицательное влияние на состояние окружающей среды и здоровье людей. Стоит отметить, что колорадский жук обладает высокой резистентностью к инсектицидам.

Особое внимание ученых, занимающихся данной проблемой, уделяется энтомопатогенным и энтомотоксичным актиномицетам, в особенности стрептомицетам. *Streptomyces* – род грамотрицательных бактерий, который растет в различных средах, а его форма напоминает нитевидные грибы. Полезными свойствами *Streptomyces* для сельского хозяйства является фунгицидные, бактерицидные и инсектицидные свойства. Например, на основе *Streptomyces sp.* создан ряд биопрепаратов, такие как: Актинин, Акарин, Вертимек и др. Увеличение сведений о биологической активности и других характеристиках актиномицетов дает возможность их широкого использования.

Актуальность: получение безопасных и эффективных средств для борьбы с насекомыми-вредителями, в особенности с колорадским жуком, на сегодняшний день является актуальной проблемой.

Цель исследований: выявление и отбор колоний штамма *Streptomyces sp. VIZR 52* со стабильной инсектицидной активностью к колорадскому жуку.

Задачи исследования:

1. Изучение характеристик и морфологических особенностей штамма *Streptomyces sp. VIZR 52*;
2. Выбор методов посева и питательных сред для благоприятного роста микроорганизмов;
3. Осуществление подготовки питательных сред, материалов и оборудования;
4. Получение моноклонов *Streptomyces sp. VIZR 52*;
5. Тестирование проявления антагонистической активности по отношению к различным видам фитопатогенных грибов и бактерий;
6. Отбор моноклонов с наиболее выраженной антагонистической активностью;
7. Получение культуральной жидкости с активными веществами, продуцирующими моноклонами *Streptomyces sp. VIZR 52*;
8. Оценка влияния полученной культуральной жидкости по отношению к колорадскому жуку.

Осуществляя данные задачи исследования, предполагается получить биопрепарат со стабильной инсектицидной активностью для борьбы с колорадским жуком.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК ВИРУСА SARS-COV-2 В МАЗКАХ ИЗ НОСОГЛОТКИ И РОТОГЛОТКИ

Курочкина А.С.[1,2], студ. 6 курса

Руководители: **Аронова Е.Б.**[1], к.т.н., доцент; **Большаков В.Н.**[2], к.б.н., руководитель отдела молекулярной диагностики

[1]Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29, Российская Федерация

[2]ГК «Алкор Био»,
192148, Санкт-Петербург Железнодорожный пр., д. 40а, Российская Федерация

E-mail: kurochkina.as@edu.spbstu.ru

Ключевые слова: *ПЦР в реальном времени, коронавирусная инфекция, ПЦР-диагностика, SARS-CoV-2, молекулярная диагностика, экстракция РНК.*

В настоящее время на территории России для диагностики инфекционных заболеваний широко используется метод ПЦР. Молекулярная диагностика, в частности ПЦР, основана на определении наличия в исследуемом образце нуклеиновых кислот, чаще всего ДНК. Однако, в связи с возникновением новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, появилась необходимость в определении вирусной РНК в клинических образцах. С этой целью в данной работе была усовершенствована смесь для проведения ПЦР в реальном времени путём добавления дополнительного фермента – ревертазы.

Одним из основных этапов проведения молекулярно-генетических исследований, основанных на методе ПЦР, является выделение РНК. От выбранного метода выделения зависит чувствительность анализа и как следствие достоверность получаемых результатов. На данный момент наиболее востребованными в клинической практике методами экстракции РНК являются: сорбционный метод и метод на основе спиртового осаждения. В данной работе выделение вирусной РНК проводилось из клинических образцов при помощи набора для выделения нуклеиновых кислот «ПРЕП-НК-Био».

Для постановки ПЦР использовали: ПЦР-буфер, смесь 4-х дезоксинуклеозидтрифосфатов, 4 пары олигонуклеотидных специфических праймеров и зондов, фермент ревертазу для создания двухцепочечной ДНК на базе одноцепочечной РНК, фермент Taq–полимеразу для копирования полученной ДНК. Пробы, прошедшие предварительное выделение, вносили в приготовленную ПЦР-смесь и осуществляли постановку ПЦР на амплификаторе Bio-Rad CFX. Результаты представлены на рисунке 1.

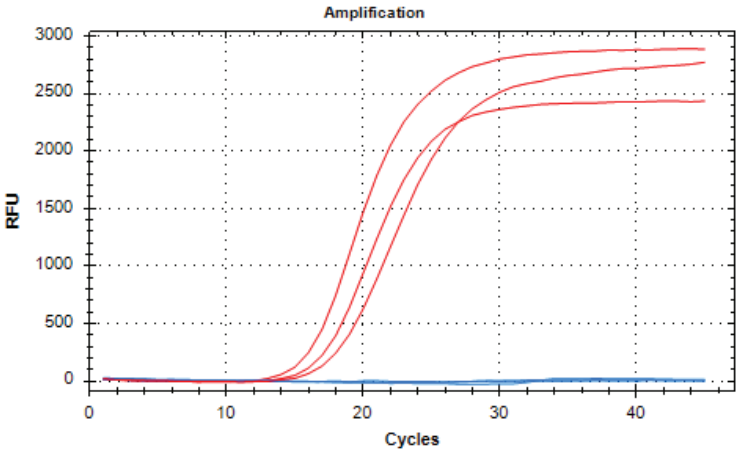


Рисунок 1. Кривая амплификации мазка, положительного на коронавирус (красный цвет) и мазка, отрицательного на коронавирус (синий цвет)

Преимущество постановки ПЦР в реальном времени заключается в отсутствии необходимости постановки электрофореза для определения содержания вирусной РНК в пробе. На данный момент при использовании усовершенствованной ПЦР-смеси на базе ООО «Алкор Био» была проведена ковид-диагностика свыше 3500 пациентов.

Была разработана модифицированная ПЦР-смесь для осуществления диагностики коронавирусной инфекции в мазках из ротоглотки и носоглотки пациентов. ПЦР-смесь показывает высокую точность и эффективность определения вирусной РНК, что подтверждается в присутствии положительного контрольного образца и контроля экстракции при постановке ПЦР. Данная смесь может успешно использоваться в клинической практике.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО

Некрасова Д.А., студ. 5 курса
Руководители: **Повыдыш М.Н.**, д.б.н., канд. фарм. н., доцент каф. фармакогнозии; **Пивоварова Н.С.**, канд.фарм.н., старший преподаватель каф. промышленной технологии лекарственных препаратов
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д.14, Российская Федерация
E-mail: nekrasovadasha22@mail.ru

Ключевые слова: *микроклональное размножение, растения in vitro, цикорий обыкновенный, лекарственное растениеводство, фитогормоны.*

Высокая востребованность лекарственных препаратов растительного происхождения ставит вопрос об изыскании устойчивой сырьевой базы, одним из способов создания которой может являться микроклональное размножение лекарственных растений.

Микроклональное размножение – это вегетативное размножение растений в условиях *in vitro*.

Данная технология включает в себя несколько последовательных стадий:

1. отбор эксплантов или семян, их стерилизация, подбор и оптимизация состава питательной среды, обеспечивающей наилучший рост и развитие растений;
2. мультипликация – увеличения количества побегов на питательной среде;
3. укоренение микропобегов в стерильных условиях;

Целью нашей работы являлось изыскание эффективного пути микроклонального размножения цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.).

Цикорий обыкновенный – многолетнее травянистое растение из семейства *Asteraceae*. В качестве сырья используются корни и трава растения. Цикорий используется в медицине для коррекции метаболических расстройств, в народной медицине разных стран настои цикория используются для лечения диареи, в качестве желчегонного и гиполипидемического средства. Также экстракты и сырье цикория входят в состав продуктов функционального питания.

Введение цикория в культуру *in vitro* осуществляли с помощью семян.

Семена предварительно стерилизовали в растворах «Белизна» (гипохлорит натрия – 5%, гидроксид натрия – менее 5%) и «Триосептол» (алкилдиметилбензиламмония хлорид – 0,075%; дидецилдиметиламмония хлорид – 0,025%, изопропанол – 40%, н-пропанол – 35%) в течение 5, 10 и 15 минут. В случае применения первого стерилизатора,

оптимальным временем выдерживания было 5 минут, поскольку оно обеспечивало стерильность семян и всхожесть на уровне 75%. При применении «Триосептола» в качестве стерилизатора, стерильность семян достигалась при времени экспозиции 10 и 15 минут, однако семена не были способны к воспроизведению растения, именно поэтому в дальнейшем использовали «Белизну». Далее семена дважды промывали в стерильной воде очищенной и высаживали на среду Мурасиге-Скуга.

Семена культивировали в течение двух недель, полученные растения черенковали и пересаживали на среды Мурасиге-Скуга с добавлением и без добавления фитогормонов.

Среда без добавления фитогормонов обеспечивала стабильный рост и развитие растений, происходило формирование единого стебля с развитыми листьями.

На основании литературных данных в качестве фитогормона был выбран 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрации 0,1 мг/л. Гормон относится к цитокинином и в оптимальных концентрациях стимулирует рост и развитие растений. Пересаженные на данную среду части растений давали каллус, из которого формировались многочисленные побеги, количество которых достигало 8-10 штук на одно растение.

Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о том, что добавление фитогормонов в среду для культивирования цикория обыкновенного увеличивает количество получаемых микроклонов и может использоваться наряду с классическими методами культивирования.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТРЁХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР

Палагина М.А., студ. 2 курса
Руководитель: **Андреева Е.А.**, биотехнолог, научно-образовательный центр молекулярных и клеточных технологий
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: mariya.palagina@spcpu.ru

Обзор существующих методов получения трёхмерных клеточных культур (сфероидов).
Ключевые слова: *трёхмерные клеточные культуры, сфероиды, органоиды.*

Скрининг с высокой пропускной способностью – ключевой этап в разработке лекарственных средств. Для оценки цитотоксического действия потенциальных терапевтических молекул *in vitro* используют двумерные культуры клеток. Однако, всё большую популярность приобретают трёхмерные клеточные модели (органоиды и сфероиды).

Применение трёхмерных культур имеет ряд достоинств по сравнению с двухмерными культурами.

Таблица – Основные преимущества и недостатки 2D- и 3D-моделей

Показатель	Двухмерные	Трехмерные
Морфология	Плоские и растянутые в монослое	Естественная форма в сфероидных или агрегатных структурах
Пролиферация	Пролиферируют быстрее, чем *in vivo*	Могут пролиферировать быстрее или медленнее в сравнении с 2D-моделями в зависимости от типа клеток или типа 3D-модели
Воздействие среды или препарата	Клетки в монослое одинаково подвержены воздействию питательных веществ или факторов роста, или препаратов, которые распределены в среде роста	Питательные вещества и факторы роста или препараты не могут полностью проникать в сфероид
Стадия клеточного цикла	Наиболее вероятно, что клетки будут находиться на одной и той же стадии клеточного цикла из-за того, что в равной степени подвергаются воздействию среды	Сфероиды содержат пролиферирующие, покоящиеся, гипоксические и некротические клетки
Ген или белок экспрессии	Проявляют различные уровни экспрессии по сравнению с моделями *in vivo*	Демонстрируют профили, аналогичные в тканях *in vivo*
Устойчивость к препарату	Чувствительны	Более устойчивы
Стоимость	Умеренная	Высокая

Кроме того, выделяют промежуточные 2.5D клеточные культуры, которые выращивают на верхнем слое внеклеточного матрикса (ВКМ). Однако, такие культуры не имеют достаточного контакта с ВКМ, поэтому не являются совершенными клеточными моделями.

Выделяют следующие трёхмерные клеточные модели: органоиды и сфероиды. Несмотря на общность этих терминов, они существенным образом отличаются друг от друга. Под органоидами понимают кластеры органоспецифичных

клеток, которые представляют собой уменьшенные версии родительских органов. Задача исследователя при создании данных клеточных моделей – подобрать специфичные условия, чтобы поддержать самоорганизацию клеток.

Сфероиды образуются из опухолевых клеток путем естественной самосборки, имеют близкую морфологию с опухолями и схожие особенности метаболизма (эффект Варбурга).

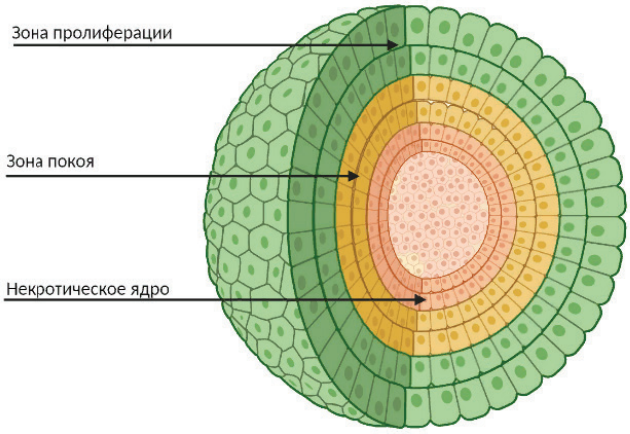


Рисунок. Схематическое изображение клеточного сфероида

Классификация техник создания трехмерных клеточных структур основана на использовании скаффолда (клеточной матрицы).

Распространенными методами получения трёхмерных клеточных моделей без использования скаффолда являются метод «висячей капли», метод с использованием низкоадгезивных планшетов, метод с использованием роллерной колбы. Кроме того, биофабрикацию сфероидов осуществляют с применением акустических или магнитных полей.

В 1925 году А.А. Максимов предложил метод «висячей капли» для клеточных культур. Усовершенствование этого метода позволило его применять для создания сфероидов. В некоторых случаях его применение предпочтительнее, чем использование других методов. Стоит отметить трудозатратность внесения клеточной суспензии в лунки планшетов, поэтому была разработана система накопления капель на основе давления (a pressure-assisted network for droplet accumulation (PANDA) system), которая ускоряет производство сфероидов методом «висячей капли». Существует проблема стандартизации сфероидов, полученных данным методом, из-за образования саттелитов (небольших округлых скоплений клеток, располагающиеся рядом со сфероидом).

Использование планшетов с низкоадгезивной поверхностью дает исследователям возможность автоматизации процесса. Привлекает удобство замены питательной среды и внесения тестируемых соединений. Существенным недостатком является стоимость планшетов.

Метод с использованием роллерной колбы основан на предотвращении осаждения клеток и стимулировании их столкновений путем постоянного перемешивания. В этом методе необходимо использовать клеточные линии, способные выдержать высокое напряжение сдвига. Отмечают высокий выход готовых сфероидов и возможность стандартизации условий культивирования.

В методах с использованием скаффолда производят посев клеток на бесклеточный 3D-матрикс или диспергирование клеток в жидком матриксе с последующим отверждением или полимеризацией. В качестве полимеров используют коллаген, желатин, Са-альгинатный сополимер, децеллюляризованную растительную ткань, бактериальную целлюлозу, хитин, хитозан.

Для биофабрикации сфероидов культуры клеток Hep G2 был выбран метод с использованием низкоадгезивных планшетов ввиду его простоты, быстроты и возможности получения из раза в раз сфероидов единого размера и формы.

Произведен обзор современных методов получения трехмерных клеточных культур. 3D-культуры являются более совершенными клеточными моделями по сравнению с 2D- и 2.5D-моделями из-за особенностей строения данных культур. Классификация трехмерных клеточных культур основана на различие биоматериалов (органоиды, сфероиды) и использование скаффолдов. На практике 3D-культуры используют при оценке фармакологической эффективности соединений и изучении нормальных и патологических состояний организма. Применение трехмерных клеточных культур в экспериментальной биологии и медицине. отвечает биоэтической концепции «трех R» Рассела и Берча: замена (replacement), уменьшение (reduction), повышение качества (refinement). В результате изучения литературы было принято решение использовать низкоадгезивные планшеты в дальнейшей экспериментальной части работы.

РОЛЬ ГЕНОВ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ ШИЗОФРЕНИИ. ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

Панченко А.А., студ. 4 курса
Руководитель: **Кириллова Н.В.**, доктор биологических наук, заведующий кафедрой биохимии, профессор;
Колодязная В.А., кандидат биологических наук, заведующий кафедрой биотехнологии, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: panchenko.andrej@pharminnotech.com

Ключевые слова: *шизофрения, полиморфизм, дофаминовые рецепторы, полиморфизмы генов дофаминовых рецепторов.*

Популяционная частота шизофрении невелика и составляет около 1%, однако заболевание входит в число 25 лидирующих заболеваний в мире по уровню инвалидизации и имеет значительные медицинские, социальные и экономические последствия.

Считается, что генетический риск таких заболеваний может быть связан с генетическим полиморфизмом – наличием в геноме многообразных вариантов структуры генов. Если частота встречаемости полиморфизма повышена среди больных по сравнению со здоровыми, то такой полиморфизм считают генетическим маркером риска, а если частота встречаемости, напротив, снижена у пациентов, то такие полиморфизмы считают условно протективными генетическими маркерами.

Генетические исследования шизофрении в основном фокусируются на дофаминергической нейромедиаторной системе и, в частности, на полиморфизмах гена DRD2 рецептора. В структуре гена DRD2 человека имеется значительное количество полиморфных локусов, среди которых наиболее изученными являются: DRD2 Taq1A (rs1800497), DRD2-141C Ins/Del (rs1799732) и rs1801028.

На основании исследований, проводившихся на базе СПБ ГУЗ «Городской психиатрической больницы №1 им. П.П.Кащенко» г. Санкт-Петербурга и 4 метанализов зарубежных ученых можно предположить, что локус rs1801028 может быть связан с развитием шизофрении, поскольку во всех указанных исследованиях есть положительная тенденция. Относительно полиморфизмов rs1799732 и rs1800497 было показано что они проявляют «протективный эффект» в отношении развития болезни, однако, на основании полученных данных, было высказано предположение, что SNP rs1800497 может увеличивать риск шизофрении у европеоидов. Был также изучен SNP rs6277, который может быть защитным фактором предрасположенности к шизофрении у европеоидов.

Следовательно, можно сделать вывод, что существует определённая связь между полиморфизмами генов рецепторов дофамина и риском развития шизофрении.

РЕГУЛЯЦИЯ СОСТОЯНИЯ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ (ОМОЛОЖЕНИЕ, ОЧИЩЕНИЕ) С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННОЙ БИОТЫ

Подойницына А.А., студ. 3 курса, **Сальманова А.И.**, студ. 3 курса
Руководитель: **Арсениев Н.А.**, канд. биол. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: arina.podojnicyna@spcpu.ru

Ключевые слова: *омоложение, очищение, ревитализация, теломераза, фибробласты, пролиферация.*

Клеточное старение влияет на риск возникновения возрастных заболеваний. Современные исследования направлены на регуляцию процесса очищения организма от омертвевших клеток.

Механизм старения связан с тем, что иммунная система не успевает очищать организм от старых клеток, вследствие чего накапливаются вещества, например, активные кислородные радикалы, вызывающие окисление в тканях и органах. Уже известно, что применение пищевых антиоксидантов на животных оказывает положительную динамику в процессе омоложения.

С возрастом происходит потеря активных клеток фибробластического ряда, чтобы уменьшить этот процесс следует простимулировать заполнение пустот клеток с помощью экзогенных механизмов. Так, например, разработана мазь на основе механоактивированного биологического материала плацентарного происхождения, индуцирующая механизм эндогенной ревитализации в кожных покровах.

Одним из интересных направлений исследований, оказалась, возможная терапия возраст-зависимых заболеваний комбинацией одобренных к клиническому использованию ингибиторов ROCK (фасудила или рипасудила) с ингиби-

торами 5-LOX (зилеутон). Эти вещества вызывают пролифирацию клеток и омоложение стволовых клеток, а, следовательно, восполнение пула клеток.

Исследования с использованием спонтанно трансформированных клеток китайского хомячка (ТККХ), полученные из подкожной соединительной ткани, показали возможность удаления старых клеток из организма, заменяя их на ранее выделенные жизнеспособные клетки и прокультивированные в искусственных условиях, с внедрением гена теломеразы, чтобы они приобрели способность к неограниченному числу делений.

Процесс омоложения наблюдается в отдельных популяциях клеток и включает скоординированную многоступенчатую сеть каскадов трансдукции с внеклеточной передачей сигналов и межклеточной коммуникацией для передачи внутриклеточных путей. Это обеспечивает определенный тканевый гомеостаз за счет регенеративного потенциала и обновления при тканеспецифических требованиях к восстановлению в дополнение к остаточным стволовым клеткам, которые могут различаться для разных органов и видов, что увеличивает продолжительность их жизни.

В 2014 году Гарвардские биологи, используя гетерохронический парабиоз (ГП), выявили ростовой фактор дифференцировки 11 (grow differentiation factor 11, или GDF 11). GDF11 обладает всеми необходимыми характеристиками: он синтезируется в организме, обращает старение вспять в большинстве тканей и его уровень снижается с возрастом.

Запатентован предлагаемый способ омоложения, внутривенное введение нового бактериального коллагенолитического агента для замены старого коллагена на молодой, более проницаемый коллаген во всем организме с восстановлением молодого состояния клеток.

На данный момент изучается вопрос о влиянии повышенного окислительного стресса, связанный с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) стареющих мышей, вызывающей дисфункцию.

Для омоложения организма необходимо постоянное образование стволовых клеток, но с возрастом эта функция угасает. Синъи Яманаки проводил эксперементы по получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из фибробластов взрослого организма с использованием всего лишь четырех транскрипционных факторов, за что был удостоен нобелевской премии по физиологии и медицине в 2012 году совместно с Джоном Гёрдоном.

Старение влияет на ряд процессов в клетках мозга, связанные с функцией нейронов, включая когнитивные способности, сенсорные системы, синаптическую пластичность и регуляцию кальция. После проведённых исследований на мышах можно было сделать вывод, что старение не приводит к параллельному линейному нарушению регуляции всех систем, а вместо этого влияет на некоторые процессы раньше и сильнее, чем на другие.

Исследования в области регуляции состояния кожных покровов (омоложения, очищения) с применением генно-модифицированной биоты представляются как перспективные прикладные исследования.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЭКЗОСОМ ДЛЯ ЗАДАЧ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ РНК

Пурвиньш Л.В.[1,2], мл. науч. сотр., **Горшков А.В.**[2], **Бродская А.В.**[1,2], **Елпаева Е.А.**[2], **Гаврилова Н.В.**[1]
Руководитель: **Васин А.В.**, докт. биол. наук, проф.
[1] Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29, Российская Федерация
[2] НИИ Гриппа им. А.А. Смородинцева
197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17, Российская Федерация
E-mail: ladapurvinsh13@gmail.com

Ключевые слова: *экзосомы, ультрацентрифугирование, гель-фильтрация, РНК, липофектамин.*

Экзосомы представляют собой группу мембранных внеклеточных везикул диаметром 40-100 нм, секретируемые клетками во внеклеточное пространство. Экзосомы являются ключевым средством передачи молекулярных сигналов между клетками. С их помощью происходит перенос широкого спектра биологически активных молекул, включая липиды, белки, мРНК и микроРНК. Перенос этих молекул клеткам-реципиентам регулирует их функции в норме и вносит вклад в патогенез множества заболеваний.

Так как экзосомы широко представлены в различных биологических жидкостях и имеют уникальный молекулярный состав, отражающий функциональное состояние клетки на момент секреции, они являются перспективным объектом для ранней диагностики заболеваний, определения прогрессии и эффективности лечения, в частности для диагностики онкологических заболеваний. Устойчивость экзосом в жестких условиях, их небольшие размеры и нетоксичность для организма позволяет рассматривать их в качестве перспективной системы доставки терапевтических препаратов, в том числе новейших инструментов генной терапии.

Для практической реализации этих возможностей необходимы полностью воспроизводимые, стандартизованные протоколы получения высокоочищенных препаратов экзосом из различных биологических жидкостей и культуральной среды, известных своим сложным гетерогенным составом.

В настоящей работе мы сравнили три разных способа выделения клеточных экзосом из культуральной среды: ультрацентрифугирование, гель-фильтрацию и осаждение коммерческим реагентом Total Exosome Isolation Reagent. Для

анализа полученных результатов применялись подходы: электронная микроскопия, динамическое светорассеяние и вестерн-блоттинг с антителом против аннексина А2. По совокупности полученных результатов, оптимальным подходом для выделения клеточных экзосом является гель-фильтрация с предварительным концентрированием культуральной среды тангенциальной потоковой фильтрацией. Данный подход обеспечивает более высокую чистоту препаратов и позволяет получать на выходе достаточное количество экзосом для дальнейшего их анализа и практического использования.

Эксперименты по включению в полученные клеточные экзосомы РНК показали эффективность использования липофектамина для данных целей. Методом ПЦР в режиме реального времени было показано, что таким способом в экзосомы можно загрузить как длинную самоамплифицирующуюся РНК (саРНК-10kb), так и короткую мРНК.

Кроме того, было показано, что РНК, заключенная в экзосомы, достаточно стабильна даже при хранении препаратов на +4 °С. Таким образом экзосомы в перспективе могут служить хорошим средством доставки нуклеиновых кислот, защищая их от деградации.

Исследование поддержано Российским Научным Фондом, грант 20-15-00228.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕРАПИИ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ПРИЧИНЫ НЕЭФФЕКТИВНОСТИ, ВОЗМОЖНЫЕ РИСКИ И ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ (ОБЗОР)

Угольцова В.Н., аспирант 3 года обучения
Руководитель: **Шакирова Д.Х.**, доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой фармации
Казанский (Приволжский) федеральный университет
420008 г. Казань, ул. Кремлевская, д.18., Россия
E-mail: Veronika.Ugolcova@gmail.com

Ключевые слова: *генно-инженерные биологические препараты, ревматические заболевания, иммунобиологические препараты, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит.*

Прогресс в терапии аутоиммунных ревматических заболеваний связан, в первую очередь, с применением достижений биотехнологии – внедрения новых высокоэффективных препаратов, полученных методом генной инженерии. Ежегодно растет потребность в генно-инженерных препаратах (ГИБП), ввиду растущих показателей заболеваемости, а также увеличения резистентности к базисной терапии. Однако, несмотря на эффективность и высокую специфичность ГИБП имеют достаточно ограниченные возможности применения.

Применение ГИБП ограничивается дефицитом бюджетных средств. Целевые программы, финансируемые государством, не могут полностью удовлетворить ежегодно растущий спрос на данный вид ЛП.

Наиболее часто возникающая при терапии ГИБП у пациентов ревматологического профиля – иммуногенность. Несмотря на высокую клиническую эффективность, примерно у 20-40% пациентов не удается достичь ремиссии, как основного ожидаемого эффекта. У данной группы пациентов отмечается как первичная неэффективность, когда не достигается улучшения при приеме ГИБП, так и вторичная или приобретенная резистентность, когда эффективность терапии снижается.

Не менее актуальной проблемой, ограничивающей применение ГИБП, является риск развития коморбидных инфекций (КИ). Больные РЗ в два раза чаще подвержены к развитию инфекционных заболеваний по сравнению с общей популяцией, что может быть связано с нейтропенией, в большинстве случаев обусловленной использованием ГИБП. В клинической практике накоплен опыт выявления случаев оппортунистических КИ различной этиологии и локализации, активации латентного туберкулеза и других тяжелых инфекций как: пневмония, сепсис, кандидозы, поражение мягких тканей, бактериальный артрит и др. При этом необходимо отметить патологию почек, которая выявляется у 8–15% больных РА и в результате проводимого лечения может нарастать.

Применение ГИБП обозначило новую эру в подходах к лечению пациентов с РА, АС и ПсА и, несмотря на имеющиеся недостатки, они остаются одними из самых эффективных и направленных ЛС в терапии РЗ. С целью повышения эффективности и улучшения профиля безопасности таргетной терапии с использованием ГИБП, во-первых, необходимо проводить научно-исследовательские работы в части снижения антигенных свойств данных ЛС. Во вторых, актуальным направлением исследовательских работ является изучение предикторов эффективности терапии РА, АС и ПсА, которые позволят усовершенствовать персонифицированную терапию РЗ.

ПРОЕКТИРОВАНИЕ ПРОИЗВОДСТВА СУБСТАНЦИИ ИМБРИЦИНА

Филиппов Д.А., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Колодязная В.А.**, к.б.н., доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197022, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: denis.filippov0@gmail.com

Ключевые слова: *имбрицин, антибиотики немедицинского назначения, биоцидные средства, проектирование, неполеновый макролидный антибиотик.*

Имбрицин – это неполиеновый макролидный противогрибковый антибиотик, выделяемый из мицелия актиномицета – *Streptomyces imbricatus*. Имбрицин обладает высокой фунгицидной активностью, широким спектром действия, а также высокой стабильностью и низкой летучестью.

Производство имбрицина включает в себя получение инокулюма, получение посевного материала, получение культуральной жидкости и сбор культуральной жидкости в специальные емкости для хранения. Так как имбрицин не требуется выделять, а в природе он полностью разлагается, что является основным требованием к антибиотикам для растений, то при проектировании производства можно исключить стадию выделения и очистки. Это позволит уменьшить продолжительность получения продукта, тем самым ускорив его выход на рынок, а также снизить экономические расходы без влияния на качество конечного продукта.

Расчеты получения имбрицина производились с учетом особенностей культивирования *Streptomyces imbricatus*. В качестве состава питательных сред и условий культивирования для каждой стадии выращивания были приняты данные, представленные в таблице 1 и в таблице 2 соответственно. Данный состав питательных сред и представленные условия культивирования обеспечивают максимальный выход на каждой стадии производства имбрицина.

Так как целью работы является демонстрация возможности реализации подобного производства, то в качестве посевного биореактора и биореактора для культивирования были приняты биореакторы объемом 1,25 $м^3$ и 10 $м^3$, которые могут обеспечить выход в 7224,59 кг культуральной жидкости с активностью продукта $10{,}04*10^6$ Ед.

Таблица 1 – Состав и содержание питательных сред в зависимости от стадии

№	Название компонента	Процентное содержание компонента в среде от стадии, %		
		Получение инокулюма	*Получение посевного материала*	*Культивирование*
1	Глюкоза	0,96	1,92	4,76
2	Соевая мука	0,96	1,92	1,90
3	Кукурузная мука	–	–	3,81
4	Пропинол	–	0,03	0,02
5	Мел	0,10	0,03	0,10
6	NaCl	0,48	–	–

Таблица 2 – Условия культивирования в зависимости от стадии

№	Название условия	*Получение инокулюма*	*Получение посевного материала*	*Культивирование*
1	Температура (^{0}C)	27-29	27-29	27-29
2	pH	6,8-7,1	6,7-6,8	6,2-66
3	Аэрация ($мин^{-1}$)	–	0,9-1,0	0,5
4	Продолжительность (ч)	48-54	48-56	96-120

Были подобраны составы питательных сред и оптимальные условия культивирования, обеспечивающие высокий выход продукта. Кроме всего прочего, были произведены расчеты, на основании которых можно спроектировать производство имбрицина, а также произвести масштабирование технологии получения имбрицина.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ ОТХОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Фитова В.Д., студ. 3 курса
Руководители: **Богданова О.Ю.**, канд. биол. наук, доц.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: veronika.fitova@spcpu.ru

Ключевые слова: *отходы, микробиологическое производство, микроорганизмы, бациллы, стафилококки, микрококки*

Для определения перспективных направлений использования отходов микробиологического производства была поставлена цель изучения количественного и качественного состава микроорганизмов в пробах отходов, полученных от микробиологических и биотехнологических производств.

Объектами исследования были две пробы отходов микробиологического производства, которые после отбора отправляли на анализ и хранили в холодильнике при температуре 4 °С. В работе для определения общего микробного числа использовали методы глубинного посева на чашки Петри на две питательные среды – мясо-пептонный агар для культивирования бактерий и Сабуро для выделения грибов. Для проведения анализа готовили последовательные разведения (по 10 для каждой пробы).

Пробу растирали в ступке пестиком и заливали 9 см^3 воды, тем самым получали первое разведение, из которого отбирали пипеткой 1 см^3 и переносили в пробирку с 9 см^3 и в следующую чашку Петри. Таким же образом высевали все разведения. Далее в чашки Петри с 1 см^3 разведений заливали расплавленным и остуженным до 45 °С мясо-пептонным агаром и параллельную серию посевов – агаром Сабуро. После застывания агара чашки термостатировали при температуре 37°С 24-48 часов.

По истечении времени культивирования чашки осматривали и подсчитывали результаты. Выборочные колонии окрашивали по Граму и микроскопировали, используя иммерсию и световой микроскоп с разрешением х1600.

Результаты анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Количественный состав микроорганизмов в пробах отходов

Номер пробы	Количество бактерий	Количество грибов
№ 1	$1{,}25 \cdot 10^9$ КОЕ/см^3	$1{,}3 \cdot 10^8$ КОЕ/см^3
№ 2	$1{,}25 \cdot 10^8$ КОЕ/см^3	Не обнаружено

Таким образом, отмечено, что количество бактерий во второй пробе было на порядок меньше, чем в первой, что означает, что в данной пробе складываются более благоприятные условия для развития бактерий. В таблице 2 приведены результаты изучения качественного состава микроорганизмов в пробах.

Таблица 2 – Качественный состав микроорганизмов в пробах отходов

Номер пробы	Бактерии	Грибы
№ 1	Преобладали грамположительные спороносные бактерии рода Bacillus (рис. 1)	Встречались дрожжевые клетки грибов
№ 2	Обнаружены грамположительные спороносные бактерии рода Bacillus, грамположительные кокки, предположительно Staphylococcus spp. и Micrococcus spp. (рис. 2)	Не обнаружено

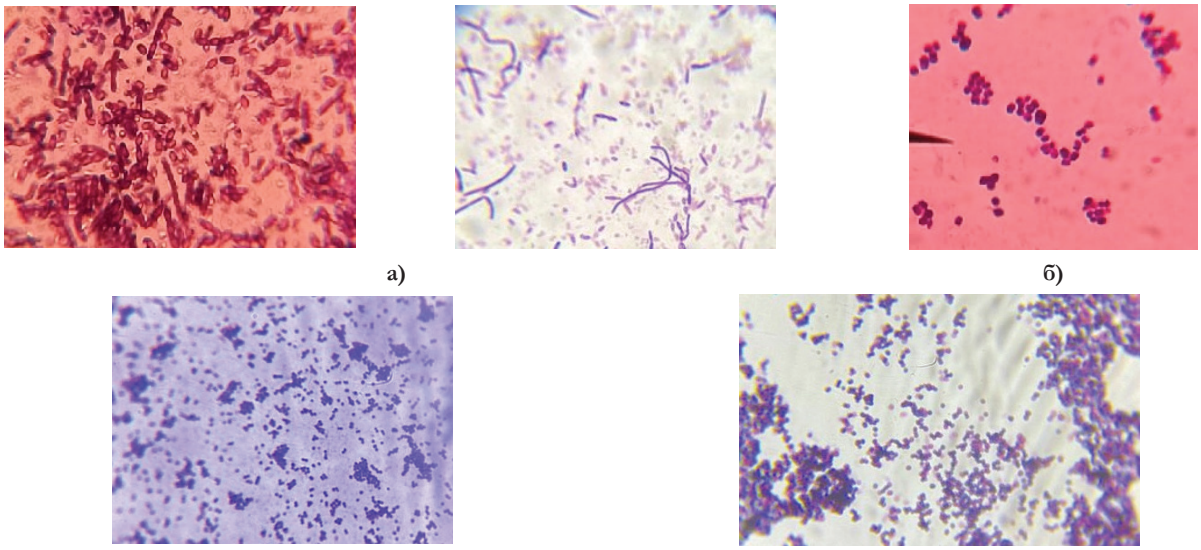


Рисунок. а) Бактерии рода *Bacillus*; б) Дрожжевые грибы; в) Бактерии *Micrococcus spp.*; г) Бактерии *Staphylococcus spp.*

Таким образом, в пробах отходов микробиологических производств обнаружены микроорганизмы в значительном количественном содержании, среди которых в пробе № 1 были обнаружены в основном бациллы и дрожжевые грибы, а в пробе № 2 – стафилококки, микрококки, бациллы, актинобактерии. В целом, отмечено, что отходы являются благоприятной средой для развития микроорганизмов. Для полной и безопасной утилизации отходов микробиологического и биотехнологического производств важное значение имеет выбор способов и методов полной деструкции.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОМПЛЕКСНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ БАКТЕРИОТРОПНЫХ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ

Хохрякова М.Д., асп. 2 года обучения; **Селиванова М.С.**, студ. 5 курса;
Фазылова А.А., студ. 5 курса; **Митяева К.П.**, студ. 5 курса
Научные руководители: **Несчисляев В.А.**, д.м.н., проф., **Орлова Е.В.**, д.ф.н., проф.
ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России,
614900, Российская Федерация, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д.2.
E-mail: skakodub1997@mail.ru

Ключевые слова: *микробиота, пребиотические свойства, синбиотик, растительный субстрат, экспресс-тестирование, бактериотропные свойства.*

Микробиота желудочно-кишечного тракта играет существенную роль в жизнедеятельности макроорганизма. Расширение номенклатуры препаратов для профилактики и коррекции дисбиотиеских состояний является актуальным направлением практической микробиотологии и биотехнологии. К разряду перспективных средств относят пребиотики – вещества немикробного происхождения, оказывающие стимулирующий эффект на микробиоту толстого кишечника, а также композиции, состоящие из пребиотиков и пробиотиков и относимые к группе синбиотиков. Отбор пребиотических субстанций, в т.ч. растительного происхождения, предполагает их тестирование на выраженность бактериотропных свойств.

Цель исследования – разработка методологии качественной и количественной экспресс-оценки пребиотических свойств растительных субстратов.

Для реализации данной цели апробирована совокупность тестов, позволяющие оценить влияние экстрактов из растительного сырья на физиологическое состояние бактериальных клеток и проявление их культуральных свойств. Физиологическое состояние клетки исследовали на модели генномодифицированного штамма Escherichia Coli lum^+ со встроенным геном свечения. По изменению уровня биолюминесценции оценивали влияние исследуемых субстанций при контактной экспозиции с индикаторным штаммом в течение 24 ч с помощью люминометра серии «Биотокс». Эффект влияния экстрактов на пробиотические микроорганизмы оценивали по росту штаммов лакто- и бифидобактерий на «бедных» питательных средах. При этом учитывали уровень накопления биомассы, активность кислотообразования и потребление углеводного компонента. Обработка полученных результатов позволяет получить сравнительную характеристику пребиотического потенциала растительных субстратов, в т. ч. в качестве компонента для создания синбиотиков.

Разработанный методический подход обеспечивает экспресс-тестирование in vitro растительных субстратов на наличие и уровень пребиотических свойств и возможность совмещения с пробиотическими культурами при разработке синбиотика.

ВЛИЯНИЕ ЭФЕКТА ВАРБУРГА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ НАРАБОТКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ВТОРОГО СЕРОТИПА

Швагина Д.В., магистрант 2 года обучения
Руководитель: **Прокофьев А.В.**, к.б.н., Ph.D.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация
E-mail: darya.shvagina@spcpu.ru

Ключевые слова: *AAV, генная терапия, эффект Варбурга, комплекс пируватдегидрогеназы.*

Векторы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) являются ведущей платформой для доставки генов. Недавно было одобрено несколько методов лечения на основе rAAV. Несмотря на эти достижения в клинике, производство векторов rAAV остается трудной задачей из-за больших доз лекарственного препарата, необходимых для достижения терапевтического эффекта (1×10^{13} -1×10^{14} VG/кг) и малых количествах получаемых вирусных частиц (1×10^{14} VG/литр).

Одним из способов увеличения продуктивности производства rAAV может быть воздействие на ферментативные комплексы, участвующие в образовании макроэргических соединений, необходимых продуценту для биосинтеза целевого продукта, в том числе и rAAV.

Большинство культивируемых клеток млекопитающих демонстрируют аэробный гликолиз как основной источник получения энергии, также известный как эффект Варбурга, который является неэффективным энергетическим метаболизмом, вместо окислительного фосфорилирования глюкозы. Малая молекула, ион дихлорацетат, является ингибитором киназы пируватдегидрогеназы, фермента, который в свою очередь является ингибитором комплекса пируватдегидрогеназы, ключевого ферментного комплекса, который играет решающую роль в метаболизме глюкозы, связывая гликолиз с циклом Кребса, поскольку комплекс пируватдегидрогеназы катализирует превращение пирувата в ацетил-КоА. Из-за неэффективной работы данного комплекса ферментов протекает побочная реакция превращения пирувата в лактат, накопление которого приводит к увеличению осмоляльности культуральной жидкости и ингибированию пролиферации. Неэффективность превращения пирувата в ацетил-КоА вынуждает компенсировать недостаток энергии через усиление процесса гликолиза, что и приводит к возникновению эффекта Варбурга. Целью исследования стало изучить влияние добавления дихлоуксусной кислоты для нивелирования эффекта Варбурга на эффективность наработки rAAV.

В результате исследования была проведена наработка rAAV2-GFP методом трехплазмидной транзиентной трансфекции клеточной линии HEK293sus с добавлением в питательную среду дихлоуксусной кислоты для достижения конечной концентрации 2-10 мМ. Клетки культивировались в орбитальном шейкер-инкубаторе в 250 мл колбах Эрленмейера при 37 °C, 150 об/мин и 5% атмосфере CO_2. По окончании биопроцесса полученные после центрифугирования клеточные осадки были лизированы, последовательно обработаны ферментами дезоксирибонуклеазой и протеазой. Для определения титра rAAV2-GFP была проведена Real-time PCR.

Результаты анализа представлены на рисунке 1.

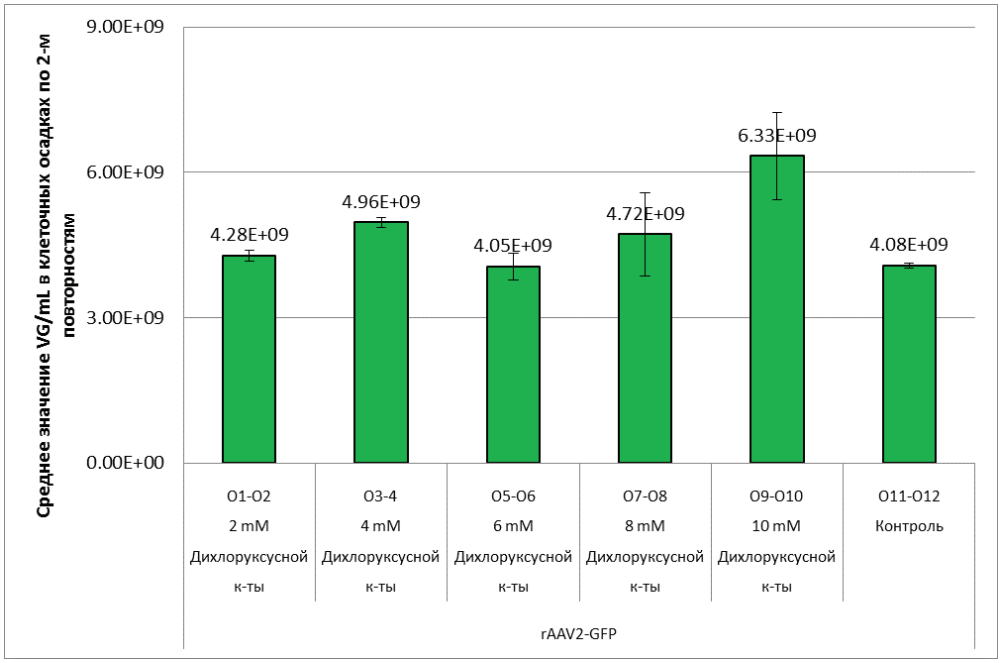


Рисунок 1. Среднее значение VG/mL в клеточных осадках по 2-м повторностям

На графике видно, что присутствие 10 мМ дихлоруксусной кислоты в культуральной жидкости способствовало увеличению продуктивности наработки rAAV2. Из этого следует, что произошло ингибирование киназы пируватдегидрогеназы, и окислительное фосфорилирование глюкозы проходило с большей эффективностью.

Коэффициент вариации между повторностями опытов не превышает 30%, что укладывается в принятую погрешность методики анализа.

Впервые показано, что эффект Варбурга влияет на продуктивность получения rAAV и что с помощью малых молекул возможно корректировать потоки основных энергетических метаболитов. В дальнейшем, эти данные могут использоваться для оптимизации процесса получения rAAV.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

А
Абакумова Т.К. 95
Акишина Е.А. 3
Александрова Д.А. 98
Алиев А.Р. 269
Аликина Ю.А. 33
Андреева Е.А. 415
Андреева П.И. 101
Андрюшков П.А. 105
Антуганов Д.О. 108

Б
Балаян И.Т. 90
Банайтис Р.П. 113
Баширова Р.Р. 116
Биткина Т.А. 120
Болотина Ю.Д. 39
Бродская А.В. 427
Бронских Е.Д. 123
Брюккель А.Г. 277
Бугаев А.С. 214, 366
Бутомо Т.В. 280

В
Василенко Н.М. 33
Васильева П.А. 126
Вахнина А.А. 4
Воловей А.Г. 131
Ворона Д.С. 33
Воронина Я.А. 418
Воронов А.О. 374

Г
Гаврилова Н.В. 427
Галина З.Р. 283
Гвоздев С.В. 64
Герасимова В.А. 419
Головина Л.А. 287
Голубев А.Н. 134
Горшков А.В. 427
Готовщиц Д.Р. 290
Гришанин В.С. 137
Гусева А.О. 41
Гусев К.А. 271

Д
Давыдова И.В. 140
Данилкина Е.А. 294
Данилова К.В. 142
Двинина Ю.С. 420
Демакова Н.В. 44
Дмитриева В.Д. 145
Доманина А.М. 46
Домондон М. 380

Е
Евстафьева В.С. 421
Елпаева Е.А. 427
Ереско С.О. 90
Ескенова С.Ж. 296

Ж
Жидких А.С. 149
Жумагазеева А.Ж. 154

З
Завьялова Д.А. 34
Зазулина А.А. 35
Зайцев С.А. 230
Зельманчук И.С. 300
Зенкова А.К. 305
Зилов Д.С. 378

И
Ильичева Е.С. 308
Исаева А.А. 311

К
Каа К.В. 334
Казак Д.В. 3
Казанова А.Н. 157
Кан А.В. 50, 67
Караваева Л.И. 315
Карандашова С.С. 305
Каргин В.С. 160
Карлова А.Ф. 23
Карсанова В.Э. 90
Карчевская К.И. 164
Касымов И.Д. 166
Кобылинская Н.Ю. 170
Кованева А.В. 317
Кованcков В.Е. 202
Колесникова М.А. 321
Кондакова Ю.А. 273
Коновалова А.Д. 173
Копаница М.А. 51
Короткова О.И. 325
Коцур Ю.М. 176, 256
Кравченко Р.В. 53
Краснова М.В. 44
Красновская М.А. 64
Крыжановская В.С. 327
Кузнецов А.Г. 166
Кузнецова М.С. 180
Курочкина А.С. 422
Кустин Р.П. 6

Л
Ладэ А.С. 330
Лёзов Д.В. 8
Ли А.О. 56
Лисовский Д.С. 11
Литвинова М.В. 59
Лобанова Е.Н. 183
Ложков А.А. 334
Лукьяненко В.И. 13

Львова М.Ю. 88
Ляльков Н.Н. 36

М
Маковская О.Н. 37
Мартышкина Ю.С. 339
Мельник М.В. 188
Митяева К.П. 431
Мозговой И.Р. 190
Мударисова Р.С. 343
Муллаева В.Н. 193
Мухтар З.К. 347
Мяндина Т.А. 173

Н
Надпорожский М.А. 108
Назина М.А. 90
Некрасова Д.А. 423
Немков С.А. 199
Нестерова Д.И. 196, 253
Нецветай С.Р. 88
Никитин И.Д. 62
Никифорова А.Б. 380
Новицкая В.А. 64
Ногаева У.В. 202, 210

О
Огородникова А.П. 78
Останина А.А. 287

П
Палагина М.А. 424
Панков Д.И. 16
Панченко А.А. 426
Паромов Е.А. 351
Парфеньев С.Е. 88
Петров Д.В. 355
Пименов С.Д. 19
Плотникова М.А. 334
Погосян Н.Г. 89
Подборонова А.Г. 361
Подивилова Е.А. 207
Подойницына А.А. 426
Попов О.Р. 202, 210
Потычинская У.В. 214, 366
Приходько В.А. 50, 67
Проявина Л.В. 234
Пуйдак Д.В. 64
Пурвиньш Л.В. 427

Р
Радичкина Д.А. 218
Решетниченко А.А. 90
Романенко М.С. 381
Романова А.А. 68
Рыбакова А.И. 370

С
Савви К.И. 207
Савицкас В.Э. 35
Сагайдак А.А. 68
Сагайдак А.В. 90
Садикова Р.К. 223
Салахетдинов Д.Х. 267
Сальманова А.И. 426
Сапаева Л.У. 71
Сарсенова Е.А. 415
Свотин А.А. 62
Селиванова М.С. 431
Синяк М.И. 36
Скоблева А.П. 226
Смахтина А.М. 72
Смирнов С.В. 374
Созинова Д.В. 199
Сон А.В. 230
Сорокина Н.В. 378
Спиридонова А.В. 23
Сретенская И.И. 234
Степанов К.С. 236
Стрелкова А.В. 241
Султанова Р.Ф. 380
Сухоруков А.А. 74

Т
Тальдаев А.Х. 16
Тарасова К.И. 244
Терентьева Д.Р. 383
Труханова Ю.А. 26
Трушникова В.Э. 28
Тумаев А.В. 419
Турманидзе Г.Н. 250

У
Угольцова В.Н. 428
Умбетали А.О. 388
Усачева Д.В. 78
Успанова А.С. 406

Ф
Фазылова А.А. 431
Федотова А.А. 277
Филиппов Д.А. 429
Финк М.А. 392
Фитова В.Д. 430
Фридман Н.А. 190, 207

Х
Хван А.Э. 397
Холодаева С.В. 317
Хохрякова М.Д. 401, 431
Храменкова В. А. 283

Ц
Цветкова И.И. 91

Ч
Чеботова П.А. 196, 253
Черномыз М.С. 88
Чистякова Е.Ю. 92
Чичарова М.А. 403
Чуланова А.А. 72

Ш
Шамаева С.А. 406
Швагина Д.В. 432
Шерстнев В.В. 381
Шибалски Р. 380
Шибилев В.М. 92
Шиц Д.Д. 79
Шур Ю.В. 84
Шустов М.В. 409

Щ
Щербаков М.С. 256

Ю
Юнкевич А.М. 259
Юраков А.М. 30
Юсупова А.А. 411
Юшина А.Д. 415

Я
Яговкин И.В. 263

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕХНОЛОГИЯ НАПРАВЛЕННОГО СИНТЕЗА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2-АЗОЛОВ С ПИРИДИНОВЫМ ФРАГМЕНТОМ
Акишина Е.А., асп. 3 года обучения, Казак Д.В., магистрант 3

СИНТЕЗ *N,N'*-[СУКЦИНИЛБИС(ОКСИ)]ДИБЕНЗАМИДОВ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
Вахнина А.А., студ. 4 курса 4

ВЗАИМОДЕЙСТ ВИЕ 6-БРОМ-3-ВИНИЛХРОМОНОВ С ГИДРАЗИНОМ
Кустин Р.П., аспирант 1 года обучения 6

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ АНАЛОГОВ 1-ГЕРМАТРАНОЛ-ГИДРАТА
Лёзов Д.В., асп. 2 курса обучения 8

СИНТЕЗ ДИМЕТИЛАМИНОПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРЗАМЕЩЁННЫХ САЛИЦИЛАНИЛИДОВ
Лисовский Д.С., студ. 4 курса 11

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 4,4a-ДИГИДРОКСАНТОНОВ
Лукьяненко В.П., асп. 2 года обучения 13

КОКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА С АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ *IN VITRO* И *IN SILICO*
Панков Д.П., студ. 3 курса, Тальдаев А.Х., студ. 3 курса 16

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКРИСТАЛЛИЧЕКОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЗО-ВОЗДУШНЫХ СМЕСЕЙ ХЛОРИСТОГО ВОДОРОДА
Пименов С.Д., асп. 2 года обучения 19

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ *N*-ТЕРМИНАЛЬНЫЙ 4-(1-АДАМАНТИЛ)БЕНЗОИЛИРОВАНЫЙ ФРАГМЕНТ
Спиридонова А.В., магистрант 2 года обучения, Карлова А.Ф., магистрант 1 года обучения 23

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ N-ФЕНИЛБЕНЗАМИДИНОВ С АРОМАТИЧЕСКИМИ ДИКАРБОНОВЫМИ КИСЛОТАМИ
Труханова Ю.А., магистрант 1 года обучения 26

ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПЕРИОДАТНОГО ОКИСЛЕНИЯ АЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ
Трушникова В.Э., магистрант 2 года обучения 28

ОСОБЕННОСТИ ПРОТОЧНОГО ХЛОРИРОВАНИЯ В СИНТЕЗЕ БЕНДАМУСТИНА
Юраков А.М., аспирант 3 года обучения 30

РАЗРАБОТКА ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПОРИСТЫХ АЛЮМОСИЛИКАТОВ
Василенко Н.М., Аликина Ю.А., асп. 3 года обучения 33

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 4-АМИНОАНТИПИРИНА С ЗАМЕЩЕННЫМИ БЕНЗАЛЬДЕГИДАМИ
Ворона Д.С., студ. 3 курса 33

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ГИДРОМЕТАЛЛАТРАНЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ГИДРОКСИАЛКИЛАМИНОВ С СОЛЯМИ ПИРОМЕЛЛИТОВОЙ И ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТ
Завьялова Д.А., студ. 4 курса 34

СИНТЕЗ НОВЫХ 5-АРИЛИМИНОМЕТИЛ-1*H*-ПИРИМИДИН-2,4-ДИОНОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И ПРОТИВОГРИБКОВЫХ АГЕНТОВ
Зазулина А.А., маг. 2 курса, Савицкас В.Э., маг. 2 курса 35

СИНТЕЗ АЗОМЕТИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗАТИНА И АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОВ
Ляльков Н.Н., Синяк М.П., студ. 2 курса 36

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРОТОННЫЕ ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ И КОМПЛЕКСЫ ТЕТРАКИС(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)ЭТИЛЕНДИАМИНА
Маковская О.Н., студ. 4 курса 37

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ И МЕТОДЫ ИХ ОЦЕНКИ. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ ЭТИЛТИОБЕНЗИМИДАЗОЛА ФУМАРАТА
Болотина Ю.Д., студ. 5 курса 39

ВЛИЯНИЕ ЭМПАГЛИФЛОЗИНА И ОРНИТИНА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ
Гусева А.О., студ. 5 курса 41

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЖЕНЬШЕНЯ, ДИОСКОРЕИ И ЯКОРЦЕВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АЛИМЕНТАРНОГО ОЖИРЕНИЯ
Демакова Н.В., студ. 5 курса, Краснова М.В., аспирант 3 года обучения 44

ВЛИЯНИЕ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ДИНИТРАТА 2-ФЕНИЛ-9-ДИЭТИЛАМИНОЭТИЛИМИДАЗО[1.2]БЕНЗИМИДАЗОЛА НА ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ КРОЛИКОВ В УСЛОВИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ
Доманина А.М., асп. 1 года обучения 46

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО АЛЛИЛМОРФОЛИНА НА КИШЕЧНУЮ ПЕРИСТАЛЬТИКУ У МЫШЕЙ
Кан А.В., студ. 5 курса, Приходько В.А., асп. 2 года обучения 50

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОНАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА
Копаница М.А., ассистент 51

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИЙ АНТИСЕПТИКОВ НА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ
Кравченко Р.В., аспирант 1 года обучения 53

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИКИ ИДИОПАТИЧЕСКОГО СКОЛИОЗА
Ли А.О., асп. 1 года обучения 56

ЭКПРЕССИЯ БЕЛКОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ПРОХОЖДЕНИЕ ФАЗЫ G1 КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА HCT116 И H5
Литвинова М.В., студ. 5 курса 59

ОЦЕНКА ПЛОЩАДИ РАНЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ
Никитин П.Д., студ. 2 курса, Свотин А.А., студ. 3 курса 62

ИЗУЧЕНИЕ КРОВООСТАНАВЛИВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПЕНЫ МЕДИЦИНСКОЙ
Новицкая В.А., магистрант кафедры ОЭФ с курсом ФПК и ПК, Гвоздев С.В., асп. кафедры общей хирургии, Красновская М.А., студ. 5 курса, Пуйдак Д.В., студ. 5 курса 64

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АЛЛИЛМОРФОЛИНА НА ПОВЕДЕНИЕ *DANIO RERIO* В ТЕСТЕ «НОВЫЙ АКВАРИУМ»
Приходько В.А., асп. 2 года обучения, Кан А.В., студ. 5 курса 67

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В КЛЕТКАХ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ПАКЛИТАКСЕЛУ
Романова А.А., асп. 1 года обучения, Сагайдак А.А., асп. 2 года обучения 68

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА «ФИТОФРУФОЛ»
Сапаева Л.У., магистр 1 года обучения 71

ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ НОВОГО ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО АНАЛОГА ТИМОГЕНА В УСЛОВИЯХ КОЖНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ
Смахтина А.М., студ. 4 курса, Чуланова А.А., асп. 3 года обучения 72

ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ С ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ
Сухоруков А.А., студ. 4 курса 74

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ АТИВНОСТИ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ФУМАРОВОЙ КИСЛОТЫ
Усачева Д.В., студ. 4 курса, Огородникова А.П., студ. 4 курса 78

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОИСКА И СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТА, ОБЛАДАЮЩЕГО ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ТРАВЫ АСТРАГАЛА ЛИСЬЕГО
Шур Ю.В., ассистент 84

АКТИВАТОРЫ АМФК КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ СТРАТЕГИЯ ПРИ БОРЬБЕ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА
Львова М.Ю., магистр 2 года обучения, Черномыз М.С., бакалавр 4 курс. 88

ВЛИЯНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА ZEB1 НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОК К ГЕНОТОКСИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ В ХОДЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА
Нецветай С.Р., студ. 3 курса, Парфеньев С.Е., мл. науч. сотрудник, асп. 4 года обучения 88

ИССЛЕДОВАНИЕ СОХРАНЯЕМОСТИ 2,4,6-ТРИНИТРОФЕНОЛА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПРИ ХРАНЕНИИ В РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМАХ
Погосян Н.Г., аспирант 1 года обучения. 89

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГРЕЛИНА, ОПОСРЕДОВАННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С TOLL-ПОДОБНЫМ РЕЦЕПТОРОМ 4
Решетниченко А.А., 3 курс, 3 год обучения, Назина М.А., 3 курс, 3 год обучения, Балаян П.Т., 4 курс, 4 год обучения, Карсанова В.Э., 4 курс, 4 год обучения, Ереско С.О., аспирант 90

РАЗВИТИЕ ABC-ТРАНСПОРТЕР-ОПОСРЕДОВАННОЙ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТАМ РАЗЛИЧНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ
Сагайдак А.В., аспирант 2 года обучения 90

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ МЕЛАНОМЫ
Цветкова П.П., студ. 3 курса 91

ИЗМЕНЕНИЕ СТАТИЧЕСКОЙ ВЫНОСЛИВОСТИ МЫШЕЙ ПРИ КУРСОВОМ ВВЕДЕНИИ ПРОИЗВОДНЫХ ДИМЕТИЛАМИНОЭТАНОЛА
Чистякова Е.Ю., соискатель 92

ПЕРВИЧНАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СИНТЕТИЧЕСКОГО КОНЪЮГАТА НА ОСНОВЕ 2-МЕТОКСИЭСТРАДИОЛА И ХЛОРАМБУЦИЛА
Шибилев В.М., асп. 3 года. 92

СОВРЕМЕННЫЕ ВОПРОСЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРОЕНИЯ АППАРАТА НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА ПЕРЕМЕШИВАНИЯ В ПАКЕТЕ ПРОГРАММ ANSYS
Абакумова Т.К., магистрант 2 года обучения 95

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОГО ЭКСТРАКТА НА ОСНОВЕ ЧЕРНИКИ, ИМБИРЯ И ЖЕНЬШЕНЯ
Александрова Д.А., магистрант 1 года обучения. 98

РАЗРАБОТКА ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» ДЛЯ ВАГИНАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ
Андреева П.П., магистрант 2 курса 101

РАЗРАБОТКА ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
С ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ И ОБЕЗБОЛИВАЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ
Андрюшков П.А., студ. 4 курса 105

ПРОТОННЫЕ ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАЛКИЛАММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ –
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БУФЕРНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ^{68}GA-МЕЧЕННЫХ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ
Антуганов Д.О., мол. ученый, Надпорожский М.А., мол. ученый 108

ФИЛЬТРОВАНИЕ В РЕЖИМЕ ПЕРЕМЕННОГО ПЕРЕПАДА ДАВЛЕНИЯ
Банайтис Р.П., студ. 4-го курса 113

ГРАНУЛЫ: ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ И ИССЛЕДОВАНИЮ
ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ В РАЗНЫХ ФАРМАКОПЕЯХ
Баширова Р.Р., студ. 4 курса 116

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕСОРБЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР
Биткина Т.А., асп. 3 года обучения 120

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ МЕТАБОЛИЗМА И НАКОПЛЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО *SCUTELLARIA BAICALENSIS GEORGI*
Бронских Е.Д., студ. 2 курса 123

ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОЦЕСС ЭКСТРАКЦИИ ФЛАВОНОИДОВ
Васильева П.А., асп. 1 года обучения 126

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ РЕКТИФИКАЦИОННОЙ КОЛОННЫ НЕПРЕРЫВНОГО ДЕЙСТВИЯ
ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСИ ХЛОРОФОРМ – ЭТАНОЛ
Воловей А.Г., магистрант 2 года обучения 131

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ТАБЛЕТОК ТОРАСЕМИД С ПРИМЕНЕНИЕМ
КОНЦЕПЦИИ КАЧЕСТВО ЧЕРЕЗ РАЗРАБОТКУ И МЕТОДА ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА
Голубев А.Н., магистрант 2 года обучения 134

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ТАБЛЕТОК
МИКРОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ ГАЗОФАЗНОГО ГИДРОЛИЗА
Гришанин В.С., магистрант 2 года обучения 137

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПОДБОРА ОБОРУДОВАНИЯ ПРИ ТЕХНИЧЕСКОМ ОСНАЩЕНИИ
НОВОГО ПРОИЗВОДСТВА ПО ПОЛУЧЕНИЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ
Давыдова П.В., магистрант 2 года обучения 140

КАРАНДАШ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ НА ОСНОВЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА ХВОИ ЕЛИ
КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА
Данилова К.В., магистрант 1 года обучения 142

РАЗРАБОТКА СОСТАВА КРЕМА НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА ЧЕРЕДЫ ТРЕХРАЗДЕЛЬНОЙ ТРАВЫ
ДЛЯ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ЭКЗЕМЫ
Дмитриева В.Д., студ. 5 курса 145

ОБЗОР ПРЕИМУЩЕСТВ НАНОСИСТЕМЫ С БЕТУЛИНОМ КАК ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА
С ПОВЫШЕННОЙ БИОДОСТУПНОСТЬЮ
Жидких А.С., магистрант 1 года обучения 149

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БУТОНОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ (*SOPHORA JAPONICA GEMMAS*)
И ЛИСТЬЕВ ГИНКГО БИЛОБА (*FOLIIS GINKGO BILOBA*)
Жумагазеева А.Ж., магистр 1 года обучения 154

ВЫБОР СОСТАВА ЛЕЧЕБНО-КОСМЕТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПСОРИАЗА
Казанова А.Н., студент 2 курса магистратуры 157

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ ХИТОЗАНА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ
Каргин В.С., асп. 2 года обучения 160

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЧАЯ ИЗ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ТРАВЫ
Карчевская К.П., студ. 4 курса 164

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ОРАЛЬНО ДИСПЕРГИРУЕМЫХ ТАБЛЕТОК
Касымов П.Д., Кузнецов А.Г., магистранты 1 года обучения 166

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ГИДРАТАЦИИ ТОНКОЙ ПЛЁНКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМ С ДИАМЕТРОМ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИМ ЭФФЕКТИВНУЮ ДОСТАВКУ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ГОЛОВНОЙ МОЗГ
Кобылинская Н.Ю., магистрант 2 года 170

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ТЕОРИИ ЭПИДЕМИЙ
Коновалова А.Д., студ. 3 курса, Мяндина Т.А., студ. 4 курса 173

РАЗРАБОТКА СОСТАВА СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ 4,4'-(ПРОПАНДИАМИДО)ДИБЕНЗОАТА НАТРИЯ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ
Коцур Ю.М., асп. 3 года обучения 176

РАЗРАБОТКА СОСТАВА РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА С ДОБАВЛЕНИЕМ ЭКСТРАКТА СОЛОДКИ И АЛЛАНТОИНА
Кузнецова М.С., студ. 4 курса 180

РИСК-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОДХОД К РАСШИРЕНИЮ ПРОДУКТОВОГО ПОРТФЕЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПАНИИ
Лобанова Е.Н., студ. 4 курса 183

АНАЛИЗ ВЕРОЯТНОСТИ ПОЯВЛЕНИЯ ОТКЛОНЕНИЙ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КРИТИЧЕСКИХ СТАДИЙ ПРОИЗВОДСТВА ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ
Мельник М.В., магистрант 2 года обучения 188

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОДИНАМИКИ СУШИЛКИ КИПЯЩЕГО СЛОЯ С ИНЕРТНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ
Мозговой П.Р., студ. 3 курса, Фридман Н.А., магистрант 2 года 190

МОДЕЛИРОВАНИЕ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА МЕТИЛОВОГО СПИРТА
Муллаева В.Н., магистрант 1 года 193

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ВОДНО-СПИРТОВОЙ СМЕСИ НА ПРОЦЕСС ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ
Нестерова Д.П., студ. 3 курса, Чеботова П.А., студ. 3 курса 196

ПРОЕКТИРОВАНИЕ УЧАСТКА С BFS С УЧЕТОМ СОВРЕМЕННЫХ ТРЕБОВАНИЙ
Немков С.А., магистрант 1 года обучения, Созинова Д.В., студ. 4 курса 199

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕЛОКСИКАМА
Ногаева У.В., асп. 1 года обучения, Попов О.Р., магистрант 1 года обучения, Кованков В.Е., студ. 1 курса 202

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЕЧНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ КОНДЕНСАЦИИ ПАРА ИЗ ПАРОГАЗОВОЙ СМЕСИ ПРИ СУШКЕ В ЗАМКНУТОМ ЦИКЛЕ ТЕПЛОНОСИТЕЛЯ
Подивилова Е.А., Савви К.П., студ. 3 курса, Фридман Н.А., магистрант 2 курса 207

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОЭМУЛЬСИЙИ НАНОЭМУЛЬСИЙ ДЛЯ МЕСТНОЙ И ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ
Попов О.Р., магистрант 1 года обучения, Ногаева У.В., асп. 1 года обучения 210

ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИИ НАКОПЛЕНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА И БИОМАССЫ В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ ЖЕНЬШЕНЯ АМЕРИКАНСКОГО
Потычинская У.В., студ. 2 курса, Бугаев А.С., студ. 3 курса 214

ДЕНДРИМЕРЫ КАК АКТИВНЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ И СИСТЕМЫ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ
Радичкина Д.А., студ. 4 курса 218

ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ГИГРОСКОПИЧНОСТЬ СУХОГО ЭКСТРАКТА БЕССМЕРТНИКА САМАРКАНДСКОГО
Садикова Р.К., стажер-исследователь 223

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОРБЕНТОВ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ
Скоблева А.П., студ. 4 курса 226

АЛГОРИТМ РАНЖИРОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТА В ФОРМЕ ТАБЛЕТОК ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ СПЕЦИФИКАЦИИ НА ГОТОВОЙ ПРОДУКТ
Сон А.В., преподаватель, Зайцев С.А., соискатель 230

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСТРАКТА ЛАДАННИКА ШАЛФЕЕЛИСТНОГО ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НАЗАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ
Сретенская П.П., студ. 4 курса, Проявина Л.В., студ. 4 курса 234

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ВАЛИДАЦИИ ПРОЦЕССА НА ОСНОВЕ СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
Степанов К.С., магистрант 1 года обучения 236

РАЗРАБОТКА СОСТАВА ГРАНУЛ С СУХИМ ЭКСТРАКТОМ КОРНЕЙ ЛОПУХА БОЛЬШОГО В ТВЁРДЫХ ЖЕЛАТИНОВЫХ КАПСУЛАХ
Стрелкова А.В., магистрант 2 года 241

РАЗРАБОТКА КОСМЕТИЧЕСКОГО ЗАЩИТНОГО КРЕМА ДЛЯ РУК, СОДЕРЖАЩЕГО МАСЛО АВОКАДО
Тарасова К.П., студ. 4 года обучения 244

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА CO_2 ЭКСТРАКТА РАПСА (*BRASSICA NAPUS*)
Тилеуберди Н.Н., магистрант 2 года обучения 248

РАЗРАБОТКА КОМПЬЮТЕРНОЙ МОДЕЛИ ПРОЦЕССА ПЕРЕМЕШИВАНИЯ И ОЦЕНКА ЕЕ АДЕКВАТНОСТИ
Турманидзе Г.Н., асп. 1 года обучения 250

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИБРАЦИЙ В ПРОЦЕССЕ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ ТВЕРДОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
Чеботова П.А., студ. 3 курса, Нестерова Д.П., студ. 3 курса 253

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА СОСТАВА ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА С НООТРОПНЫМ ДЕЙСТВИЕМ
Щербаков М.С., магистрант 1 года обучения 256

РЕГУЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ СУППОЗИТОРИЕВ ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ОСНОВУ
Юнкевич А.М., магистрант 2 года обучения, Коцур Ю.М., аспирант 3 года обучения 259

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ЭКСТРАКЦИОННОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗИТРОМИЦИНА В СУППОЗИТОРИЯХ НА РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ОСНОВ
Яговкин П.В., ординатор 1 года обучения 263

ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА КОМБИНИРОВАННОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРА С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ
Салахетдинов Д.Х., асп. 3 года обучения 267

АДДИТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ФАРМАЦИИ И МЕДИЦИНЕ

РАЗРАБОТКА ПОРТАТИВНОГО ДОЗИРУЮЩЕГО УСТРОЙСТВА.
Алиев А.Р., студ. 2 курса 269

РАЗРАБОТКА ФИЛАМЕНТОВ, СОДЕРЖАЩИХ РАМИПРИЛ, МЕТОДОМ ЭКСТРУЗИИ ГОРЯЧЕГО РАСПЛАВА
Гусев К.А., аспирант 1 года обучения 271

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛИМЕРА НА СВОЙСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПЛЁНОК
Кондакова Ю.А., магистр. 1 курса 273

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ

ИЗУЧЕНИЕ СОРБЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ
НА МОЛЕКУЛЯРНОМ НОСИТЕЛЕ (ЯНТАРНОЙ ПУДРЕ)
Брюккель А.Г., студент 4 курса, Федотова А.А., студент 3 курса 277

СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ КСАНТОГЕНГИДРАЗИДОВ
Бутомо Т.В., студ. 4 курса 280

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИИ ЭНДОТОКСИНА НА РАЗЛИЧНЫХ СОРБЕНТАХ
Галина З.Р., маг. 2 года обучения, Храменкова В.А., студ. 4 курса 283

МИНИМИКРОБИОРЕАКТОР ДЛЯ НАРАБОТКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
НЕПОСРЕДСТВЕННО В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ
Головина Л.А., студ. 3 курса, Останина А.А., студ. 3 курса 287

ОПТИМИЗАЦИЯ ИННОВАЦИОННОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА
ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
Готовщиц Д.Р., маг. 2 года обучения 290

МИКРОКАПСУЛЯЦИЯ ФУЛЛЕРЕНОЛА В ЛИПОСОМЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТДИЛХОЛИНА
Данилкина Е.А., студ. 3 курса 294

РАЗРАБОТКА СОРБЦИОННОГО МЕТОДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЛИПАЗЫ
ИЗ ЭКСТРАКТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ
Ескенова С.Ж., магистрант 2 года обучения 296

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЛИДЕРНЫХ ПЕПТИДОВ НА СЕКРЕЦИЮ БЕЛКА FVIII
Зельманчук И.С., маг. 2 года обучения ФПТЛ 300

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБИОРЕАКТОРА ДЛЯ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА ИНСУЛИНА
БЕТА-КЛЕТКАМИ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА
Зенкова А.К., студ. 3 курса, Карандашова С.С., студ. 3 курса 305

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
НЕКОТОРЫХ АГАРИКОВЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ
Ильичева Е.С., студ. 4 курса 308

РИСК-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН
Исаева А.А., магистрант 2 года обучения 311

МОДИФИКАЦИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА
ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ
Караваева Л.И., асп. 3 года обучения 315

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ СОРБЦИИ КОКАРБОКСИЛАЗЫ НА СОРБЕНТАХ РАЗЛИЧНОГО ТИПА
Кованева А.В., студ. 4 курса, Холодаева С.В., студ. 3 курса 317

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ПРОГРЕССИЮ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Колесникова М.А., студ. 4 курса 321

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКА НЕМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ С ЦЕЛЬЮ ПОИСКА ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ ПЕСТИЦИДОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ
Короткова О.И., магистрант 2 года обучения 325

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММЫ ОБУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ПЕРСОНАЛА НА ПРЕДПРИЯТИИ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕ ВЕТЕРИНАРНЫХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
Крыжановская В.С., магистр. 2 года обучения 327

ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИАЛУРОНИДАЗЫ
Ладэ А.С., маг. 2 года обучения 330

В ПОИСКАХ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ. ОЦЕНКА АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ИНТЕРФЕРОНА-ЛЯМБДА 1-ГО ТИПА ПО ОТНОШЕНИЮ К ВИРУСУ ГРИППА А, ВИРУСУ ЧИКУНГУНЬЯ И КОРОНАВИРУСУ
Ложков А.А., асп. 4 года обучения, Плотникова М.А., Каа К.В. 334

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО β-ДЕФЕНСИНА 2 В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ CHO-K1
Мартышкина Ю.С., студ. 4 курса 339

ПРИМЕНЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ
Мударисова Р.С., студ. 4 курса 343

РАЗРАБОТКА СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ α-АМИЛАЗЫ ИЗ ОКОЛОУШНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ
Мухтар З.К., магистрант 2 года обучения 347

АКТУАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКЕ ГРИППА
Паромов Е.А., студ. 2 курса 351

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРО- И НАНОПУЗЫРЬКОВЫХ ГАЗОВЫХ БАРБОТЕРОВ В ПРОЦЕССАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
Петров Д.В., маг. 1 года обучения 355

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ НА КАЛЛУСНУЮ КУЛЬТУРУ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО
Подборонова А.Г., студ. 4 курса 361

ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИИ НАКОПЛЕНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА И БИОМАССЫ В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ ЖЕНЬШЕНЯ АМЕРИКАНСКОГО
Потычинская У.В., студ. 2 курса, Бугаев А.С., студ. 3 курса 366

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА ФЕРМЕНТА ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗЫ В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО БИОРЕАКТОРА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ EVIO-LAB, PHARMTECHNOLOGIES
Рыбакова А.И., студ. 4 курса ФПТЛ 370

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ ИОНООБМЕННОЙ СОРБЦИИ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ОПТИМАЛЬНОГО РЕЖИМА ВЕДЕНИЯ ПРОЦЕССА
Смирнов С.В., студ. 4 курс, Воронов А.О., аспирант 4 года обучения 374

СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ РИБОЗИМОВ И РИБОСВИТЧЕЙ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ
Сорокина Н.В., магистрант 1 года обучения, Зилов Д.С., магистрант 2 года обучения 378

БИОЭНЕРГЕТИКА СВЕЖЕВЫДЕЛЕННЫХ МИТОХОНДРИЙ КОРКОВОГО СЛОЯ ПОЧЕК ПРИ РАЗВИТИИ СОЛЕЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ
Султанова Р.Ф., маг. 2 года обучения, Домондон М., Никифорова А.Б., Шибалски Р. 380

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИКИ МЕХАНИЗМА ОБРАЗОВАНИЯ МАТРИЦЫ
БЕЛКОВО-ПОРИСТОЙ СИСТЕМЫ (НА МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ – БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН)
Романенко М.С., студ. 2 курса, Шерстнев В.В., магистрант 2 года обучения 381

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В МУРМАНСКОЙ ОБЛАСТИ
МЕТОДОМ СПОЛИГОТИПИРОВАНИЯ
Терентьева Д.Р., студ. 4 курса. 383

ПОДБОР СОРБЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ
Умбетали А.О., магистрант 2 года обучения 388

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ
СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ПРИВЕДЕНИЕ ИХ В ПЛЮРИПОТЕНТНОЕ СОСТОЯНИЕ
Финк М.А., студент 2 курса 392

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Хван А.Э., студ. 2 курса. 397

РАЗРАБОТКА СИНБИОТИКА НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИТОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ
И ПРЕБИОТИЧЕСКОГО (РАСТИТЕЛЬНОГО) СУБСТРАТА. ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
Хохрякова М.Д., асп. 2 года обучения 401

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ, БЕЗОПАСНОСТИ
И ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ-ПРОДУЦЕНТА РИТУКСИМАБА
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ В СООТВЕТСТВИИ С РЕКОМЕНДАЦИЯМИ ICH
Чичарова М.А., студ. 2 курса магистратуры 403

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ
И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ВАКЦИНЫ
Шамаева С.А., студ. 2 курса, Успанова А.С., студ. 2 курса 406

ЭКСПРЕССИЯ β-ДЕФЕНСИНА 3 В ТКАНЯХ ГИПОТАЛАМУСА
В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЭМОЦИОНАЛЬНО-ФИЗИЧЕСКОГО СТРЕССА
Шустов М.В., студ. 4 курса 409

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
НЕКОТОРЫХ АФИЛЛОФОРОВЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ
Юсупова А.А., студ. 4 курса. 411

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ТАНГЕНЦИАЛЬНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ α-ДЕФЕНСИНОВ КРЫСЫ
Юшина А.Д., асп. 2 года обучения; Андреева Е.А., биотехнолог НОЦ МКТ; Сарсенова Е.А., маг. 2 года обучения 415

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММА *STREPTOMYCES SP. VIZR 18* – ПРОДУЦЕНТА
НОВОГО ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОГО БИОПРЕПАРАТА
Воронина Я.А., маг. 1 года обучения 418

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В КОТРОЛЕ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН
*Герасимова В.А., магистрант 1 года обучения, Тумаев А.В., старший химик сектора конъюгации полисахаридов
научно-производственного комплекса «Комбинированные вакцины» департамента фармацевтической разработки СПбНИИВС*. 419

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ НАРАБОТКИ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
НА ОСНОВЕ rAAV ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ А
Двинина Ю.С., маг. 2 года обучения 420

СТАБИЛИЗИРУЮЩИЙ ОТБОР И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *STREPTOMYCES SP. VIZR 52*
Евстафьева В.С., маг. 1 года обучения 421

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
РНК ВИРУСА SARS-COV-2 В МАЗКАХ ИЗ НОСОГЛОТКИ И РОТОГЛОТКИ
Курочкина А.С., студ. 6 курса. 422

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО
Некрасова Д.А., студ. 5 курса 423

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТРЁХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР
Палагина М.А., студ. 2 курса 424

РОЛЬ ГЕНОВ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ ШИЗОФРЕНИИ.
ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ
Панченко А.А., студ. 4 курса 426

РЕГУЛЯЦИЯ СОСТОЯНИЯ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ (ОМОЛОЖЕНИЕ, ОЧИЩЕНИЕ)
С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННОЙ БИОТЫ
Подойницына А.А., студ. 3 курса, Сальманова А.П., студ. 3 курса 426

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЭКЗОСОМ ДЛЯ ЗАДАЧ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ РНК
Пурвиньш Л.В., мл. науч. сотр., Горшков А.В., Бродская А.В., Елпаева Е.А., Гаврилова Н.В. 427

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПРЕПАРАТОВ
В ТЕРАПИИ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ПРИЧИНЫ НЕЭФФЕКТИВНОСТИ,
ВОЗМОЖНЫЕ РИСКИ И ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ (ОБЗОР)
Угольцова В.Н., аспирант 3 года обучения 428

ПРОЕКТИРОВАНИЕ ПРОИЗВОДСТВА СУБСТАНЦИИ ИМБРИЦИНА
Филиппов Д.А., магистрант 2 года обучения 429

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ ОТХОДОВ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ
Фитова В.Д., студ. 3 курса 430

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОМПЛЕКСНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ БАКТЕРИОТРОПНЫХ СВОЙСТВ
РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ
Хохрякова М.Д., асп. 2 года обучения; Селиванова М.С., студ. 5 курса; Фазылова А.А., студ. 5 курса;
Митяева К.П., студ. 5 курса 431

ВЛИЯНИЕ ЭФЕКТА ВАРБУРГА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ НАРАБОТКИ
РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ВТОРОГО СЕРОТИПА
Швагина Д.В., магистрант 2 года обучения 432

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ 434

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Организатор конференции
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Наркевич Игорь Анатольевич, ректор ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, д-р фармацевт. наук, профессор.

Главный редактор
Маймистов Денис Николаевич, заведующий лабораторией аддитивных технологий ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Технический редактор
Роденкова Вера Анатольевна, заведующий библиотекой ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Редакционная коллегия
Чернов Никита Максимович, доцент кафедры органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. хим. наук.

Титович Ирина Александровна, директор департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. биол наук.

Крысько Марина Валерьевна, старший преподаватель кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. фармацевт. наук.

Терентьева Оксана Андреевна, н.с. лаборатории аддитивных технологий ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. фармацевт. наук.

Умаров Сергей Закирджанович, заведующий кафедрой медицинского и фармацевтического товароведения ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, д-р фармацевт. наук, профессор.

Красовицкая Ирина Александровна, ст. преподаватель кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Загорулько Елена Юрьевна, научный сотрудник департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, старший преподаватель кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, канд. фармацевт. наук.

Жидкова Наталья Валентиновна, старший преподаватель научно-образовательного центра иностранных языков и межкультурных коммуникаций ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Чистякова Елизавета Юрьевна, преподаватель фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, Фармацевтический техникум.

Дизайн
Омельянова Александра Павловна, ОПТиТО ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.
Чистяков Кирилл Сергеевич, ОПТиТО ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Верстка
Дёмина Мария Павловна, редакционно-издательский отдел ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

XI ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ СТУДЕНТОВ И АСПИРАНТОВ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО»

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ КОНФЕРЕНЦИИ

15 марта – 23 апреля 2021 года

ТОМ 1

Зав. издательством *О. Л. Олейник*

Компьютерная верстка *М. П. Деминой*

Печать *А. В. Пономаревой*

Подписано к печати 02.06.21. Заказ 2142. Тираж 100 экз.
Гарнитура «Garamond». Печ. л. 56.

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14

ISBN 978-5-8085-0521-6

9 785808 505216