



НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИИ И НАУК О ЗЕМЛЕ



ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

БЕЛОРУССКИЕ ЛЕКАРСТВА

Материалы
Международной научно-практической конференции

Минск, 23-25 ноября 2022 г.

Минск
2022

В сборник включены тезисы докладов, представленных на Международную научно-практическую конференцию «Белорусские лекарства», отражающие результаты исследований ученых из Беларуси и России.

Материалы конференции представляют интерес для фармакологов, биохимиков, физиологов, медицинских работников и организаторов здравоохранения, специалистов в области технологии и производства лекарственных препаратов, а также преподавателей, аспирантов и студентов факультетов химического, фармацевтического и медико-биологического профилей.

Научно-организационный комитет

Председатель:

Калиниченко Елена Николаевна, чл.-корр., д.х.н., Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ИБОХ НАН Беларуси), Минск.

Заместитель председателя:

Гапанович Владимир Николаевич, д.м.н., проф., НПЦ Лотиос, Минск.

Секретарь комитета:

Башко Наталья Петровна, к.х.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск.

Члены комитета:

Андрианов Александр Михайлович, д.х.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Бабицкая Светлана Валерьевна, к.х.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Барановский Александр Вячеславович, д.х.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Божок Татьяна Станиславовна, к.х.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Грибовская Ольга Викторовна, к.х.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Диченко Ярослав Владимирович, к.х.н., доц., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Досина Маргарита Олеговна, к.б.н., Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск;

Заяц Михаил Федорович, д.х.н., доц., Белорусский государственный университет, Минск;

Куликовский Алексей Игоревич, ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Лахвич Федор Адамович, академик, д.х.н., проф., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Литвиновская Раиса Павловна, д.х.н., проф., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Михайлопуло Игорь Александрович, чл.-корр., д.х.н., проф., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Огурцова Светлана Эдуардовна, к.б.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Свиридов Олег Васильевич, д.х.н., проф., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Сивец Григорий Гаврилович, д.х.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Фарина Александр Васильевич, к.х.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Хрипач Наталия Борисовна, к.х.н., ИБОХ НАН Беларуси, Минск;

Янцевич Алексей Викторович, к.х.н., доц., ИБОХ НАН Беларуси, Минск.

УДК615.012+615.07+615.015+54.05+
579.66+578.7

ISBN

© Государственное научное учреждение
«Институт биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси», 2022 г.
© (Информация об издательстве)



NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND EARTH SCIENCES



INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY

BELARUS MEDICATIONS

Materials

International scientific and practical conference

Minsk, November 23-25, 2022

Minsk
2022

СИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ ИЗОКСАЗОЛОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ КАСКАДА SONIC HEDGEHOG В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Александрова А.А.^{1,2}, Мехтиев А.Р.¹, Золотцев В.А.¹, Тимошенко О.С.¹, Завьялова М.Г.¹, Санжаков М.А.¹, Щербаков К.А.¹, Рудович А.С.³, Жабинский В.Н.³, Хрипач В.А.³

¹Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Россия, г. Москва,

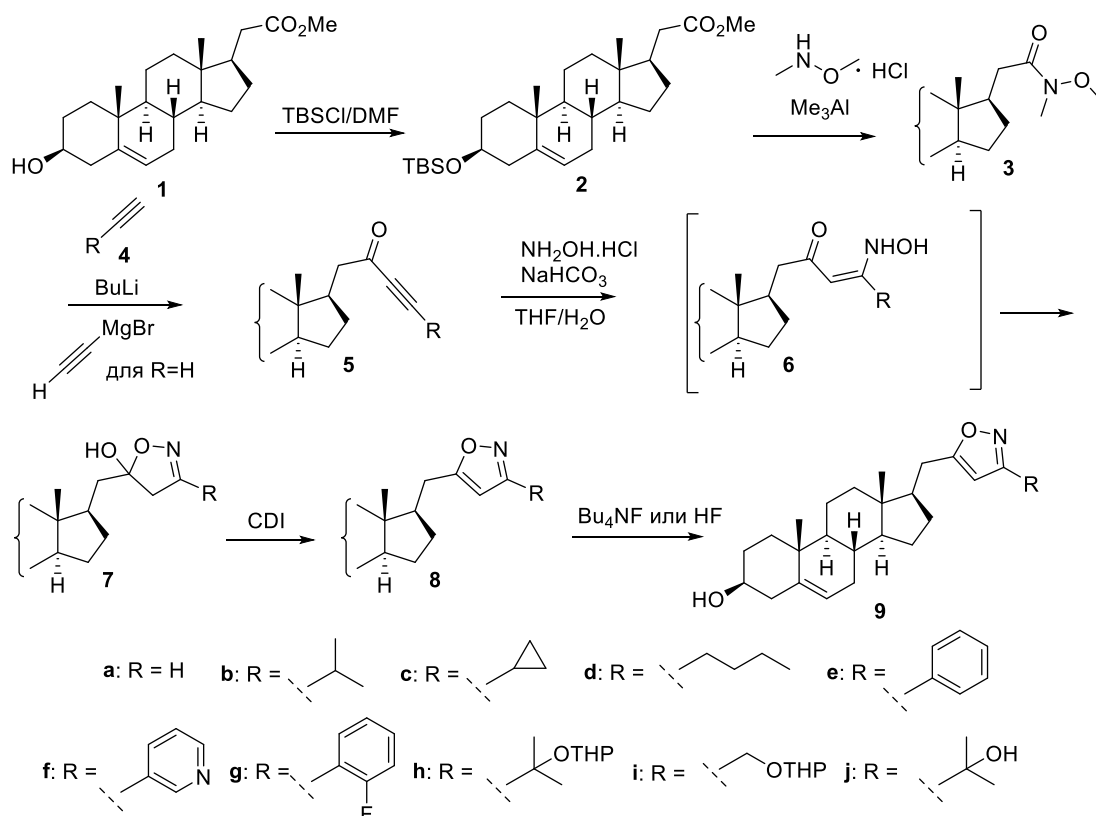
119121, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Россия, г. Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1

³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, vz@iboch.by

Предмет Shh-сигналинга является актуальной темой для исследований, поскольку это касается социально значимых заболеваний, таких как рак. Shh-сигналинг является одним из основных типов сигналинга в эмбриональных и опухолевых клетках. Исследование воздействия различных классов соединений на Shh-сигнальный путь может дать информацию о новых молекулярных мишенях, идеи для создания новых лекарственных препаратов, возможность борьбы с лекарственной резистентностью. Стероидные молекулы непосредственно связаны с механизмами регуляции Shh-сигналинга. Было выдвинуто предположение о том, что стероиды могут являться антагонистами или агонистами Shh-сигналинга. Целью работы являлся химический синтез стероидов, содержащих изоксазольный фрагмент в боковой цепи, а также оценка влияния полученных соединений в клетках Hela, A549, Wi-38, HepG2 на уровень экспрессии генов белков Shh-сигнального пути.

Синтез целевых соединений начат из эфира **1**, полученного в две стадии из андростенолона [1]. Первоначально изучалась возможность одностадийного превращения **2** в **5**, описанного для фторкетонатов и заключающегося в присоединении ацетиленидов лития к эфирам в присутствии эфира трехфтористого бора [2].





Однако реакция **2** с литиевой солью **4** ($R=-CH_2OTBS$) привела к образованию сложной смеси продуктов. В связи с этим была изучена возможность использования амидов Вайнреба. Этот подход показал хорошие результаты для получения кетоацетиленов **5** ($R=-CH_2OTBS$) через амид **3** и в дальнейшем был использован для синтеза всех остальных α,β -ацетиленовых кетонов **5**. Они были получены с выходом 78-90% при добавлении к амиду Вайнреба **3** литиевых солей, полученных *in situ* из BuLi и соответствующих ацетиленов **4**. Незамещенный ацетилен **5a** был синтезирован с использованием в качестве металлоорганического реагента коммерческого этинилмагнийбромида.

Региоселективность присоединения гидроксилamina к α,β -ацетиленовым кетонам сильно зависит от условий реакции. Показано, что оптимальными условиями для сопряженного 1,4-присоединения является использование смеси органических растворителей с водой [3]. При этом образующийся в результате сопряженного присоединения енамин подвергается внутримолекулярной циклизации с образованием 5-гидрокси-4,5-дигидроизоксазолов. В настоящей работе использованы условия реакции (вода-ТГФ, основание – $NaHCO_3$), предложенные в [2]; при этом гидроксиизоксазолины **7** были получены с выходами 56-88%.

Следующей стадией стала дегидратация соединения **7** с образованием соответствующих изоксазолов **8**. В большинстве случаев реакция протекала достаточно гладко, однако производные **8b** и **8c** получены с выходами только в 9% и 45%, соответственно. Удаление защитных групп завершило синтез целевых изоксазолов **9**, содержащих стероидный фрагмент при C-5 изоксазольного гетероцикла. Реакцию проводили, обрабатывая сложные эфиры **8** TBAF или раствором HF. Последний вариант предпочтителен для соединений **8h** и **8i**, дополнительно содержащих тетрагидропиранильную защиту. В первую очередь было изучено воздействие исследуемых соединений на жизнеспособность и пролиферацию клеток методом МТТ. Для исследования веществ были взяты клеточные линии Hela, A549, Wi-38 и HepG2. Было установлено, что соединения **9j**, **9d**, **9f**, **9e** и **7c** обладали цитотоксичностью. Наиболее токсичными в клеточной культуре Hela были соединения **9j** и **9d**, в A549 – **9f** и **9e**, в Wi-38 – **9f** и **7c**, в HepG2 – **9d**.

Воздействие стероидных изоксазолов на клеточный цикл было оценено методом проточной цитофлюориметрии с иодидом пропидия в клетках Hela, A549, Wi-38 и HepG2. Исследуемые соединения не влияли на клеточный цикл в Hela, Wi-38 и HepG2, но в A549 наблюдалось увеличение апоптоза и G0/G1-фазы клеточного деления под воздействием веществ **9f** и **9e**, соответственно.

На основе ОТ-ПЦР реального времени было показано, что стероидные производные изоксазолов влияют на уровни экспрессии генов сигнального пути Shh. В клеточных линиях Hela и Wi-38 наблюдалось активное ингибирование экспрессии ключевых генов Shh-сигналинга: Smo, Ptch1, Gli1. В A549 под воздействием вещества **9f** снижался уровень экспрессии генов Shh-сигналинга, а при инкубации клеток с соединением **9e** – повышался. В клетках HepG2 наблюдалась тенденция к подавлению всех генов по сравнению с контролем.

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-305), а также поддержана Белорусским фондом фундаментальных исследований (грант X22Млдг-001).

ЛИТЕРАТУРА

1. Magnesium in methanol selective reduction of a conjugate double bond in an α,β -unsaturated ester related to pregnadiene / Zarecki A., Wicha J. // Synthesis. – 1996. – Vol. 4. – P. 455-456.
2. Regioselective synthesis of functionalized 3- or 5-fluoroalkyl isoxazoles and pyrazoles from fluoroalkyl ynones and binucleophiles / Chalyk B.A. [et al.] // J. Org. Chem. – 2019. – Vol. 84. – P. 15212-15225.



3. Facile regioselective synthesis of 5-hydroxy-4,5-dihydroisoxazoles from acetylenic ketones / Xie M. [et al.] // J. Heterocycl. Chem. – 2012. – Vol. 49. – P. 1462-1465.

**SYNTHESIS OF STEROID ISOXAZOLES AND THEIR INFLUENCE ON THE
EXPRESSION OF KEY GENES OF THE SONIC HEDGEHOG CASCADE IN NORMAL
AND TUMOR CELLS**

Aleksandrova A.A.^{1,2}, Mekhtiev A.R.¹, Zolottsev V.A.¹, Timoshenko O.S.¹, Zavyalova M.G.¹,
Sanzhakov M.A.¹, Shcherbakov K.A.¹, Rudovich A.S.³, Zhabinskii V.N.³, Khripach V.A.³

¹V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russia, Moscow, 119121, Pogodinskaya, 10/8

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Russia, Moscow,
117997, st. Ostrovityanova, 1

³Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Belarus,
Minsk, 220084, Ak. Kuprevich Str. 5/2, vz@iboch.by

Using androstenolone as the starting compound, a number of steroids containing an isoxazole fragment in the side chain have been synthesized. Their effect on the cell cycle in Hela, A549, Wi-38, and HepG2 cells was studied by flow cytometry with propidium iodide.

**БИОСОВМЕСТИМЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО
ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ БЕЛКОВОЙ
ПРИРОДЫ С СУЛЬФОПРОИЗВОДНЫМИ ПИЛЛАР[5]АРЕНА**

Александрова Ю.И.¹, Шурпик Д.Н.¹, Мостовая О.А.¹, Зеленихин П.В.², Стойков И.И.^{1,3}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт
им. А.М. Бутлерова, ул. Кремлёвская, д. 29/1, 420008, Казань, Россия, a.julia.1996@mail.ru

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной
медицины и биологии, ул. Кремлёвская, д. 18, 420008, Казань, Россия

³ФГБНУ Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической
безопасности, Научный городок-2, 420075, Казань, Россия, Республика Татарстан

В настоящее время для усиления действия цитостатических препаратов при комплексном лечении онкологических заболеваний активно внедряют в практику альтернативные белковые и пептидные препараты. РНКазы Биназа (*Bacillus pumilus*), выделенная впервые в Казанском университете, показала свою активность в процессах пролиферации ряда раковых клеток (аденокарциномы человека, раковых клеток яичников, молочной железы и т.д.) [1]. Однако использование белковых противоопухолевых препаратов в индивидуальном виде имеет ряд ограничений, связанных с высокой токсичностью, быстрой инактивацией в условиях организма и побочными реакциями (антигенность, аллергенность, и т.д.). Устранить перечисленные недостатки можно за счёт использования препаратов в более низких концентрациях с функцией пролонгированного действия или применения в комбинированной терапии совместно с терапевтическими пептидами макроциклических молекул.

Системы доставки лекарственных препаратов на основе макроциклических структур решают ряд серьезных задач [2]. За счет самосборки с лекарственным препаратом в наноразмерные агрегаты обеспечивается повышение стабильности, биодоступности, проницаемости, а также снижение иммуногенности РНКазы. Так, пиллар[5]арены, обладающие уникальными характеристиками комплексообразования [3], являются прекрасными кандидатами в качестве наноносителей систем доставки противоопухолевого препарата Биназы, расширяя перспективы её применения в клинической практике.

Целью данной работы является синтез новых водорастворимых производных пиллар[5]арена, содержащих флуоресцентную метку, в качестве компонентов систем доставки, визуализации и пролонгации действия терапевтической противоопухолевой рибонуклеазы – Биназы.

Методы исследования. Структура всех синтезируемых макроциклов была охарактеризована комплексом физических и физико-химических методов: ИК-, ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, MALDI и ESI-масс-спектрометрии.

Процессы самоассоциации макроциклов и их взаимодействия с препаратами белковой природы с образованием наноагрегатов изучены на анализаторе размеров наночастиц методом динамического светорассеяния (ДСР), методом электронной спектроскопии поглощения и флуоресцентной спектроскопии. Изучение конформационной подвижности проведено методом спектроскопии кругового дихроизма. В качестве модельного белкового соединения использован лизоцим, не обладающий противоопухолевой активностью, но имеющий структуру, подобную препаратам класса рибонуклеаз и блеомицину.

Анализ цитотоксичности макроциклов и противоопухолевых наноагрегатов на их основе проведен при помощи МТТ-теста на модельных клетках аденокарциномы человека (A549) на лазерном конфокальном сканирующем микроскопе. При помощи колориметрических методов и проточной цитофлуориметрии оценены апоптозиндуцирующие и антипролиферативные свойства макроциклов и наноагрегатов. Размер и морфология наноагрегатов изучены методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

Результаты. В данной работе получен новый водорастворимый пиллар[5]арен **1** (рис.), содержащий в своей структуре одновременно сульфогруппы и флуоресцентную метку, путем направленного синтеза.

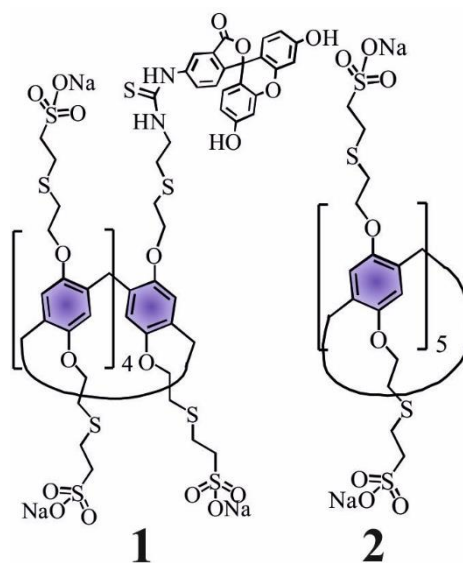


Рисунок. Структура сульфопроизводных пиллар[5]аренов **1** и **2**

Методом электронной спектроскопии поглощения в УФ и видимой области спектра было установлено взаимодействие флуоресцеинсодержащего сульфопиллар[5]арена **1** деказамещенного сульфопиллар[5]арена **2** с биназой с высокими константами ассоциации ($\lg K_{\text{асс1/биназа}} = 5,72$, $\lg K_{\text{асс2/биназа}} = 5,71$) и стехиометрией 1:2 (макроцикл : белок). С помощью метода кругового дихроизма было показано, что биназа не претерпевает конформационных изменений в структуре при взаимодействии с макроциклами **1** и **2**. По данным динамического светорассеяния (ДСР) макроциклы **1**, **2**, как и биназа, не образуют устойчивых самоассоциатов во всем диапазоне изучаемых концентраций и pH (pH = 4.01, 7.4, 9.18), а в системе макроцикл **1** или **2** / биназа при pH = 7.4 наблюдается образование устойчивых монодисперсных



нанометровых агрегатов. Морфология и размер наноагрегатов с биназой были изучены методом ПЭМ. Снимки ПЭМ содержали упорядоченные агрегаты сферической формы со средним диаметром 200 нм. В спектрах флуоресценции агрегатов пиллар[5]арена **1** с биназой наблюдали разгорание флуоресценции на длине волны флуоресцентного фрагмента (флуоресцеинизотиоцианата) макроцикла ($\lambda_{em} = 485$ нм) при увеличении концентрации биназы в системе.

Дополнительно нами были исследованы цитотоксичность нанокапсул с противоопухолевой активностью, антипролиферативные, апоптозиндуцирующие свойства по отношению к клеткам аденокарциномы человека с помощью колориметрических методов и проточной цитофлуориметрии. Важно отметить, что цитотоксичность наноагрегатов (макроцикл **1** + биназа) ниже в сравнении с самой РНКазой, при сохранении ферментативной активности биназы.

Закключение. Таким образом, полученные новые биосовместимые макроциклические рецепторы на платформе пиллар[5]арена, которые содержат флуоресцентную метку, могут найти применение для стабилизации, визуализации и пролонгации действия противоопухолевых препаратов белковой природы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 22-73-10166.

ЛИТЕРАТУРА

1. Binase immobilized on halloysite nanotubes exerts enhanced cytotoxicity toward human colon adenocarcinoma cells / Khodzhaeva V. [et al.] // *Frontiers in pharmacol.* – 2017. – Vol. 8. – Art. 631.
2. Integrating stimuli-responsive properties in host-guest supramolecular drug delivery systems / Braegelman A.S. [et al.] // *Theranostics.* – 2019. – Vol. 9. – P. 3017-3040.
3. Pillararene-based supramolecular polymers / Li H. [et al.] // *Chem. Commun.* – 2019. – Vol. 55. – P. 271-285.

BIOCOMPATIBLE DELIVERY SYSTEM BASED ON ANTITUMOR PROTEIN DRUGS WITH SULFO DERIVATIVES OF PILLAR[5]ARENE

Aleksandrova Yu.I.¹, Shurpik D.N.¹, Mostovaya O.A.¹, Zelenikhin P.V.², Stoikov I.I.^{1,3}

¹*A.M. Butlerov Chemical Institute, Kazan Federal University, Kremlevskaya, 18, 420008 Kazan, Russia, a.julia.1996@mail.ru*

²*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kremlevskaya, 18, 420008, Kazan, Russia*

³*Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety", Scientific town-2, 420075, Kazan, Russia*

In this report new pillar[5]arenes containing sulfonate fragments have been shown to form supramolecular complexes with therapeutic proteins to facilitate targeted transport with an increased duration of action and enhanced bioavailability. Regioselective synthesis was used to obtain a water-soluble pillar[5]arene containing the fluorescent label FITC and nine sulfoethoxy fragments. The pillar[5]arene formed complexes with binase in a 1:2 stoichiometry as demonstrated by UV-vis and fluorescence spectroscopy. The formation of stable spherical nanosized macrocycle / binase aggregates with an average particle size of 200 nm was established by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. Flow cytometry demonstrated the ability of macrocycle / binase complexes to penetrate into tumor cells where they exhibited significant cytotoxicity towards A549 cells at 10^{-5} – 10^{-6} M while maintaining the enzymatic activity of binase.

ДЕСТРУКЦИЯ АЗОЛОПИРИМИДИНОВ КАК СПОСОБ ПОСТРОЕНИЯ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Аминов С.В.¹, Уломский Е.Н.^{1,2}, Русинов В.Л.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Россия, 630002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, aminov.sema@gmail.com

²Институт органического синтеза УрО РАН, Россия, 630990, г. Екатеринбург, ул. С.Ковалевской, 22 / Академическая, 20

Дизайн и химический синтез новых соединений, разработка лекарственных средств – одно из ключевых направлений исследований современной медицинской химии, направленное на повышение качества и безопасности жизни человечества. Многие низкомолекулярные соединения обладают полезными физиологическими и лекарственными свойствами. Азотсодержащие соединения, включая гетероциклы, являются важными объектами для синтеза и изучения биологических свойств. Такие соединения входят в состав многих важных молекул, включая витамины, лекарственные препараты и другие средства, способные проявлять широкий спектр фармакологической активности.

Нами предложены подходы к синтезу гетероциклических соединений, относящихся как к классу бигуанидов, так и их предшественникам, являющихся потенциальными лекарственными препаратами (рис. 1) с широким спектром биологической активности.

Целевые соединения **1** и **2** (рис. 2) – структурный вариант модифицированных пуринов с разрушенным имидазольным циклом – представляют интерес для синтеза из производных пуринов (рис. 3) и могут проявлять разнообразную биологическую активность, как показали наши предварительные *in silico* расчеты.

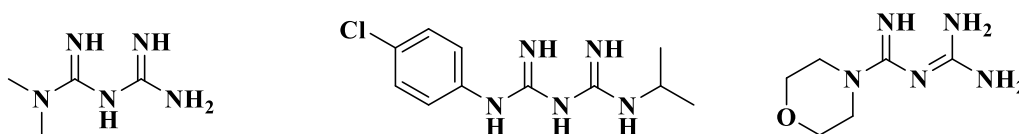


Рисунок 1. Лекарственные препараты класса бигуанидов

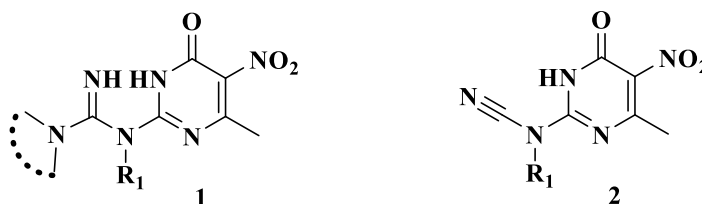


Рисунок 2. Целевые гетероциклические соединения



Пуриновый скаффолд

Пурин с раскрытым
имидазолом

Рисунок 3. Варианты модификации пуринов

Таким образом, нами предложены и сконструированы новые соединения, которые могут проявлять разнообразную фармакологическую активность.



IN SILICO ДИЗАЙН МУЛЬТИТАРГЕТНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Андрианов А.М.¹, Корноушенко Ю.В.¹, Королёва Е.В.², Игнатович Ж.В.²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, yurakorval@gmail.com

²Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220141, ул. Франциска Скорины, 36, evk@ichnm.by

Резюме. Осуществлен компьютерный дизайн 126 амидов 2-ариламинопиримидинового ряда – потенциальных мультитаргетных ингибиторов протеинкиназ Bcr-Abl, Bcr-Abl^{T315I}, mTOR и JAK2, играющих важную роль в развитии хронического миелоидного лейкоза. С помощью метода молекулярного докинга проведена оценка биологической активности сконструированных соединений по отношению к этим ферментам. В результате идентифицированы четыре соединения-лидера, эффективно взаимодействующие с АТФ-связывающими сайтами всех исследованных протеинкиназ. Выполнен анализ межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в структурных комплексах этих соединений с терапевтическими мишенями, и рассчитаны свободные энергии их образования. На основе полученных данных показано, что идентифицированные соединения формируют перспективные базовые структуры для разработки эффективных противоопухолевых препаратов нового поколения.

Ключевые слова. Хронический миелоидный лейкоз, ингибиторы протеинкиназ, молекулярное моделирование, противоопухолевые препараты.

Введение. Современный дизайн противоопухолевых препаратов все больше ориентируется на разработку полифункциональных ингибиторов, содержащих два и более фармакофора из разных лекарственных веществ, что усиливает активность соединений-предшественников и даже приводит к новым видам биологической активности за счет появления дополнительных взаимодействий с белком-мишенью [1]. Многофакторные процессы, ведущие к развитию и прогрессированию рака, влияют на многочисленные сигнальные пути и вызывают нарушение регуляции множества физиологических процессов. По этой причине лечение рака требует модуляции многих биологических мишеней для обеспечения достаточной терапевтической эффективности. Это достигается либо комбинированной терапией несколькими таргетными препаратами, либо применением мультитаргетных препаратов, воздействующих на несколько терапевтических мишеней и оказывающих аддитивное действие [1]. Одной из перспективных стратегий разработки таких мультитаргетных ингибиторов является дизайн химерных молекул на основе производных 2-ариламинопиримидина, которые наиболее часто используются в качестве базовых структур для создания низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ – органических соединений, проявляющих направленное патогенетическое действие.

Цель настоящей работы – осуществить дизайн и *in silico* оценку потенциальной противоопухолевой активности новых низкомолекулярных химических соединений на основе амидов 2-ариламинопиримидинового ряда, способных блокировать АТФ-связывающие сайты нативной Bcr-Abl тирозинкиназы, ее мутантной формы T315I, серин/треонин специфической протеинкиназы mTOR и тирозинкиназы JAK2 – ферментов, играющих важную роль в развитии хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ). В то время как Bcr-Abl протеинкиназа непосредственно связана с прогрессированием ХМЛ, активность протеинкиназ mTOR и JAK2 охватывает большую группу различных лейкозов и связана с резистентностью опухолей к ингибиторам и с пролиферацией опухолевых клеток [2].

Методология исследования. Методология дизайна мультитаргетных ингибиторов протеинкиназ базировалась на объединении 2-ариламинопиримидинового фрагмента –



основного фармакофора ингибиторов Bcr-Abl тирозинкиназы иматиниба и нилотиниба – с различными фрагментами азотсодержащих гетероциклических молекул, способных усиливать аффинность связывания лигандов за счет образования дополнительных прямых межатомных контактов с молекулярной мишенью. Для конструирования химерных молекул варьировали фармакофы в кислотном остатке амидов, изменяли положение заместителей в ариламинопиримидине, а также положение NH- и NHCO-групп. В результате были сконструированы структуры 126 амидов, эффективность связывания которых с протеинкиназами оценивали методом молекулярного докинга. Для генерации двумерных проекций координат атомов молекул использовали химический редактор ChemDraw 18.0 (<https://perkinelmerinformatics.com/products/research/chemdraw>), а затем с помощью программы Open Babel 2.4.1 рассчитывали трехмерные структуры этих соединений с последующей оптимизацией их геометрии и минимизацией энергии в силовом поле UFF (http://openbabel.org/wiki/Main_Page).

Молекулярный докинг. Подготовку соединений для молекулярного докинга осуществляли с помощью программного пакета MGLTools (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/>). Молекулярный докинг проводили с использованием программы AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>) в приближении жесткого рецептора и гибких лигандов. Трехмерные структуры протеинкиназ Bcr-Abl, Bcr-Abl^{T315I}, mTOR и JAK2 заимствовали из Банка данных белков (<https://www.rcsb.org>; PDB ID: 3KFA, 3OY3, 4JT5, 3KRR соответственно). Ячейки для докинга охватывали АТФ-связывающие сайты киназ. Параметр, характеризующий полноту поиска (охват конформационного пространства), был задан равным 100 (<https://vina.scripps.edu>).

Оценка аффинности связывания для комплексов лиганд/киназа. Значения свободной энергии связывания лигандов с протеинкиназами рассчитывали с помощью классической оценочной функции (ОФ) AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>) и двух функций машинного обучения – RF-Score-4 (<https://pjballester.wordpress.com/software/>) и NNScore 2.0 (<https://git.durrantlab.pitt.edu/jdurrant/nnscore2>). Затем для всех соединений определяли их ранги для каждой мишени согласно значению ОФ, и на основе этих данных вычисляли величину экспоненциального консенсусного ранга (ECR) [3]. На заключительном шаге для всех лигандов рассчитывали перекрестный экспоненциальный консенсусный ранг (crossECR) [3]. Лиганды, имевшие более низкие по сравнению с контрольными соединениями значения crossECR, относили к группе перспективных кандидатов на роль мультитаргетных противоопухолевых соединений, способных эффективно блокировать АТФ-связывающие сайты протеинкиназ Bcr-Abl, Bcr-Abl^{T315I}, mTOR и JAK2. В качестве контрольных соединений в расчетах использовали следующие ингибиторы: иматиниб и нилотиниб для Bcr-Abl киназы, понатиниб – для ее мутантной формы Bcr-Abl^{T315I}, торкиниб (PP242) – для протенкиназы mTOR и федратиниб – для тирозинкиназы JAK2.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных расчетов были отобраны четыре соединения-лидера, которые проявляют высокую аффинность связывания с АТФ-связывающими сайтами Bcr-Abl, Bcr-Abl^{T315I}, mTOR и JAK2 и, согласно данным перекрестного экспоненциального консенсусного ранжирования, характеризуются более низкими величинами crossECR по сравнению с ингибиторами протеинкиназ, использованными в качестве контрольных соединений.

Анализ структурных комплексов лиганд/киназа свидетельствуют о том, что идентифицированные соединения характеризуются близким механизмом взаимодействия с АТФ-связывающими сайтами рассматриваемых протеинкиназ, основу которого формируют ван-дер-ваальсовы силы, водородные связи, π - π -стэкинг и катион- π взаимодействия. При этом доминирующую роль в стабилизации структурных комплексов играют многочисленные ван-дер-ваальсовы контакты, в которые вовлечены функционально важные остатки активных центров ферментов. В частности, лучший среди обнаруженных соединений лиганд,



характеризующийся во всех рассмотренных случаях более низкими, по сравнению с контрольными ингибиторами, значениями свободной энергии связывания, формирует широкую сеть ван-дер-ваальсовых взаимодействий, а также водородные связи с остатками Asp-381 (Bcr-Abl киназа), Glu-286 (Bcr-Abl^{T315I}), Val-865 (mTOR) и His-994 (JAK2). Наряду с водородными связями, этот лиганд участвует в катион-π-взаимодействии с остатком Lys-271 Bcr-Abl^{T315I}, а также с остатками Lys-812 и His-965 mTOR. Кроме этого, это соединение образует π-стэкинг с π-сопряженными системами ароматических остатков Tyr-253 и Phe-359 Bcr-Abl, Phe-317 и His-361 Bcr-Abl^{T315I}, Tyr-2225, Trp-2239 и His-2340 mTOR и Tyr-934 JAK2.

Таким образом, результаты проведенных расчетов позволяют предположить, что идентифицированные соединения могут быть потенциально активными по отношению к АТФ-связывающим сайтам протеинкиназ Bcr-Abl, Bcr-Abl^{T315I}, mTOR и JAK2 и, поэтому, обладать мультикиназным профилем ингибиторной активности. Сравнительный анализ данных об аффинности связывания комплексов лиганд/киназа, полученных с привлечением трех различных оценочных функций, показывает, что использованный в настоящем исследовании, подход позволил избежать ложноположительных результатов и корректно оценить силу межмолекулярных взаимодействий. Идентифицированные соединения могут представлять интерес для экспериментального анализа с целью подтверждения *in vitro* их *in silico* свойств.

Заключение. Данные молекулярного моделирования показывают, что идентифицированные методами молекулярного моделирования производные 2-ариламинопиримидинового ряда могут быть использованы в качестве перспективных базовых структур для разработки новых мультитаргетных противоопухолевых препаратов, терапевтическое действие которых основано на совместной блокаде протеинкиназ Bcr-Abl, Bcr-Abl^{T315I}, mTOR и JAK2, играющих важную роль в развитии ХМЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds / Proschak E. [et al.] // J. Med Chem. – 2019. – Vol. 62(2). – P. 420-444.
2. Dual Kinase Targeting in Leukemia / Mologni L. [et al.] // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 13(1). – P. 119.
3. Exponential consensus ranking improves the outcome in docking and receptor ensemble docking / Palacio-Rodriguez K. [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9(1). – P. 5142.

IN SILICO DESIGN OF MULTITARGET ANTICANCER COMPOUNDS – POTENTIAL THERAPEUTIC AGENTS FOR THE TREATMENT OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Andrianov A.M.¹, Kornoushenko Yu.V.¹, Koroleva E.V.², Ignatovich Z.V.²

¹Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, yurakorval@gmail.com

²Institute of Chemistry of New Materials, National academy of sciences of Belarus, evk@ichnm.by

Computer-aided design of 126 amides of the 2-arylaminopyrimidine series, potential multitargeting inhibitors of protein kinases Bcr-Abl, Bcr-Abl^{T315I}, mTOR, and JAK2 which play an important role in the development of chronic myeloid leukemia, was carried out. Using molecular docking tools, the biological activity of the designed compounds towards these enzymes was evaluated. As a result, four top-ranking compounds that efficiently interact with the ATP-binding sites of all the above protein kinases were identified. Analysis of intermolecular interactions realized in the structural complexes of these compounds with the therapeutic targets has been performed and the free energies of their formation have been calculated. Based on the data obtained, the identified compounds were predicted to form promising basic structures for the development of potent anticancer drugs of a new generation.



ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА И КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ГЕНЕРАЦИИ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

Андрианов А.М.¹, Фурс К.В.², Шульдов Н.А.², Тузиков А.В.²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, alexande.andriano@yandex.ru

²Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220012, ул. Сурганова 6, tuzikov@newman.bas-net.by

Резюме. С помощью генеративной нейронной сети глубокого обучения осуществлен *de novo* дизайн потенциальных ингибиторов основной протеазы коронавируса SARS-CoV-2. Методами молекулярного моделирования построены комплексы сконструированных соединений с этой терапевтической мишенью и рассчитаны свободные энергии их образования. Обнаружены семь химических соединений, эффективно взаимодействующих с ферментом и характеризующихся низкими значениями свободной энергии связывания. На основе полученных данных показано, что идентифицированные соединения могут быть использованы в качестве базовых структур для разработки новых эффективных лекарственных препаратов против COVID-19.

Введение. В последние годы генеративные модели глубокого обучения нашли широкое применение в исследованиях по разработке лекарств *de novo* [1]. Благодаря огромному прогрессу методов глубокого обучения в настоящее время разработаны генеративные модели с различной архитектурой и разными методами обучения, использующие разные типы и структуры данных. Применение генеративных моделей глубокого обучения уже показало их способность генерировать молекулы, которые могут быть синтезированы, активны *in vitro*, стабильны и проявляют активность *in vivo* в моделях, связанных с различными заболеваниями [1]. Однако, несмотря на то что генеративные модели глубокого обучения становятся все более распространенными в био- и хемоинформатике, их потенциал в этой области еще не раскрыт в полном объеме. В связи с этим разработка и применение генеративных методов глубокого обучения для компьютерного конструирования потенциальных лекарственных препаратов имеют большое научное и практическое значение.

Цель исследования: с помощью разработанных ранее [2] генеративных моделей глубокого обучения осуществить *de novo* дизайн потенциальных ингибиторов основной протеазы (M^{Pro}; Main Protease) SARS-CoV-2 – фермента, критически важного для репликации и транскрипции вируса и, поэтому, представляющего перспективную мишень для конструирования эффективных противовирусных препаратов [3].

Для решения поставленной задачи были выполнены исследования, включающие:

1) генерацию потенциальных ингибиторов SARS-CoV-2 с заданной энергией связывания с каталитическим сайтом основной протеазы коронавируса; 2) молекулярный докинг и оценку аффинности связывания сгенерированных соединений с терапевтической мишенью; 3) молекулярную динамику (МД) комплексов потенциальных лигандов с M^{Pro} SARS-CoV-2 и расчет свободной энергии их образования; 4) анализ полученных результатов и отбор соединений, перспективных для тестирования *in vitro*.

Методология исследования. Разработанные модели нейронной сети [2] использовали для генерации широкого набора высокоаффинных лигандов каталитического сайта M^{Pro} SARS-CoV-2 с целью последующей идентификации потенциальных ингибиторов этого фермента методами молекулярного моделирования. В результате были получены линейные представления SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) для 128 955 молекул, трехмерные (3D) структуры которых восстанавливали из данного формата с помощью алгоритма, включавшего следующие этапы: 1) чтение структуры и генерация 2D проекций координат атомов молекул из описаний SMILES; 2) генерация 3D координат атомов молекул;



- 3) добавление атомов водорода; 4) оптимизация сгенерированной 3D структуры соединения;
- 5) проверка сохранения исходной стереохимии молекулы в полученных структурах.

Суммарное количество молекул, отобранных для построения комплексов этих соединений с M^{Pro} SARS-CoV-2 методами молекулярного докинга, составило 95 775. Молекулярный докинг проводили с помощью программы AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>) в приближении «жесткого» рецептора и «гибких» лигандов. Ячейка для докинга включала каталитический сайт M^{Pro} SARS-CoV-2 со следующими параметрами: $\Delta X = 19 \text{ \AA}$, $\Delta Y = 21 \text{ \AA}$, $\Delta Z = 23 \text{ \AA}$ с центром в точках $X = -20 \text{ \AA}$, $Y = 19 \text{ \AA}$, $Z = -26 \text{ \AA}$. Значение параметра ширины охвата конформационного пространства лигандов, определяющего количество независимых запусков процедуры конформационного поиска, задавали равным 100. Значения свободной энергии связывания лигандов с M^{Pro} SARS-CoV-2 рассчитывали с помощью классической оценочной функции AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>) и двух функций машинного обучения – RF-Score-4 (<https://pjballester.wordpress.com/software/>) и NNScore 2.0 (<https://git.durrantlab.pitt.edu/jdurrant/nnscore2>). Затем для всех соединений определяли их ранги согласно каждой оценочной функции и на основе этих данных вычисляли величину экспоненциального консенсусного ранга (ECR) [4]. В результате из 95 775 исходных молекул были отобраны лиганды, которые принадлежали к 11 группам с высшими значениями ECR, что позволило идентифицировать 39 соединений, комплексы которых с M^{Pro} SARS-CoV-2 анализировали методами молекулярной динамики.

Молекулярную динамику комплексов лиганд/M^{Pro} в воде выполняли в программном пакете Amber18 с использованием силовых полей Amber ff14SB (M^{Pro}) и GAFF (лиганды) (<https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>). Систему минимизировали методами наискорейшего спуска (500 шагов) и сопряженных градиентов (500 шагов), нагревали от 0 К до 300 К в течение 50 *ps* в рамках статистического ансамбля NVT и термостата Ланжевена, а затем уравнивали в течение 50 *ps* и давлении 1,0 *атм* (ансамбль NPT, баростат Берендсена). На заключительном шаге систему уравнивали в течение 0,5 *нс* при постоянном объеме и проводили молекулярную динамику длительностью 200 *нс* в изобарно-изотермических условиях при температуре 300 К и давлении 1 *атм*.

Результаты и их обсуждение. В результате выполненных МД расчетов идентифицированы семь соединений-лидеров, проявляющих высокое сродство к каталитическому сайту M^{Pro} SARS-CoV-2. Анализ МД траекторий комплексов этих соединений с основной протеазой коронавируса показал, что они относительно стабильны во временном интервале 150 *нс*, на что указывают низкие средние значения свободной энергии связывания и соответствующие им стандартные отклонения. С учетом стандартной ошибки метода MM/GBSA, составляющей 1–3 ккал/моль, эти значения как минимум сопоставимы с соответствующими величинами, рассчитанными с помощью идентичного вычислительного протокола для двух ингибиторов M^{Pro} SARS-CoV-2 со значениями $IC_{50} = 18 \pm 2 \text{ нМ}$ и $20 \pm 5 \text{ нМ}$ [5], использованных в расчетах в качестве позитивного контроля. Стабильность динамических структур комплексов лиганд/M^{Pro} подтверждают также данные о временных зависимостях среднеквадратичных отклонений положений атомов между их динамическими и стартовыми моделями, а также результаты анализа временных зависимостей свободной энергии связывания ΔG , указывающими на отсутствие тенденции к увеличению ее значений с течением времени.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования идентифицированных соединений в работах по созданию новых противовирусных препаратов – ингибиторов SARS-CoV-2, способных блокировать каталитический сайт основной протеазы коронавируса.

Заключение. Использование разработанных нами ранее [2] моделей генеративной нейронной сети совместно с методами молекулярного докинга и молекулярной динамики продемонстрировало их значительный потенциал для заполнения неисследованных областей



химического пространства новыми молекулами с заданными свойствами. Разработанные модели в сочетании с традиционными методами молекулярного моделирования могут стать продуктивной основой для идентификации новых перспективных соединений против COVID-19, терапевтическое действие которых основано на блокаде основной протеазы SARS-CoV-2.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проекты Ф21КОВИД-002, X21COVID-003, Ф21APMG-001) и Союзом международных научных организаций ANSO (ANSO-CR-PP-2021-04).

ЛИТЕРАТУРА

1. Advances and Perspectives in Applying Deep Learning for Drug Design and Discovery / Lipinski C.F. [et al.] / Front. Robotics and AI. – 2019. – Vol. 6. – Art. 108.
2. Разработка генеративной нейронной сети глубокого обучения для компьютерного дизайна потенциальных ингибиторов коронавируса SARS-CoV-2 / Шульдов Н.А. [и др.] // Мат. биол. и биоинф. – 2022. – Vol. 17(2). – P. 188-207.
3. An overview of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease inhibitors: peptidomimetics and small molecule chemotherapy / Pillaiyar T. [et al.] // J. Med.Chem. – 2016. – Vol. 59(14). – P. 6595-6628.
4. Exponential consensus ranking improves the outcome in docking and receptor ensemble docking / Palacio-Rodriguez K. [et al.] // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9(1). – Art. 5142.
5. Potent noncovalent inhibitors of the main Protease of SARS-CoV-2 from molecular sculpting of the drug perampanel guided by free energy perturbation calculations / Zhang C. H. [et al.] // ACS Central Science. – 2021. – Vol. 7(3). – P. 467-475.

APPLICATION OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE TECHNOLOGIES AND COMPUTER SIMULATION FOR GENERATION OF NEW POTENTIAL INHIBITORS OF SARS-CoV-2 MAIN PROTEASE

Andrianov A.M.¹, Furs K.V.², Shulda N.A.², Tuzikov A.V.²

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084 Belarus, alexande.andriano@yandex.ru*

²*United Institute of Informatics Problems, National Academy of Sciences of Belarus, Surganov str., 6, Minsk, Republic of Belarus, tuzikov@newman.bas-net.by*

Using a deep learning generative neural network, *de novo* design of potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease was carried out. Complexes of the designed compounds with this therapeutic target were built by molecular modeling and free energies of their formation were calculated. Seven chemical compounds effectively interacting with the enzyme and exhibiting the low binding free energies were found. Based on the data obtained, it was shown that the identified compounds can be used as good scaffolds for the development of novel effective drugs against COVID-19.



ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ВИРТУАЛЬНОГО СКРИНИНГА, МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ СЛИЯНИЯ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

Андрианов А.М.¹, Фурс К.В.², Юшкевич А.М.², Гончар А.В.², Тузиков А.В.²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, alexande.andriano@yandex.ru

²Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220012, ул. Сурганова 6, tuzikov@newman.bas-net.by

Резюме. С целью обнаружения потенциальных ингибиторов коронавируса SARS-CoV-2 сформирована виртуальная молекулярная библиотека, включающая 28 806 химических соединений из баз данных DrugBank, Zinc15 и Selleck Chemicals, которые находятся на разных стадиях биомедицинских испытаний или используются в клинической практике. Методами молекулярного моделирования проведена оценка аффинности связывания этих соединений с тримером HR1 S-белка SARS-CoV-2, который участвует в образовании 6-ти спирального пучка 6-НВ (six-helix bundle), инициирующего механизм слияния мембран вируса и клетки хозяина. В результате проведенных исследований идентифицированы 12 молекул, характеризующихся высоким химическим сродством к этому функционально важному участку оболочки вируса. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования этих соединений в работах по созданию новых противовирусных препаратов – ингибиторов слияния SARS-CoV-2, способных блокировать проникновение вируса в клетку хозяина.

Введение. Разработка ингибиторов коронавирусов, блокирующих их репликацию на различных этапах жизненного цикла, зависит от выявления консервативных и функционально важных целевых сайтов, которые могут быть использованы в качестве перспективных мишеней для создания противовирусных препаратов широкого спектра действия. Шиповидный белок оболочки коронавируса человека SARS-CoV-2 – этиологического агента COVID-19 – является трансмембранным гликопротеином класса I и включает две субъединицы S1 и S2, играющие ключевую роль в распознавании рецепторов, связывании, слиянии мембран и последующем проникновении вирусного генома в клетку-мишень [1]. Взаимодействие рецептор-связывающего сайта в субъединице S1 с клеточным рецептором ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) вызывает структурные изменения в субъединице S2, приводящие к обнажению пептида слияния и его внедрению в клеточную мембрану. Затем три спирали HR1 связываются друг с другом, образуя внутренний тример с тремя открытыми гидрофобными бороздками. Взаимодействие тримера HR1 со спиралью домена HR2 приводит к формированию консервативного 6-ти спирального пучка 6-НВ (six-helix bundle), инициирующего сближение мембран вируса и клетки-мишени [1]. Необходимо отметить, что образование 6-НВ, главным образом опосредованное областями HR1 и HR2 субъединицы S2 белка S, является общим для всех известных коронавирусов, включая доминирующий в настоящее время «омикрон»-штамм SARS-CoV-2 [2]. В связи с этим, представляется крайне перспективной стратегия создания противовирусных агентов широкого спектра действия, способных предотвращать образование 6-ти спирального пучка 6-НВ, критического для слияния мембран и инфективности вируса.

В настоящей работе методами виртуального скрининга идентифицированы малые молекулы, потенциально активные по отношению к домену HR1 белка S коронавируса. Для этого были проведены исследования, которые включали: 1) формирование виртуальной молекулярной библиотеки, содержащей соединения, находящиеся на стадиях лабораторных исследований, клинических испытаний или использования в медицинской практике; 2) молекулярный докинг этих соединений с доменом HR1 белка S SARS-CoV-2; 3) оценку аффинности связывания комплексов лиганд/HR1 с использованием оценочных функций



AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>), RF-Score-4 (<https://pjballester.wordpress.com/software/>) и NNScore 2.0 (<https://git.durrantlab.pitt.edu/jdurrant/nnscore2>) с последующим расчетом экспоненциального консенсусного ранга [3]; 4) молекулярную динамику (МД) комплексов лиганд/HR1 и отбор соединений, перспективных для тестирования на противовирусную активность.

Методология исследования. При формировании библиотеки биологически активных молекул учитывали следующие критерии: свободный академический доступ к данным, наличие структур соединений в формате файлов химических данных SDF (Structure Data File) (<https://www.fda.gov/media/151718/download>), активная поддержка баз данных и наличие информации о возможности синтеза и покупки молекулы. В соответствии с этими критериями были выбраны базы данных DrugBank (<https://go.drugbank.com/>), ZINC15 (<https://zinc.docking.org/>) и Selleck Chemicals (<https://www.selleckchem.com/>). В результате собранная виртуальная библиотека включала 28 806 соединений, потенциальную активность которых по отношению к домену HR1 SARS-CoV-2 оценивали методами молекулярного докинга. Подготовку соединений для молекулярного докинга осуществляли с помощью программного пакета MGLTools (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/>). Докинг проводили с использованием программы AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>) в приближении жесткого рецептора и гибких лигандов. Структуру домена HR1 выделяли из его комплекса с доменом HR2 белка S SARS-CoV-2 в кристалле (PDB ID: 6LXT). Параметр, характеризующий полноту поиска (охват конформационного пространства), был задан равным 100 (<https://vina.scripps.edu>). Молекулярную динамику комплексов лиганд/HR1 в воде выполняли в программном пакете Amber18 с использованием силовых полей Amber ff14SB (домен HR1) и GAFF (лиганды) (<https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>). Для задания парциальных зарядов атомов (модель AM1-BCC) использовали модуль Antechamber программного пакета AmberTools18 (<https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>). Атомы водорода добавляли с помощью программы tleap пакета AmberTools18. Комплексы помещали в кубическую коробку, заполняли растворителем (модель воды TIP3P; <https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>) и добавляли ионы Na^+ и Cl^- до значения ионной силы, равного 0,15 М. Систему минимизировали методами наискорейшего спуска (500 шагов) и сопряженных градиентов (500 шагов), нагревали от 0 К до 300 К в течение 50 *ps* в рамках статистического ансамбля NVT и термостата Ланжевена, а затем уравнивали в течение 50 *ps* и давлении 1,0 атм (ансамбль NPT, баростат Берендсена). На заключительном шаге систему уравнивали в течение 0,5 *ns* при постоянном объеме и проводили молекулярную динамику длительностью 150 *ns* в изобарно-изотермических условиях при температуре 300 К и давлении 1 атм.

Результаты и их обсуждение. В результате анализа полученных результатов были идентифицированы 12 соединений, лучших по значению экспоненциального консенсусного ранга и характеризующихся низкими значениями свободной энергии связывания с доменом HR1 S-белка SARS-CoV-2. Поэтому эти соединения были отобраны в качестве наиболее перспективных кандидатов для разработки эффективных ингибиторов слияния коронавируса. Исследование статических моделей комплексов лиганд/HR1 показывает, что все идентифицированные соединения связываются с гидрофобной бороздкой между спиралями тримера и образуют широкую сеть межмолекулярных взаимодействий, включающую многочисленные ван-дер-ваальсовы контакты, водородные связи и катион-π взаимодействия. При этом доминирующую роль в стабилизации структурных комплексов домена HR1 SARS-CoV-2 с лигандами играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия, в которые вовлечены остатки, важные для образования 6-ти спирального пучка 6-НВ. Данные молекулярной динамики согласуются с основными выводами, сделанными на основе анализа статических моделей комплексов лиганд/HR1. Эти комплексы стабильны в течение МД расчетов, на что указывают низкие значения свободной энергии связывания и соответствующие им стандартные



отклонения. Вывод о стабильности динамических структур лиганд/HR1 подтверждают также данные о временных зависимостях энергии связывания, свидетельствующие об отсутствии тенденции к увеличению значений ΔG с течением времени. Более того, комплексы пяти обнаруженных соединений с доменом HR1 демонстрируют снижение средних значений энергии связывания на заключительных участках МД траекторий длительностью 50 нс, что является дополнительным свидетельством их конформационной стабильности.

Заключение. Таким образом, данные об аффинности связывания предсказанных соединений с тримером HR1, полученные с использованием разных оценочных функций, согласуются друг с другом, свидетельствуя о том, что вычислительный подход, примененный в данном исследовании, позволил избежать ложноположительных результатов и правильно оценить силу межмолекулярных взаимодействий. В целом эти результаты обеспечивают убедительные доказательства того, что идентифицированные молекулы демонстрируют низкие значения свободной энергии связывания в комплексах с доменом HR1 и могут быть использованы в работах по созданию новых противовирусных препаратов – ингибиторов слияния SARS-CoV-2, блокирующих проникновение вируса в клетку хозяина.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект X21COVID-003).

ЛИТЕРАТУРА

1. Pan-Coronavirus Fusion Inhibitors as the Hope for Today and Tomorrow / Wang X. [et al.] // Protein Cell. – 2021. – Vol. 12(2). – P. 84-88.
2. Peptide-based pan-CoV fusion inhibitors maintain high potency against SARS-CoV-2 Omicron variant / Xia S. [et al.] // Cell Res. – 2022. – Vol. 32(4). – P. 404-406.
3. Exponential Consensus Ranking Improves the Outcome in Docking and Receptor Ensemble Docking / Palacio-Rodríguez K. [et al.] // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9(1). – P. 1-14.

APPLICATION OF VIRTUAL SCREENING, MOLECULAR DOCKING AND MOLECULAR DYNAMICS TO IDENTIFY NEW POTENTIAL SARS-CoV-2 FUSION INHIBITORS

Andrianov A.M.¹, Furs K.V.², Yushkevich A.M.², Gonchar A.V.², Tuzikov A.V.²

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, alexande.andriano@yandex.ru*

²*United Institute of Informatics Problems, National Academy of Sciences of Belarus,
Surganov str., 6, Minsk, 220012, Belarus, tuzikov@newman.bas-net.by*

To identify potential SARS-CoV-2 inhibitors, a virtual molecular library containing 28 860 chemical compounds from the DrugBank, Zinc15 and Selleck Chemicals databases that are at the stages of biomedical research or application in the clinic was formed. The binding affinity of these compounds to the HR1 trimer of the SARS-CoV-2 spike protein which is involved in the formation of the six-helix bundle (6-HB) critically important for the virus-cell membrane fusion was evaluated using molecular modeling tools. As a result, 12 molecules exhibiting a high binding affinity to this functionally important site of the viral envelope were identified. The data obtained indicate the promise of using these compounds in the development of novel antiviral drugs presenting the SARS-CoV-2 fusion inhibitors able to block the virus entry into the host cell.

Keywords. SARS-CoV-2, protein S, trimer HR1, SARS-CoV-2 fusion inhibitors, molecular modeling, antiviral drugs.



ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВОГО ТУБЕРКУЛЕЗА И ОЦЕНКА ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Андрианов А.М.¹, Фурс К.В.², Юшкевич А.М.², Гончар А.В.², Габриэлян А.³, Розенталь А.³,
Тузиков А.В.²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, alexande.andriano@yandex.ru

²Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Республика Беларусь,
г. Минск, 220012, ул. Сурганова 6, tuzikov@newman.bas-net.by

³Управление киберинфраструктуры и вычислительной биологии, Национальный институт
аллергии и инфекционных заболеваний, Национальные институты здравоохранения,
Бетесда, Мэриленд, США

Резюме. Методами молекулярного моделирования осуществлен виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов белка KasA – одного из ключевых ферментов, участвующих в биосинтезе компонентов клеточной стенки микобактерии *M. tuberculosis*. Проведена *in silico* оценка эффективности связывания белка KasA с соединениями из баз данных DrugBank, ZINC15 и Selleck Chemicals. Идентифицированы шесть молекул, проявляющих высокую аффинность связывания с каталитическим сайтом фермента. Показано, что эти соединения формируют перспективные базовые структуры для разработки новых антибактериальных препаратов для лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза.

Введение. Согласно Докладу Всемирной организации здравоохранения о глобальной борьбе с туберкулезом в 2021 г., пандемия COVID-19 серьезно подорвала успехи, достигнутые в борьбе с этим заболеванием во всем мире: впервые за более чем десять лет показатели смертности от туберкулеза возросли. Так, в 2020 г. от туберкулеза скончались 1,5 млн. человек (включая 214 000 пациентов с ВИЧ) и, по модельным прогнозам ВОЗ, в 2021 и 2022 гг. число заболевших и умерших в результате инфицирования туберкулезом людей будет гораздо выше (WHO. 2021, Global Tuberculosis Report). Туберкулез по-прежнему входит в десятку основных причин смертей во всем мире и является основной причиной гибели пациентов с ВИЧ и сахарным диабетом, что в первую очередь связано с резистентностью к используемым в клинической практике противомикробным препаратам. Увеличение распространенности лекарственной устойчивости представляет серьезную проблему для эффективной борьбы с туберкулезом. В связи с этим, одним из ключевых вызовов, стоящих перед научным сообществом, является лечение туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, что обуславливает актуальность, важность и практическую значимость исследований по разработке новых эффективных ингибиторов микобактерии *M. tuberculosis* – этиологического агента туберкулеза.

Целью работы является идентификация методами виртуального скрининга и молекулярного моделирования новых потенциальных ингибиторов лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, терапевтическое действие которых основано на блокаде белка KasA – одного из ключевых ферментов, участвующих в биосинтезе компонентов клеточной стенки микобактерии *M. tuberculosis*.

Методология исследования. Для проведения виртуального скрининга потенциальных ингибиторов белка KasA микобактерии *M. tuberculosis* использовали виртуальную молекулярную библиотеку, которая содержала 28 860 химических соединений из баз данных DrugBank (<https://go.drugbank.com/>), ZINC15 (<https://zinc.docking.org/>) и Selleck Chemicals (<https://www.selleckchem.com/>). Молекулярный докинг этих соединений с активным центром фермента KasA проводили с помощью программы AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>) в приближении жесткого рецептора и гибких лигандов. Структуру белка выделяли из его комплекса с ингибитором TLM5 [1] (PDB ID: 4C72). Ячейка для докинга включала область



интерфейса TLM5/KasA. Параметр, характеризующий полноту поиска (охват конформационного пространства), был задан равным 100 (<https://vina.scripps.edu>). Значения свободной энергии образования комплексов лиганд/KasA рассчитывали с помощью оценочных функций AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>), RF-Score-4 (<https://pjballester.wordpress.com/software/>) и NNScore 2.0 NNScore 2.0 (<https://git.durrantlab.pitt.edu/jdurrant/nnscore2>), а затем для каждого соединения вычисляли величину экспоненциального консенсусного ранга (ECR) [2]. Комплексы соединений с белком KasA, имеющих высокие значения ECR, исследовали методом молекулярной динамики (МД). Классическую динамику комплексов лиганд/KasA в воде выполняли с помощью программного пакета Amber18 с использованием силового поля Amber ff14SB (<https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>). После настройки системы атомы остова белка фиксировали дополнительным гармоническим потенциалом с силовой константой 2,0 ккал/моль/Å² и систему подвергали уравниванию с помощью модуля Sander программы Amber18 (<https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>). После достижения равновесия проводили молекулярную динамику в течение 200 нс в ансамбле NPT при температуре T = 300 К и давлении P = 1,0 атм. Анализ молекулярно-динамических траекторий выполняли для последних 80 нс с помощью модуля CPPTRAJ программы Amber18 (<https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>).

Во всех расчетах в качестве положительного контроля использовали аналог тиолактомицина (TLM) TLM5 – один из самых перспективных ингибиторов микобактерии *M. tuberculosis*, блокирующих каталитический сайт белка KasA [3].

Результаты и их обсуждение. Анализ статических моделей комплексов лиганд/белок показывает, что 6 соединений с лучшими значениями ECR согласно данным молекулярного докинга проявляют высокое сродство к ферменту и характеризуются более низкими значениями свободной энергии связывания по сравнению с ингибитором TLM5. Кроме того, эти соединения образуют широкую сеть межмолекулярных контактов с функционально важными остатками каталитического сайта фермента KasA, которые обеспечиваются главным образом множественными ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, водородными связями, π-π-стэкингом и солевыми мостиками. При этом основной вклад в энергетическую стабилизацию комплексов лиганд/KasA вносят ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Молекулярно-динамические расчеты подтверждают эти выводы: анализируемые комплексы стабильны на МД траекториях, о чем свидетельствуют средние значения свободных энергий связывания и соответствующие значения стандартной ошибки среднего. Анализ расчетных данных показывает, что эти средние значения значительно ниже величины, полученной с использованием идентичного вычислительного протокола для ингибитора *M. tuberculosis* TLM5. Анализируемые комплексы не претерпевают существенных структурных изменений на МД траекториях, что подтверждается средними значениями RMSD, рассчитанными для динамических моделей идентифицированных соединений, связанных с белком KasA. Расчет среднеквадратичных флуктуаций (RMSF, Root Mean Square Fluctuation) отдельных остатков KasA, указывающих на гибкость каждой аминокислоты во время МД моделирования, показывает, что большинство остатков фермента пространственно ограничены. Анализ величин RMSF указывает на небольшие структурные колебания остатков KasA как в комплексах с соответствующими соединениями, так и в несвязанной форме. Основные флуктуации наблюдаются на сегментах, расположенных за пределами каталитического сайта белка KasA. Средние значения RMSF для комплексов лиганд/KasA и белка в свободном состоянии примерно одинаковы и находятся в диапазоне от 0,53 до 0,60 Å. Важно отметить, что аминокислотные остатки KasA, расположенные в активном центре фермента, также пространственно ограничены, включая аминокислоты, которые преобладают в интерфейсе лиганд/KasA. Для этих критически важных остатков значения RMSF не превышают 1,0 Å. Эти данные свидетельствуют о том, что ключевые остатки фермента демонстрируют небольшие



внутренние движения, способствуя тому, чтобы рассматриваемые соединения могли блокировать каталитический сайт KasA.

Заключение. Данные молекулярного моделирования показывают, что идентифицированные в результате виртуального скрининга соединения могут эффективно блокировать активный центр фермента KasA путем многочисленных ван-дер-ваальсовых контактов, водородных связей, специфических π - π -взаимодействий и солевых мостиков. Эффективность межмолекулярных взаимодействий в комплексах лиганд/KasA подтверждают низкие значения свободной энергии связывания, что указывает на высокое сродство идентифицированных молекул с областью белка KasA, критически важной для биосинтеза компонентов клеточной стенки микобактерии *M. tuberculosis*.

Работа выполнена при поддержке Консорциума и Программы по разработке портала по лекарственно устойчивому туберкулезу [4] (<https://tbportals.niaid.nih.gov>).

ЛИТЕРАТУРА

1. Crystal Structures of Mycobacterium Tuberculosis KasA Show Mode of Action Within Cell Wall Biosynthesis and Its Inhibition by Thiolactomycin / Luckner S.R. [et al.] // Structure. – 2009. – Vol. 17(7). – P. 1004-1013.
2. Exponential Consensus Ranking Improves the Outcome in Docking and Receptor Ensemble Docking / Palacio-Rodríguez K. [et al.] // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9(1). – Art. 1.
3. Slow Onset Inhibition of Bacterial Beta-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthases by Thiolactomycin / Machutta C.A. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285(9). – P. 6161-6169.
4. The TB Portals: an Open-Access, Web-Based Platform for Global Drug-Resistant-Tuberculosis Data Sharing and Analysis / Rosenthal A. [et. al] // J. Clin. Microbiol. – 2017. – Vol. 77(1). – P. 3261-3282.

VIRTUAL SCREENING OF POTENTIAL INHIBITORS OF DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS AND EVALUATION OF THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY BY MOLECULAR MODELING METHODS

Andrianov A.M.¹, Furs K.V.², Yushkevich A.M.², Gonchar A.V.², Gabrielian A.³, Rosenthal A.³, Tuzikov A.V.²

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, 220084, Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, Belarus, alexande.andriano@yandex.ru*

²*United Institute of Informatics Problems, National Academy of Sciences of Belarus, 220012, Surganov Str. 6, Minsk, Belarus*

³*Office of Cyber Infrastructure & Computational Biology, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*

Using molecular modeling methods, a virtual screening of potential inhibitors of the KasA protein, one of the key enzymes involved in the biosynthesis of the components of the cell wall of mycobacterium *M.tuberculosis*, was carried out. An *in silico* assessment of the binding efficiency of the KasA protein to compounds from the databases DrugBank, ZINC15 and Selleck Chemicals was performed. Six molecules exhibiting a high binding affinity to the enzyme catalytic site have been identified. These compounds are shown to form good scaffolds for the development of novel antibacterial drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis.

Keywords. Drug-resistant tuberculosis, KasA protein, *M. tuberculosis* inhibitors, virtual screening, molecular modeling, antibacterial drugs.



ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ПЛАТИНЫ И РУТЕНИЯ С ЛИГАНДАМИ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДИБУФЕЛОНА

Антонец А.А., Ворошилкина К.М., Милаева Е.Р., Назаров А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119991, Ленинские горы д.1, с.3, antonets.anastasia.a@gmail.com

В клинической практике почти в половине всех химиотерапевтических схем лечения применяются препараты платины (II), однако их использование ограничивается серьезными побочными эффектами и первичной или приобретенной резистентностью некоторых видов рака. Актуальной задачей современной медицинской химии является разработка новых противоопухолевых агентов, которые были бы максимально избавлены от недостатков современных препаратов.

При дизайне новых металлосодержащих противоопухолевых соединений используются различные подходы, включающие в себя как варьирование металлического центра, так и модификацию его лигандного окружения.

Одним из перспективных направлений исследований является разработка соединений платины (IV) – пролекарств, демонстрирующих меньшую токсичность, чем исходные препараты платины (II). Еще одним подходом к модификации может являться переход к другому металлу. Большой интерес в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов представляют соединения рутения, позволяющие во многом преодолеть проблему высокой общей токсичности и резистентности.

Представленная работа была направлена на получение и изучение пролекарств Pt (IV) и соединений Ru(II) и Ru(III) с пространственно-затрудненным фенолом – лекарственным препаратом Дибуфелон в качестве органического лиганда. Благодаря разнице антиоксидантной активности фенольного лиганда в здоровых и опухолевых клетках введение данного пространственно-затрудненного фенола может обеспечить снижение токсичности полученных соединений по отношению к здоровым клеткам.

Был осуществлен синтез соединений Pt(IV) – комплексов на основе используемых в практике лекарственных препаратов цисплатина и оксалиплатина содержащих один или два лиганда Дибуфелона. Были также синтезированы три серии соединений рутения – металлоорганические соединения Ru(II) типа RAPTA, содержащие в качестве лигандов атомы хлора или остатки дикарбоновых кислот и комплексы Ru(III) типа NAMI. Во всех соединениях рутения варьировались длины линкеров, связывающих антиоксидантный фрагмент и рутениевый центр. Полученные соединения были полностью охарактеризованы с использованием методов ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и элементного анализа.

Для оценки антипролиферативной активности исследуемых соединений использовали МТТ-тест, который основан на способности оксидоредуктаз метаболически активных клеток восстанавливать тетразолиевый краситель МТТ в нерастворимый формазан. Антипролиферативная активность соединений исследовалась на клеточных линиях рака легкого A549, рака толстой кишки HCT116, рака молочной железы MCF7, а также на клеточной линии фибробластов легкого WI38. Полученные значения концентраций полуингибирования (IC_{50}) показали, что соединения платины демонстрируют активность, сопоставимую или превышающую активность контрольного соединения цисплатина. Для соединений рутения полученные значения IC_{50} лежат в диапазоне микромолярных концентраций. Комплексы Ru(III) значительно менее активны, чем соединения Ru(II). Была также показана зависимость антипролиферативной активности соединений от длины линкера – увеличение длины линкера позволило добиться повышения активности соединений.

Для оценки антиоксидантной активности соединений рутения использовали модельные эксперименты – DPPH и CUPRAC тесты. Полученные результаты продемонстрировали, что соединения являются перспективными антиоксидантами.



Выполненная работа позволила выявить зависимости между структурными особенностями комплексов и их активностью. Было показано, что введение атома металла значительно повышает антиоксидантную активность фенольных лигандов. Среди комплексов платины в качестве соединения-хита можно выделить комплекс на основе оксалиплатина с двумя лигандами Дибуфелона. В случае соединений рутения наибольший интерес в качестве антипролиферативных агентов представляют соединения Ru(II). Модификация данных комплексов путем увеличения длины линкера позволила добиться значительного повышения антипролиферативной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 22-63-00016).

ANTITUMOR PLATINUM AND RUTHENIUM COMPOUNDS WITH LIGANDS BASED ON DIBUPHELON

Antonets A.A., Voroshilkina K.M., Milaeva E.R., Nazarov A.A.

*Lomonosov Moscow State University, Russian Federation, 119991, Moscow, Leninskie Gory 1/3,
antonets.anastasia.a@gmail.com*

The presented work is devoted to the Pt(IV) prodrugs and Ru(II) and Ru(III) compounds with Dibuphelon as an organic ligand. Dibuphelon is a sterically hindered phenol drug, which possess different antioxidant activity in healthy and tumor cells. The introduction of this sterically hindered phenol can reduce the toxicity of the obtained compounds with respect to healthy cells.

The Pt(IV) compounds based on cisplatin and oxaliplatin were synthesized. Organometallic Ru(II) compounds of the RAPTA type containing chlorine atoms or dicarboxylic acid residues as ligands, and Ru(III) complexes of the NAMI type were also synthesized. In all ruthenium compounds, the lengths of linkers linking the antioxidant fragment and the ruthenium center were varied. The resulting compounds were fully characterized using NMR spectroscopy, mass spectrometry and elemental analysis.

The antiproliferative activity of the compounds was studied on A549, HCT116, MCF7 and WI38 cell lines. The resulting half-inhibition concentration (IC_{50}) values indicated that the platinum compounds exhibited activity comparable to or greater than that of the reference cisplatin compound. The ruthenium compounds IC_{50} values are in the micromolar concentration range. Ru(III) complexes are much less active than Ru(II) compounds. The antioxidant activity of ruthenium compounds was studied with DPPH and CUPRAC assays. The results obtained demonstrated that the compounds are promising antioxidants.

Structure-activity relationships were identified. It was shown that the introduction of a metal atom significantly increases the antioxidant activity of phenolic ligands. Among the platinum complexes, a complex based on oxaliplatin with two Dibufelon ligands can be distinguished as a hit compound. In the case of ruthenium compounds, Ru(II) compounds are of the greatest interest as antiproliferative agents. Modification of these complexes by increasing the length of the linker made it possible to achieve a significant increase in antiproliferative activity.



ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ, ВНЕДРЕНИЯ, ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И УЛУЧШЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ КАЧЕСТВА НА ПРИМЕРЕ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ЦЕНТРА «ХИМФАРМСИНТЕЗ»

Артёменко С.В.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, artuomenko@iboch.by

Первоочередной задачей фармацевтического предприятия является разработка, внедрение и поддержка функционирования Фармацевтической системы качества (ФСК). ФСК обеспечивает соответствие выпускаемых предприятием лекарственных препаратов регистрационному досье, а также их качество, безопасность и эффективность.

Нормативные правовые акты в области производства лекарственных препаратов устанавливают общие требования к ФСК, регламентируя обязанности ключевого персонала и устанавливая требования в отношении риск-ориентированной надлежащей производственной практики, при этом оставляя на усмотрение производителя включение в ФСК процессов разработки и постановки продукции на производство, дистрибьюторской практики и фармаконадзора [1-3].

Сложившаяся практика на предприятиях фармацевтической отрасли имеет не только региональные отличия, но и значительные отличия в организации обеспечения качества производителей в зависимости от номенклатуры выпускаемой продукции, формы собственности, численности персонала и его компетентности. Особенное значение для эффективности ФСК представляет обмен опытом применения современных методов и технологий в области управления качеством между предприятиями отрасли.

В 2014 году в НПЦ «ХимФармСинтез» была создана успешно функционирующая ФСК. В настоящее время ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» получены 30 регистрационных удостоверений на активные фармацевтические субстанции и лекарственные препараты, в том числе на оригинальные лекарственные препараты собственной разработки. Продукция НПЦ «ХимФармСинтез» представлена на фармацевтическом рынке Республики Беларусь, стран ЕАЭС и Европейского союза. Результатом функционирования эффективной ФСК является ежегодное увеличение прибыли предприятия и отсутствие претензий к качеству производимых лекарственных препаратов.

Стендовый доклад представляет структуру ФСК и роль обеспечения качества в управлении всеми процессами надлежащей производственной практики НПЦ «ХимФармСинтез» с практическими примерами документирования, переоценки полученного опыта обеспечения качества и улучшения процедур.

ЛИТЕРАТУРА

1. ТКП 030-2017 (33050) Надлежащая производственная практика. Министерство здравоохранения Республики Беларусь. Минск, 2017.
2. Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77.
3. ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system. EMA/CHMP/ICH/214732/2007.



THE FEATURES OF THE DEVELOPMENT, IMPLEMENTATION, FUNCTIONING AND
IMPROVEMENT OF THE PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM ON THE
EXAMPLE OF THE SCIENTIFIC AND PRODUCTION CENTER
"CHEMPHARMSYNTHESIS"

Artyomenko S.V.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, 220084, Minsk, Belarus, artyomenko@iboch.by*

The poster presents the structure of Pharmaceutical Quality System and the role of the quality assurance in managing all processes of good manufacturing practice at SPC "ChemPharmSynthesis" with practical examples of documenting, re-evaluating the experience gained in quality assurance and improving procedures.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ МИЗОРИБИНА И ЗЕБУЛАРИНА: КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФОСФОРИЛАЗ ИЗ *E. COLI*

Артемьева Ю.Н.¹, Есипов Р.С.², Мирошников А.И.², Михайлопуло И.А.¹

¹*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, imikhailopulo@gmail.com*

²*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Российская Федерация, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10, 117997 ГСП-7*

Механизм узнавания субстрата в каталитическом центре нуклеозид фосфорилаз (NP) из *E. coli*, его активация и образование гликозидной связи в каталитическом центре фермента представляет значительный интерес для оптимизации этих процессов и расширения возможностей био-катализа в синтезе биологически значимых нуклеозидов. В настоящей работе мы рассмотрели наиболее вероятные пути узнавания и активации двух гетероциклических оснований, 5-гидрокси-1*H*-имидазол-4-карбоксамида (1) и пиримидин-2(1*H*)-она (2), являющихся агликонами нуклеозидных антибиотиков мизорибина (MZR) и зебуларина (ZBR), соответственно.

Оба нуклеозидных антибиотика изучаются с конца 1960-х – начала 1970-х годов, обладают широким спектром биологической активности и представляют значительный интерес для молекулярной биологии и медицины. Всестороннее изучение биологических свойств MZR привело к открытию высокой иммунодепрессивной активности, и после клинических испытаний в 1984 и 1990 годах MZR (1) был одобрен в Японии при трансплантации почки для предотвращения отторжения, и ZBR (2) в качестве первого препарата для лечения волчаночного нефрита. MZR в клетке трансформируется в 5'-монофосфат (MZR-MP), который ингибирует образование гуанозин-5'-монофосфата (GMP) из инозин-5'-монофосфата (IMP), тем самым снижая внутриклеточный пул GTP. Этот механизм отвечает за иммунодепрессивную и противовирусную активность MZR, в частности, против вирусов гепатита С (HCV) и SARS-CoV.

Противоопухолевый потенциал ZBR привлек внимание биохимиков и фармакологов с момента первого химического синтеза в 1964 г этого соединения. В очень сложной биохимии метилирования ДНК, в частности биохимии опухолевых клеток, ZBR ингибирует репликацию клеток и при этом обнаруживает ряд преимуществ в сравнении с одобренными FDA (USA) препаратами, 5-азацитидином (Vidaza®) и 5-аза-2'-дезоксцитидином (Dacogen®): ZBR является более стабильным и менее токсичным, что делает его перспективным для перорального применения.

В настоящей работе изучен ферментативный синтез MZR и ZBR с использованием α-D-рибофуранозо-1-фосфата и соответствующих гетероциклических оснований в качестве



субстратов NP из *E. coli*. С этой целью мы провели квантово-химический анализ наиболее вероятных промежуточных молекулярных структур на пути от гетероциклического основания к нуклеозиду, под действием ферментов, с одной стороны, и протестировали субстратные свойства (i) MZR по отношению к пурииннуклеозид (PNP) и уридин (UP) фосфорилазам и (ii) ZBR по отношению к тимидин фосфорилазе (TP) и UP, с другой стороны. Установлено, что в стандартных условиях реакции, фосфорилиз MZR протекает более эффективно под действием PNP, а в опытах с ZBR – при участии UP. На основании этих данных были предложены эффективные ферментативные методы синтеза обоих нуклеозидных антибиотиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mizoribine: A New Approach in the Treatment of Renal Disease / Y. Kawasaki // Clin. Dev. Immunol. – 2009. – Vol. 2009. – Art. ID 681482.
2. DNA Methyltransferase Inhibitor Zebularine Induces Human Cholangiocarcinoma Cell Death through Alteration of DNA Methylation Status / K. Nakamura [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10(3). – Art. e0120545.

AN ENZYMATIC SYNTHESIS OF MIZORIBINE AND ZEBULARINE: QUANTUM CHEMICAL INSIGHT IN THE MECHANISM OF *E. COLI* PHOSPHORYLASES PROCESSING

Julia N. Artsemyeva¹, Roman S. Esipov², Anatoly I. Miroshnikov², Igor A. Mikhailopulo¹

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
220084, Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, Belarus, imikhailopulo@gmail.com*

²*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Miklukho-Maklaya 16/10, 117997 GSP-7, Moscow B-437, Russian Federation*

An enzymatic synthesis of the nucleoside antibiotics *mizoribine* [MZR; 4-carbamoyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-1*H*-imidazol-3-ium-5-olate)] and *zebularine* [ZBR; 1-(β -D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one] by the condensation of α -D-ribofuranose-1-phosphate (RF-1P) and the corresponding aglycones catalyzed by nucleoside phosphorylases (NPs) from *E. coli* is suggested. Quantum-chemical analysis (QCA) of the most probable intermediate electronic structures on the path of transformation of heterocyclic bases-aglycones into MZR and ZBR was carried out by the *ab initio* 6-31G** method. Aglycone of MZR showed excellent substrate activity against purine nucleoside phosphorylase (PNP) from *E. coli*, which is fully consistent with the data of quantum chemical analysis. Aglycone of ZBR showed moderate substrate activity for uridine (UP) and thymidine (TP) phosphorylases and unexpectedly displayed higher activity in the presence of both enzymes, which is maybe in part due to differences in the mechanisms of substrate recognition and activation by these enzymes. These studies are presently in progress.

21,22-CYCLOSTEROIDS AND THEIR DERIVATIVES: SYNTHESIS AND ANTIANDROGENIC EFFECTS

Barysevich M.V.¹, Laktsevich-Iskryk M.V.¹, Scherbakov A.M.², Salnikova D.I.², Andreeva O.E.², Sorokin D.V.², Shchegolev Y.Y.², Hurski A.L.¹, Zhabinskii V.N.¹, Khripach V.A.¹

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, MBorisevich@iboch.by*

²*Department of Experimental Tumor Biology, Blokhin N.N. National Medical Research Center of
Oncology, the Ministry of Health of the Russian Federation*

Steroids represent one of the diverse classes of natural compounds with a very broad spectrum of activities. They are extensively applied in the pharmaceutical field, including the treatment of cancer [1,2]. Here we present synthesis and subsequent biological activity evaluation of 21,22-cyclosteroids and their derivatives using an effective divergent approach based on the reaction of diastereoselective hydroxycyclopropanation of 17-vinyl steroids with esters (Fig. 1) [3]. Versatility of the hydroxycyclopropanes as synthetic intermediates allows the simple preparation of diverse steroidal products bearing a small ring, a linear/branched saturated or unsaturated ketone unit as well as aryl or alkyl substituent at C21 in the side chain from a common precursor.

Screening for antiproliferative activity has shown that C-22-alcohol **1b** and steroidal cyclopropanol derivative **2a** were most efficient against AR-positive 22Rv1 prostate cancer cells at concentration of 15 μ M and 14.6 μ M, respectively. The latter has been chosen for in-depth study. Its antiandrogenic activity was determined and its effect on the expression of cyclin D1 and BCL2 was established. It was found that cyclosteroid **2a** caused a decrease in the expression of AR-V7, the splicing form of the androgen receptor that is associated with resistance to hormone therapy. Moreover, it reduced PSA expression at a concentration of 10 μ M.

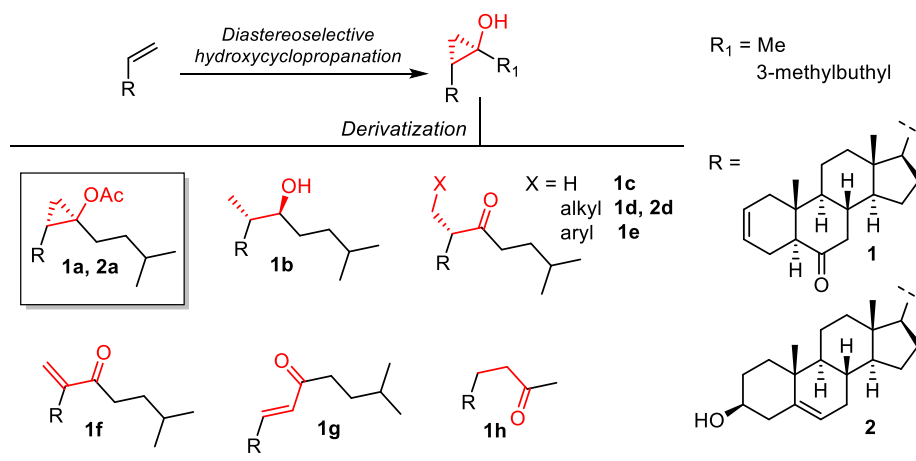


Figure 1.

The financial support by the Belarusian Foundation for Fundamental Research (project X19PM-074) and the Russian Foundation for Basic Research (project 19-515-04009) is greatly appreciated.

REFERENCES

1. Man-Made Cytotoxic Steroids: Exemplary Agents for Cancer Therapy / Bansal R., Acharya P.C. // Chem. Rev. – 2014. – Vol. 114. – P. 6986-7005.
2. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds // Salvador J.A. [et al.] // Nat. Prod. Rep. – 2013. – Vol. 30. – P. 324-374.
3. Stereoselective synthesis of α -methyl and α -alkyl ketones from esters and alkenes via cyclopropanol intermediates / Barysevich M.V. [et al.] // Chem Commun. – 2018. – Vol. 54. – P. 2800.



БИОКОМПЛЕКС НИКЕЛЬ-ЦИНКОВЫЙ ФЕРРИТ/ ГРИБНОЙ ХИТОЗАН ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Беляева И.Д.¹, Беляева А.Д.¹, Мартинсон К.Д.², Няникова Г.Г.¹

¹Санкт-Петербургский технологический институт (технический университет), кафедра технологии микробиологического синтеза, Россия, 190013, г. Санкт-Петербург, пр-т. Московский, 26, belyaevairina97@gmail.com

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, Россия, 194021, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 26

Ферриты различного состава, в основном, известны благодаря их широкому использованию для производства электронных компонентов различного назначения. Функциональные свойства этих материалов постоянно улучшаются за счёт структурных, микроструктурных и морфологических модификаций. Ферриты используются с целью получения керамики для гражданского и военного назначения; в качестве катализаторов, фотокатализаторов; как сорбенты для очистки сточных вод; для создания антимикробных материалов [1,2].

Для модификации поверхности ферритов с целью получения новых функциональных материалов используются различные биополимеры. Из-за их уникальных свойств, таких как высокая адсорбционная способность, селективность, биосовместимость, экологичность и экономичность, возможно создание различных комплексов феррит-биополимер. Также биополимеры увеличивают гидрофильность наноструктур и повышают стабильность получаемых комплексов [3-5].

Комплексы ферритов с биополимерами используются в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии; для создания биосенсоров (например, для биосенсора общего холестерина, глюкозы, бактерий, вирусов, нейротоксинов и др.); в качестве антимикробных материалов [1,3-5].

Задача исследования состояла в получении биоконкомпозитов на основе никель-цинкового феррита и хитозана для дальнейшего применения в медицине.

Синтез никель-цинкового феррита состава $\text{Ni}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ проводили в две стадии. На первом этапе синтеза исходный рентгеноаморфный порошок получали в условиях растворного горения раствора с существенным недостатком органического топлива, а на втором этапе синтезированные продукты подвергали термообработке на воздухе при температуре 650°C в течение 5 ч. Для полученного феррита проводили физико-химическую характеристику с использованием рентгенофазного и рентгеноструктурного анализов, ИК-спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии и др.

Хитозан получали биотехнологическим путём из гриба *Rhizopus oryzae*, культивированного на гороховом отваре следующего состава, г/л: горох – 50; глюкоза – 5,0; аммония сульфат – 10,0; условия культивирования: с использованием качалочной установки на скорости вращения 220 об/мин, при температуре 28°C, в течение 72 часов. После культивирования биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием с помощью колбы Бунзена и воронки Бюхнера, используя капроновую ткань, затем сушили до постоянной массы при температуре 50°C и размельчали с помощью измельчителя. К измельченной биомассе добавляли 1 М раствор NaOH в соотношении масса биомассы (г) : объем 1 М раствора NaOH (мл) = 1 : 5 и автоклавировали при избыточном давлении 101 кПа в течение 15 мин. Осадок промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH. Затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин., сливали надосадочную жидкость и высушивали при температуре 50°C до постоянной массы. После чего повторно измельчали, затем обрабатывали 1 М раствором HCl в соотношении масса биомассы (г): объем 1 М раствора HCl (мл) = 1 : 5 при постоянном перемешивании (500 об/мин) в течение 40 мин. Осадок промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH, центрифугировали



при 5000 об/мин в течение 15 мин., сливали надосадочную жидкость и снова высушивали при температуре 50°C до постоянной массы. Для полученного хитозансодержащего комплекса определяли массовую долю хитозана, его молекулярную массу, степень деацетилирования и другие физико-химические характеристики.

Для модификации поверхности феррита $\text{Ni}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ хитозаном грибного происхождения готовили 2%-ный раствор хитозана, смешивая 50 мл 5%-ного раствора уксусной кислоты и 1 г хитозана и перемешивая полученную суспензию в течение 1 часа при 300 об/мин. Затем к нему прибавляли предварительно приготовленный 2%-ный водный раствор феррита и перемешивали в течение 1 часа при 300 об/мин. Полученный комплекс добавляли к 50 мл 0,5 М раствора NaOH-10% глутарового альдегида и снова перемешивали в течение 1 часа при 300 об/мин. Полученный биокомпозит оставляли на 12 часов, затем промывали дистиллированной водой, фильтровали и сушили при 50°C.

Первичную оценку эффективности проведенного синтеза проводили методом сканирующей электронной микроскопии на приборе Vega 3 SBH (Tescan) с INCA-200-детектором в Инжиниринговом центре СПбГТИ (ТУ). Морфология и химический состав полученного биокомпозита показали, что покрытие исследуемого феррита хитозаном грибного происхождения прошло успешно.

Была исследована антимикробная активность полученного комплекса комплекса с помощью метода лунок (агаризованные среды: гидролизат мясной ферментативный – для бактерий; Сабуро – для дрожжей). Инокулюмы готовили из суточной культуры микроорганизмов в 0,9%-ном растворе натрия хлорида в соответствии со стандартом мутности 0,5 по МакФарланду. Установлено, что полученный биокомплекс никель-цинковый феррит/грибной хитозан проявляет антимикробную активность как в отношении грамположительных культур (*Bacillus cereus*), так и в отношении грамотрицательных (*Escherichia coli*), а также в отношении дрожжей (*Candida tropicalis*).

Отмечено, что полученный комплекс в будущем может найти применение в качестве антимикробного агента для медицинских целей, например, для ускорения регенерационных процессов кожи при заживлении ран и порезов; для таргетной доставки лекарств внутри организма человека и др. Также, благодаря ярко выраженным сорбционным свойствам хитозана и никель-цинкового феррита возможно его рассмотрение в качестве сорбента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-03-00976.

ЛИТЕРАТУРА

1. Recent advances on synthesis, characterization and high frequency applications of Ni-Zn ferrite nanoparticles / Thakur P. [et al.] // J. Magn. Magn. Mater. – 2021. – Vol. 530. – Art. 167925.
2. Synthesis, Structure, and Antimicrobial Performance of $\text{Ni}_x\text{Zn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ($x = 0, 0.3, 0.7, 1.0$) Magnetic Powders toward *E. coli*, *B. cereus*, *S. citreus*, and *C. tropicalis* / Martinson K.D. [et al.] // Water. – 2022. – Vol. 14. – Art. 454.
3. Magnetic zinc ferrite–chitosan bio-composite: synthesis, characterization and adsorption behavior studies for cationic dyes in single and binary systems / Kumar M., Dosanjh H.S., Singh H. // J. Inorg. Organomet. Polym. – 2018. – Vol. 28. – P. 880-898.
4. Chitosan-coated ferrite (Fe_3O_4) nanoparticles as a T2 contrast agent for magnetic resonance imaging / Hong S., Chang Y., Rhee I // J. Korean Phys. Soc. – 2010. – Vol. 56. – P. 868-873.
5. Highly efficient bienzyme functionalized biocompatible nanostructured nickel ferrite–chitosan nanocomposite platform for biomedical application / Singh J. [et al.] // The Journal of Physical Chemistry. – 2013. – Vol. 117. – P. 8491-8502.



NICKEL-ZINC FERRITE/FUNGAL CHITOSAN BIOCOMPLEX FOR MEDICAL APPLICATION

Beliaeva I.D.¹, Beliaeva A.D.¹, Martinson K.D.², Nianikova G.G.¹

¹*Saint-Petersburg State Institute of Technology, belyaevairina97@gmail.com*

²*Ioffe Physical Technical Institute*

The aim of the study was to obtain a biocomplex based on nickel-zinc ferrite and fungal chitosan. The initial ferrite with the composition $\text{Ni}_{0.8}\text{Zn}_{0.2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ was synthesized in a powder form using solution combustion method. Fungal chitosan was obtained biotechnologically from *Rhizopus oryzae*. The ferrite surface was modified by chitosan with 0.5 M sodium hydroxide / 10% glutaraldehyde. SEM+EDX has shown the efficiency of the biocomposite synthesis. Additionally, antimicrobial activity of the obtained complex was determined against *B. cereus*, *E. coli* and *C. tropicalis*.

КОМПЛЕКСЫ ОЛОВА НА ОСНОВЕ АБИРАТЕРОНА И ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Берсенева Д.А., Грачева Ю.А., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, г. Москва,
ул. Ленинские горы, д.1, стр.3, bersenevada1410@gmail.com*

Введение. Онкологические заболевания относятся к социально значимым и представляют серьезную проблему здравоохранения в мире, при этом число пациентов с диагнозами различного типа рака непрерывно растет. В 2020 году рак был лидирующим по смертности заболеванием, насчитывающим около 10 млн летальных исходов. В настоящее время в терапевтические схемы лечения рака включен большой ряд препаратов, существенную группу которых составляют препараты на основе соединений платины, однако их применение сопровождается часто возникающей резистентностью опухолей, высокой токсичностью и тяжелыми побочными эффектами: нефротоксичность, нейротоксичность, ототоксичность и др. Для преодоления этих недостатков в настоящее время интенсивно исследуются соединения других металлов помимо платины, в том числе соединения олова в качестве противоопухолевых средств. Современная медицинская химия предлагает подходы к созданию лекарственных средств, основанные на лидирующей концепции мишени, для терапии различных заболеваний.

Нами была разработана стратегия конструирования низкомолекулярных синтетических мишень-ориентированных (таргетных) молекул, заключающаяся в химическом комбинировании координационных соединений металлов и природных и/или модифицированных стероидов, а также известных лекарственных препаратов как кандидатов лекарственных средств антипролиферативного/цитостатического, противовоспалительного и/или цитопротекторного действия, способных селективно воздействовать на фармакологически значимые мишени [1]. В качестве лигандов могут быть использованы стероиды, которые характеризуются богатым структурным молекулярным разнообразием, способностью взаимодействовать с различными биологическими мишенями и вызывают большой интерес в терапии широкого спектра онкологических заболеваний [2].

Ранее нами получены цитотоксические комплексы Sn(IV) на основе стероидных холановых кислот. Методом проточной цитофлуориметрии показано, что комплексы олова индуцируют апоптоз. С помощью метода совместного культивирования раковых и условно нормальных клеток обнаружена селективность действия комплексов олова по отношению к раковой клеточной линии A549 (карцинома легкого) по сравнению с нормальными клетками. Значения концентрации полумаксимальной выживаемости клеток для карбоксилатов



трифенилолова на основе холевой, литохолевой и дезоксихолевой кислот (IC_{50}) лежат в наномолярном диапазоне [3].

Известный фармацевтический препарат стероидного типа абиратерон ((3 β)-17-(пиридин-3-ил)андроста-5,16-диен-3-ол в виде ацетата, LOAc) применяется для лечения метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы. Механизм его действия связан с ингибированием биосинтеза андрогенов, а также с подавлением активности фермента 17 α -гидроксилазы/C17,20-лиазы (CYP17). Этот фермент экспрессируется и является необходимым для биосинтеза андрогенов в яичках, надпочечниках и клетках опухоли предстательной железы [4].

Цель настоящей работы – синтез новых гибридных комплексов олова (IV), содержащих фрагмент абиратерона, и исследование их цитотоксической активности на различных раковых клеточных линиях.

Методы исследования. Все соединения охарактеризованы с помощью 1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. В работе проведено исследование цитотоксичности соединений с помощью МТТ теста на различных раковых клеточных линиях: PC3 (простата), MCF-7 (молочная железа), HCT-116 (толстая кишка), A549 (легкое).

Результаты. Нами синтезированы две серии комплексов диалкил/фенил- и трифенилгалогенидов Sn(IV) с абиратероном (LOH) и ацетатом абиратерона (LOAc): $R_2SnCl_2 \cdot LOH/LOAc$, где $R = Me, Et; Bu, Ph$ и $Ph_3SnCl \cdot LOH(LOAc)$, взаимодействием спиртовых растворов оловоорганических хлоридов с соответствующим лигандом в эквимолярном соотношении. Поскольку в спектрах ЯМР 1H комплексов наблюдаются существенные сдвиги сигналов пиридинового заместителя в абиратероне по сравнению с исходным лигандом, то можно сделать вывод о том, что комплексообразование между атомом Sn(IV) и лигандом осуществляется посредством атома азота пиридинового цикла.

Обнаружено, что цитотоксичность комплексов Sn(IV) зависит от природы органической группы при атоме Sn и типа клеток (IC_{50} лежат в диапазоне 0,1-12,4 μM), что ниже, чем для исходного LOAc ($IC_{50} = 16,1-100 \mu M$). Наиболее токсичным оказалось достаточно липофильное соединение $Ph_3SnCl \cdot LOAc$ ($IC_{50} = 0,12 \pm 0,03 \mu M$, PC3).

Заключение. Результаты демонстрируют селективность и сочетанное действие комплексов по отношению к клеткам рака предстательной железы, что открывает новые перспективы на пути поиска новых противоопухолевых лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (№ 22-23-00295).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hybrid metal complexes with opposed biological modes of action – promising selective drug candidates / Milaeva E.R., Tyurin V.Y. // Pure Appl. Chem. – 2017. – Vol. 89. – P. 1065-1088.
2. A review on steroid dimers: 2011-2019 / Nahar L., Sarker S.D. // Steroids. – 2020. – Vol. 164. – Art. 108736.
3. Cytotoxic activity of organotin carboxylates based on synthetic phenolic antioxidants and polycyclic bile acids / Antonenko T.A. [et al.] // J. Organomet. Chem. – 2020. – Vol. 909. – P. 121089.
4. Development and clinical utility of abiraterone acetate as an androgen synthesis inhibitor / Bryce A., Ryan C.J. // Clin. Pharmacol. & Ther. – 2011. – Vol. 91. – P. 101-108.

CYTOTOXIC ACTIVITY OF ORGANOTIN COMPLEXES BASED ON ABIRATERONE

Berseneva D.A., Gracheva Yu.A., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R.

Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, bersenevada1410@gmail.com

New Sn(IV) complexes based on alkyl/phenyl- and triphenyltin halides with anticancer drug abiraterone were synthesized. It was found that the cytotoxicity of Sn(IV) complexes depends on the nature of the organic group at the Sn atom and the type of cells. Among compounds the $\text{Ph}_3\text{SnCl} \cdot \text{L}$ was found the most cytotoxic one ($\text{IC}_{50} = 0.12 \mu\text{M}$ for prostate cancer cells). The results demonstrate the selectivity and combined effect of the complexes which opens up new prospects for the search of new antitumor drugs.

**ПРЕПАРАТИВНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА СОПУТСТВУЮЩЕЙ ПРИМЕСИ
N-ДЕСМЕТИЛ ИМАТИНИБ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ
ИМАТИНИБА МЕЗИЛАТ**

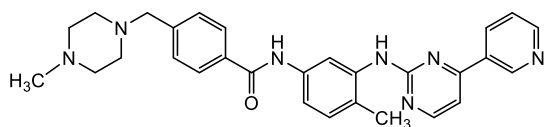
Божок Т.С., Голякович А.В., Фарина А.В., Харитонович Ю.А., Калиниченко Е.Н.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, kalinichenko@iboch.by*

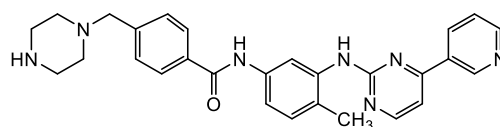
Иматиниба мезилат (Gleevec[®], 4-[(4-метил-1-пиперазинил)метил]-N-[4-метил-3-[[4-(3-пиридил)-2-пиримидинил]амино]фенил]бензамид метансульфонат) является эффективным ингибитором тирозинкиназы и используется в клинической практике для лечения хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) и желудочно-кишечных стромальных опухолей (GIST). Одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (US FDA) 7 ноября 2001 г. С 2019 г. в рамках реализации государственной программы импортозамещения субстанция иматиниба мезилат зарегистрирована и выпускается на НПЦ «ХимФармСинтез» ИБОХ НАН Беларуси.

Анализ чистоты лекарственных средств является неотъемлемой и важной частью контроля их качества. Нормирование содержания примесей предусмотрено в частных статьях ГФ в разделе «Сопутствующие примеси». Как правило, фармакопейные стандартные образцы импортного производства дорогостоящие и труднодоступные. Поэтому актуальным является разработка вторичных стандартных образцов (ВСО) надлежащего качества.

Целью данной работы является разработка препаративного метода синтеза сопутствующей примеси субстанции иматиниба мезилат – N-[4-метил-3-[[4-(3-пиридинил)-2-пиримидинил]амино]фенил]-4-(1-пиперазинилметил)бензамид (N-десметил иматиниб, примесь С, CAS: 404844-02-6).



Иматиниб основание

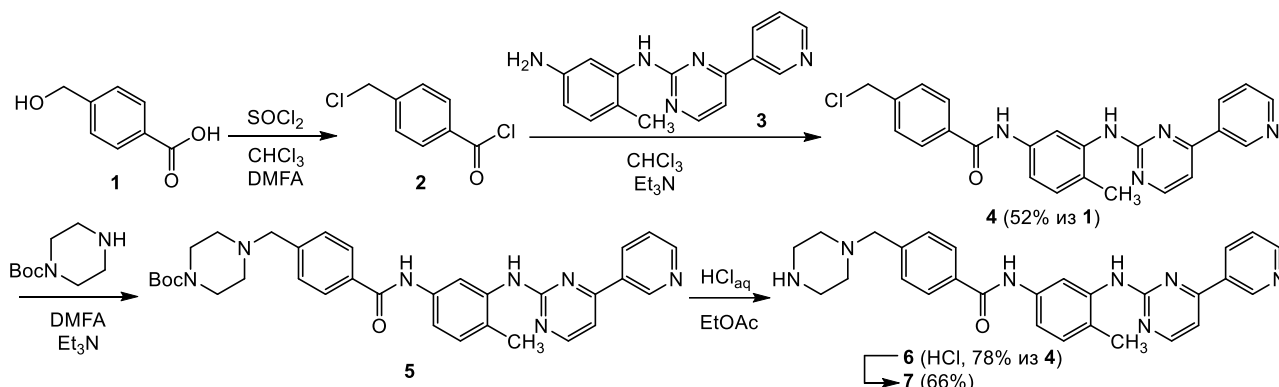


N-Десметил иматиниб

N-десметил иматиниб – основной активный метаболит иматиниба; продукт метаболизма изоферментом CYP3A4. Обнаруживается в плазме крови пациентов через 30 мин после перорального приема и составляет приблизительно 20% от AUC для иматиниба. В активной фармацевтической субстанции может присутствовать как примесь, образующаяся в ходе технологического процесса получения.

Из литературных данных известен двухстадийный способ синтеза N-десметил иматиниба из иматиниба по неклассической реакции Полоновского с суммарным

выходом 34% [1]. В данной работе предложен альтернативный способ синтеза примеси С из коммерчески доступных реагентов (Схема).



Для реализации указанной цели нами использован подход, заключающийся в последовательной конденсации дихлорпроизводного **2**, полученного из 4-(гидроксиметил)бензойной кислоты (**1**), с N-(5-амино-2-метилфенил)-4-(3-пиридил)-2-пиримидинамином (**3**) и селективно блокированным производным пиперазина (1-Вос-пиперазин). Хлорирование 4-(гидроксиметил)бензойной кислоты (**1**) осуществляли в течение 5 ч при 60°C под действием 4-х кратного избытка тионилхлорида в хлороформе и в присутствии ДМФА в качестве катализатора. Далее к полученному дихлориду **2** прикапывали раствор амина **3** и Et_3N в хлороформе и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, полупродукт реакции **4** выделяли методом экстракции и последующей кристаллизации из диэтилового эфира с суммарным выходом 52%. Конденсация 4-(хлорметил)-N-(4-метил-3-((4-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)фенил)-бензамида (**4**) с 1-Вос-пиперазином протекала в течение 5 ч при 60°C в смеси ДМФА и Et_3N и приводила к образованию блокированного производного **5**, обработка которого смесью 33% HCl ÷ EtOAc давала целевой продукт в виде соли гидрохлорида с выходом 78%. Основание N-десметил иматиниба (**7**) получено обработкой его солевой формы водным раствором NH_4OH в метаноле и выделено кристаллизацией из этилового спирта с хроматографической чистотой 99,6%. Хроматограмма N-десметил иматиниба (примесь С), полученного в качестве ВСО, представлена на Рисунке 1. Структура целевого продукта подтверждена физико-химическими методами анализа (ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия).

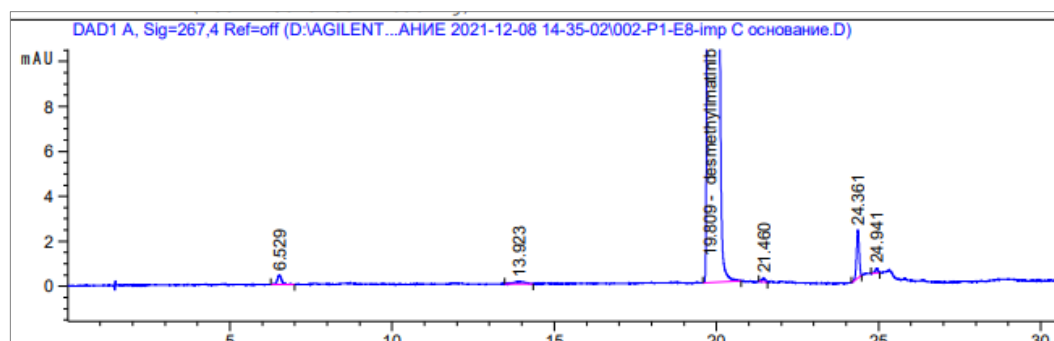


Рисунок 1. Хроматограмма ВСО N-десметил иматиниба

Таким образом, из коммерчески доступных реагентов разработан препаративный метод синтеза ВСО N-десметил иматиниба (примесь С), который может быть использован для контроля качества и валидации аналитических методик по показателю «сопутствующие примеси» в лекарственном средстве и активной фармацевтической субстанции иматиниба.



ЛИТЕРАТУРА

1. Synthesis and positron emission tomography studies of carbon-11-labeled imatinib (Gleevec) / Kun-Eek Kill [et al.] // Nucl. Med. Biol. – 2007. – Vol. 34. – P. 153-163.

PREPARATIVE METHOD FOR THE SYNTHESIS OF THE ACCOMPANYING IMPURITY N-DESMETHYL IMATINIB IN THE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE IMATINIB MESYLATE

Bozhok T.S., Golyakovich A.V., Kharitonovich Y.A., Farina A.V., Kalinichenko E.N.
*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, kalinichenko@iboch.by*

Preparative method for the synthesis of the N-desmethyl imatinib (impurity C) from commercially available reagents was developed. Synthesized product can be used as secondary reference standard to validate analytical methods for related substances in the medicinal product and the active pharmaceutical ingredient imatinib.

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ФТОРАНАЛОГА ДЕЦИТАБИНА И АЗАЦИТИДИНА ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ

Божок Т.С., Зильберман Р.Д., Савин А.О., Винникова О.В., Шабуня П.С., Фатыхова С.А.,
Калиниченко Е.Н.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, labtox@iboch.by*

4-Амино-1-(2-дезоксидеокси-2-фтор- β -D-арабинофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (2'F-5-aza-dCyd) – новый синтетический фторсодержащий аналог децитабина и азацитидина, известных препаратов, официально одобренных организацией FDA для лечения миелодиспластического синдрома, хронического миелоцитарного лейкоза и острого миелоидного лейкоза. В исследованиях *in vitro* 2'F-5-aza-dCyd продемонстрировал высокую цитостатическую активность в отношении клеточных линий острого миелоидного лейкоза (KG-1, TRN-1, K-562) при сравнимых с известными аналогами показателях острой токсичности [1,2]. В экспериментах *in vivo* на модели перевиваемого гемобластоза мышей (P388D1) впервые продемонстрирована противолейкозная активность 2'F-5-aza-dCyd: однократное введение в диапазоне доз 0,5-10 мг/кг вызывало увеличение продолжительности жизни мышей на 77-176%. Полученные результаты позволяют рассматривать новый фтораналог в качестве потенциального противолейкозного средства и рекомендовать его на дальнейшие этапы доклинического исследования [3,4].

Цель данной работы – экспериментальным путем с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) определить основные фармакокинетические параметры (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, CL , V_{ss} , $T_{1/2}$, λ_z , MRT) субстанции 2'F-5-aza-dCyd в плазме крови после однократного внутривенного введения самцам крыс в дозе 2 мг/кг.

Материалы и методы исследования. В работе использовали жидкостной хроматограф Agilent 1200, соединенный с tandemным масс-спектрометром Agilent 6410 Triple Quad (тройной квадруполь). Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта (ВС). В качестве внутреннего стандарта использовали клофарабин. Нижний предел количественного обнаружения для 2'F-5-aza-dCyd составил 5 нг/мл. Градуировочный график линейен в диапазоне 5-4000 нг/мл при коэффициенте корреляции 0,9977-0,9993.

Подготовка проб осуществлялась методом осаждения белков. К 100 мкл исследуемой плазмы прибавляли 20 мкл (10 мкг/мл) рабочего раствора ВС и 280 мкл метанола. Суспензию

встряхивали на Vortex V-3 в течение 1 мин и центрифугировали 5 мин со скоростью 14000 об/мин на охлаждаемой центрифуге Eppendorf Centrifuge при температуре +5°C. Супернатант переносили в хроматографическую виалу и анализировали в течение 12 ч.

Фармакокинетические исследования проводили на половозрелых самцах ($n = 30$) аутбредных крыс Вистар с массой тела $217,0 \pm 9,0$ г. Лабораторные животные получены в виварии ИБОХ НАН Беларуси.

Раствор испытуемого вещества (0,5 мг/мл) готовили непосредственно перед введением путем растворения навески субстанции 2'F-5-aza-dCyd в охлажденном 0,9% растворе хлорида натрия. Полученный раствор вводили натошак (животные не получали пищи в течение 8 ч до введения) в дозе 2 мг/кг в боковую вену хвоста крысы. Объем вводимого раствора рассчитывали с учетом массы тела каждого животного.

Отбор крови осуществляли из яремной вены через 5, 30, 60, 120, 240 и 480 мин после введения в вакуумные пробирки Vacuette® с Li-гепарином. Кровь инкубировали 10 минут при комнатной температуре, центрифугировали 20 минут при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость помещали в пробирку типа эппендорф, замораживали и хранили при температуре -20 °C до проведения хроматографического анализа.

Расчеты фармакокинетических параметров произведены для бескамерной модели с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010 и надстройки PКСolver, регрессионный анализ – с помощью Statistica 10.

Результаты и их обсуждение. Основные фармакокинетические показатели 2'F-5-aza-dCyd установлены при однократном внутривенном введении самцам крыс в дозе 2 мг/кг. Выбор дозы исследуемого вещества основан на литературных данных по фармакокинетике азацитидина и децитабина для данного вида лабораторных животных. Установлено, что вышеупомянутые препараты имеют узкое «терапевтическое окно», а диапазон исследуемых доз для крыс составляет 1-5 мг/кг.

Фармакокинетический профиль 2'F-5-aza-dCyd в плазме крови крыс показан на рис. 1, результат регрессионного анализа, характеризующего элиминацию 2'F-5-aza-dCyd, приведен на рис. 2.

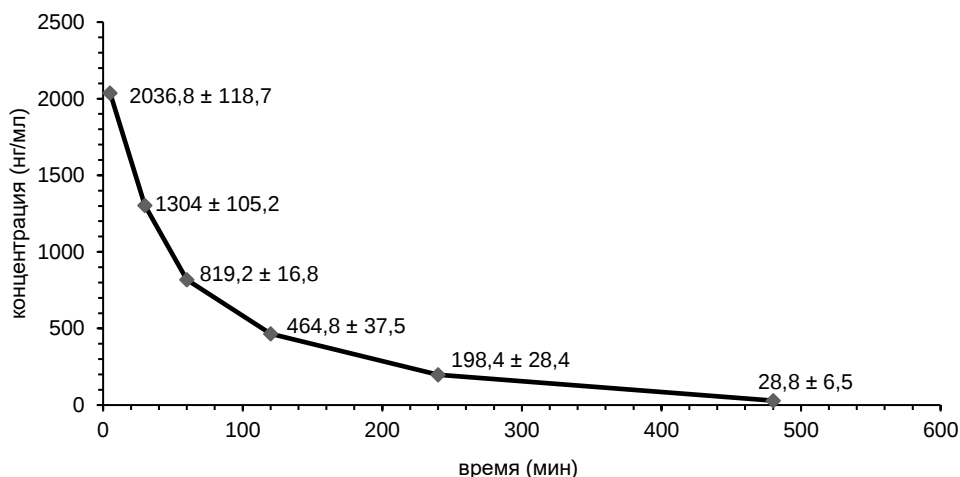


Рисунок 1. Фармакокинетический профиль концентрации 2'F-5-aza-dCyd в плазме крови самцов крыс после однократного внутривенного введения в дозе 2 мг/кг

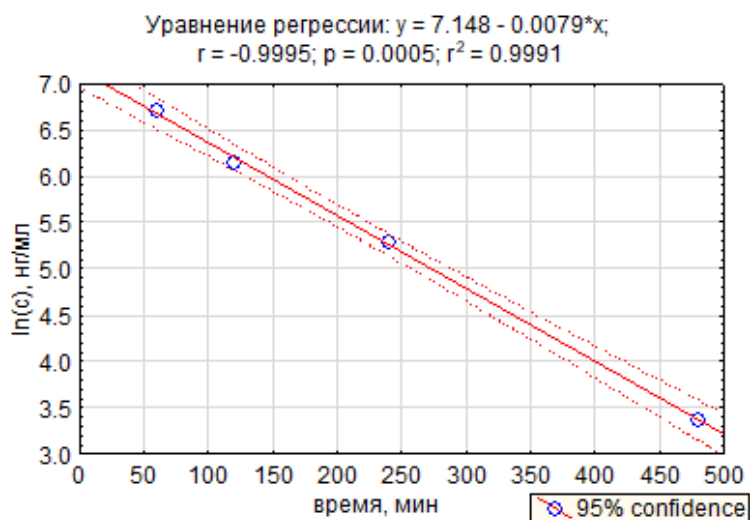


Рисунок 2. Линейная модель зависимости концентрации 2'F-5-aza-dCyd в плазме крови самцов крыс от времени регистрации после однократного внутривенного введения (2 мг/кг)

Методом регрессионного анализа с использованием основной линейной модели была установлена зависимость ($p < 0,0005$) концентрации 2'F-5-aza-dCyd в плазме крови от времени в виде: $y = 7,148 - 0,0079 \times x$, где x – время после инъекции, y – натуральный логарифм концентрации. Высокие значения коэффициента детерминации ($R^2 = 0,9991$) и скорректированного коэффициента детерминации (adjusted $R^2 = 0,9986$) указывает на тесную связь между временем регистрации и концентрацией 2'F-5-aza-dCyd в плазме.

Установлены значения следующих фармакокинетических параметров: максимальное значение концентрации 2'F-5-aza-dCyd в плазме крови ($C_{\max}$); время достижения максимальной концентрации ($T_{\max}$); площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» от нуля до последнего отбора крови (AUC_{0-t}) и площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) рассчитаны методом трапеций; общий клиренс (CL); стационарный объем распределения (V_{ss}); период полувыведения 2'F-5-aza-dCyd ($T_{1/2}$); константа элиминации для терминального участка кривой (λ_z); среднее время удерживания 2'F-5-aza-dCyd в крови (MRT). Значения фармакокинетических параметров представлены в таблице.

Таблица. Фармакокинетические параметры 2'F-5-aza-dCyd у самцов крыс

$C_{\max}$, нг/мл	$T_{\max}$, ч	C_0 , нг/мл	AUC_{0-t} , нг×ч/мл	$AUC_{0-\infty}$, нг×ч/мл	$AUC_{0-t}/$ $AUC_{0-\infty}$, %	CL, мл/ч/кг	V_{ss} , мл/кг	$T_{1/2}$, ч	λ_z , min^{-1}	MRT, ч
2037	0,08	2227	3164	3224	98,1	0,62	1,1	1,5	0,0079	1,8

Значение соотношения $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ для 2'F-5-aza-dCyd составило 98,1%, что указывает на достаточную длительность наблюдения.

Фармакокинетический профиль 2'F-5-aza-dCyd в плазме крови крыс схож с таковыми для децитабина и азацитидина. Период полувыведения ($T_{1/2}$) 2'F-5-aza-dCyd составил 1,5 ч. В сравнении с литературными данными для известных аналогов снижение концентрации фтораналога в крови крыс происходит быстрее, чем у децитабина ($T_{1/2} = 3$ ч при дозе 1 мг/кг), но замедляется в отличие от азацитидина ($T_{1/2} = 0,5$ ч при дозе 2,5 мг/кг). Аналогичная тенденция сохраняется и в значениях общего клиренса (CL), который характеризует скорость очищения организма от действующего вещества. В ряду азацитидин, 2'F-5-aza-dCyd, децитабин эти значения равняются 1,25, 0,62 и 0,31 мл/ч/кг, соответственно. Это, возможно, свидетельствует о различных механизмах транспорта и элиминации действующих веществ у



крыс. Как следует из представленных данных, значения V_{ss} и MRT для 2'F-5-aza-dCyd составили 1,1 мл/кг и 1,8 ч, соответственно.

Заклучение. Таким образом, установлена модель, описывающая зависимость концентрации 2'F-5-aza-dCyd в плазме крови от времени регистрации после внутривенного введения (в дозе 2 мг/кг), и получены значения основных фармакокинетических параметров субстанции 2'F-5-aza-dCyd. Результаты указывают на целесообразность проведения дальнейших этапов доклинических испытаний потенциального лекарственного средства на основе 2'F-5-aza-dCyd. В ближайшей перспективе – подтверждение гипотезы линейной зависимости концентрации 2'F-5-aza-dCyd в плазме от вводимой дозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Synthesis, hydrolytic stability, and antileukemic activity of azacytidine nucleoside analogs / T.S. Bozhok [et al.] // *Pharm. Chem. J.* – 2012. – Vol. 2(12). – P. 804-809.
2. Сравнительное исследование острой токсичности 2'-дезоксидецитабина, азацитидина и децитабина / Т.С. Божок [и др.] // Международная научно-практическая конференция «Белорусские лекарства»: материалы междунар. науч. конф., Минск, 10-11 октября 2019. – Минск, 2019. – С. 23-26.
3. Противоопухолевая активность 2'-фтор-замещенного производного децитабина в экспериментах *in vivo* на модели перевиваемого гемобластома Р388D1 / Р.Д. Зильберман [и др.] // Современные технологии в медицинском образовании: материалы междунар. науч. конф., посвященной 100-летию Белорусского государственного медицинского университета, Минск, 1-5 ноября 2021. – Минск, 2021. – С. 2023-2025.
4. *In vivo* study of antileukemic activity of new fluorine-substituted decitabine analogue on male p388d1 tumor-bearing mice / Zilberman R. [et al.] // "Chemistry, Structure and Function of Biomolecules": book of abstracts of VII International Conference, Minsk, Republic of Belarus, 23-25 Nov. 2021 / Institute of Bioorganic Chemistry NASB; ed.: Anastasiya V. Lapko, Natallia B. Khripach, Antos B. Sachanka. – Minsk, 2021. – P. 64.

PHARMACOKINETIC STUDY IN RATS AFTER SINGLE INTRAVENOUS ADMINISTRATIONS OF NEW FLUORINATED ANALOG OF DECITABINE AND AZACITIDINE

Bozhok T.S., Zilberman R.D., Savin A.O., Vinnikova O.V., P.S. Shabunya, S.A. Fatykhova, Kalinichenko E.N.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, kalinichenko@iboch.by*

The aim of this work was experimental study of pharmacokinetics of 4-amino-1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-1,3,5-triazin-2(1H)-one after a single intravenous administration to male rats at a dose of 2 mg/kg. Pharmacokinetic parameters (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, CL, V_{ss} , $T_{1/2}$, λ_z , MRT) were calculated.



ПОВЫШЕНИЕ РАСТВОРИМОСТИ БЕНЗИМИДАЗОЛОВОГО АНТИГЕМИНТИКА ФЛЮБЕНДАЗОЛА С ПОМОЩЬЮ АМОРФИЗАЦИИ

Васильев Н.А.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии растворов
им. Г.А. Крестова РАН, Россия, 153045, г. Иваново, ул. Академическая, д. 1,
nikitavasilev1995@mail.ru*

Одной из актуальных проблем при создании новых активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) является их низкая растворимость в воде. Как следствие, препарат обладает низкими показателями эффективности и биодоступности. Поэтому в настоящее время в фармацевтике широко используется метод аморфизации, как эффективный способ повышения растворимости АФИ. Однако аморфные формы АФИ обладают низкой физической стабильностью. Данную проблему можно решить с помощью совместной аморфизации (со-аморфизации) с низкомолекулярным соединением, например, аминокислотами. В нашей работе были получены и исследованы аморфные и со-аморфные формы широко используемого в клинической практике антигельминтного препарата флюбендазола (FluBZ). В качестве вторых компонентов были выбраны безопасные для организма аминокислоты. В результате механохимического скрининга были обнаружены две новые со-аморфные формы с L-фенилаланином (Phe) и L-триптофаном (Trp) в стехиометрии 1 к 1: FluBZ-Phe (1:1) и FluBZ-Trp (1:1). Для данных систем были подобраны оптимальные условия получения с наилучшим выходом. Новые системы анализировались с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), рентгенофазового анализа (РФА), инфракрасной спектроскопии (ИК) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), а также были проведены эксперименты по физической стабильности при различной влажности и исследование процессов растворения в биорелевантных средах, имитирующих среду ЖКТ. Проведенные испытания на стабильность показывают, что со-аморфизация значительно увеличивает срок хранения аморфного флюбендазола в широком диапазоне относительной влажности. Порядок устойчивости исследуемых систем следующий: FluBZ-Trp (1:1) > FluBZ-Phe (1:1) > FluBZ_{amorph}. Было обнаружено, что новые системы обеспечивают высокий и устойчивый уровень пересыщения лекарственного средства при растворении в биорелевантных буферных средах при pH 1.6 и улучшенное высвобождение лекарственного средства по сравнению с исходным FluBZ. Система FluBZ-Phe (1:1) проявляла такое поведение и в нейтральной среде, что обусловлено комплексообразованием флюбендазола с фенилаланином в растворе. Таким образом, система FluBZ-Phe (1:1) имеет потенциал в качестве системы доставки лекарств, поскольку позволяет достичь и удерживать уровень перенасыщения АФИ в желудочно-кишечном тракте, что приводит к улучшению биодоступности плохо растворимого FluBZ [1,2]. Результаты увеличения параметра AUC для всех исследованных аморфных твердых веществ составили в 4,4-4,6 раза при pH 1.6 и в 1,8-2,8 раза при pH 6.5. Следующим шагом наших исследований будет изучение и сравнения поведения со-аморфных систем с существующими препаратами *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-10005).

ЛИТЕРАТУРА

1. Evolution of supersaturation of amorphous pharmaceuticals: the effect of rate of supersaturation generation / Sun D.D., Lee P.I. // Molecular pharmaceuticals. – 2013. – Vol. 10(11). – С. 4330-4346.
2. Evolution of supersaturation of amorphous pharmaceuticals: nonlinear rate of supersaturation generation regulated by matrix diffusion / Sun D.D., Lee P.I. // Molecular pharmaceuticals. – 2015. – Vol. 12(4). – P. 1203-1215.



ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ ПРОИЗВОДСТВА СОАО «ФЕРЕЙН» ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Васильева М.А.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27, dr.vasilevamarina@gmail.com*

Целью настоящей работы является изучение направления оптимизации применения пробиотиков в клинической практике на примере препаратов СОАО «Ферейн» путем анализа публикаций отечественных и зарубежных авторов.

Заболевания пищеварительной системы инфекционной и неинфекционной природы широко распространены в мире, имеют высокую социальную и экономическую значимость, существенно снижая качество жизни пациентов и внося существенный вклад в причины смерти в странах и с низким, и с высоким уровнем доходов. В структуре детской соматической заболеваемости эти заболевания находятся на втором месте после болезней органов дыхания. Высокая доля хронических форм заболеваний приводит к постоянному увеличению распространенности заболеваний пищеварительной системы в более старших возрастных группах, достигая максимума в группе 30-49 лет, с последующим постепенным снижением [1]. Изменения окружающей среды и образа жизни, такие как урбанизация, уменьшение доли детского населения, изменение рациона питания, нарастание неконтролируемого потребления лекарственных препаратов, в т. ч. антибиотиков, влияют на частоту патологии пищеварительной системы, зачастую, неблагоприятным образом. Важным элементом патогенеза заболеваний пищеварительной системы является изменение локального микробиома. С другой стороны, имеются многочисленные факты ассоциации изменения микробиома желудочно-кишечного тракта с патологией других органов (аутоиммунные заболевания, нарушения обмена липидов, депрессия, болезнь Альцгеймера и др.)

Принято считать, что существуют реципрокные связи между микробиотой кишечника и печенью, так называемая «ось микробиота-кишечник-печень», микробиотой кишечника и центральной нервной системой через «ось микробиота-кишечный тракт-мозг» [2]. Связь микробиоты матери, микробиоты младенца и состояние здоровья ребенка в первые годы жизни подтверждена в многочисленных исследованиях.

Коррекция микробиоты разных отделов желудочно-кишечного тракта с помощью пробиотических штаммов микроорганизмов в качестве профилактического или терапевтического вмешательства базируются на большом объеме данных о биологических эффектах таких микроорганизмов. Пробиотики оказывают свое действие посредством различных механизмов:

- конкуренция за пространство в просвете и стенке кишечника;
- антагонизм между патогенными бактериями и пробиотиками, в результате конкуренции за питательные вещества, или за счет поддержания кислого pH, или стимуляции выработки кишечных муцинов, которые предотвращают имплантацию патогенов;
- синтез трофических веществ, используемых эпителиальными клетками, и укрепление эпителиальных соединений слизистой оболочки вносит вклад в поддержание барьерной функции слизистой оболочки;
- регуляция моторики кишечника за счет тесной реципрокной связи между центральной нервной системой и бактериальной флорой в кишечнике;
- гипохолестеринемический эффект, обусловленный разными механизмами у бактерий разного вида: деконъюгация желчных кислот, ассимиляция эндогенного или экзогенного холестерина, связывание холестерина и свободных желчных кислот микробной клеткой;
- антиканцерогенное, антимуtagenное и противоаллергическое действие;



– действие на иммунную систему кишечника, путем стимуляции рецепторов врожденного иммунитета, которые вызывают выработку провоспалительных цитокинов и приводят к инициации фагоцитоза макрофагами.

На фармацевтическом рынке Республики Беларусь пробиотики присутствуют и в виде лекарственных препаратов, и как пищевые добавки. Применение пробиотиков для профилактики и лечения многих заболеваний давно вошло в клиническую практику и ежегодно увеличивается. Однако остаются неясными некоторые вопросы относительно эффективности пробиотиков, целесообразности их применения в период антибиотикотерапии, выживаемости в кислой среде желудка, способности к колонизации желудочно-кишечного тракта микроорганизмами длительной персистенции.

Самые убедительные доказательства эффективности использования пробиотиков связаны с лечением заболеваний желудочно-кишечного тракта (воспалительные заболевания кишки, инфекционная диарея, антибиотико-ассоциированная диарея, *Clostridium difficile*-ассоциированная диарея). На сегодняшний день опубликованы мета-анализы и систематические обзоры, оценивающие эффективность пробиотиков при заболеваниях и состояниях, связанных с нарушениями обмена веществ (сахарный диабет, дислипидемия, ожирение) [3], заболеваниях печени (неалкогольная жировая болезнь печени, печеночная энцефалопатия), заболеваниях поджелудочной железы (острый панкреатит) и др.

Уточнение и расширение терапевтических возможностей этой группы препаратов в реальной клинической практике продолжает находится в фокусе внимания исследователей и клиницистов.

Эффективность пробиотического препарата определяется рядом факторов, к которым относятся вид и штамм микроорганизма, форма выпуска, суточная доза, прием других лекарственных препаратов, диета, модифицирующие факторы макроорганизма (например, гипoaцидность) [4].

Назначая пробиотик, необходимо дифференцированно подходить к выбору пробиотического штамма в зависимости от нозологии. Было показано, что некоторые штаммы *Lactobacillus rhamnosus* и *Saccharomyces boulardii* эффективны против патогенов *E. coli* и *C. difficile* у пациентов с диареей, снижают частоту рецидивов при язвенном колите. В качестве наиболее эффективных пробиотиков, способных уменьшать симптомы печеночной энцефалопатии для людей с циррозом печени, нужно использовать бактерии родов *Lactobacilli* и *Bifidobacteria*. Пробиотики, содержащие *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus paracasei* эффективны для профилактики инфекций верхних дыхательных путей.

Формы выпуска пробиотиков многообразны: порошки в саше, флаконы или капсулы с лиофилизатом бактерий (например, Диалакт, Бифидумбактерин, Бифидовит, Бифидовит плюс, Диабакт) таблетки, таблетки жевательные, вагинальные свечи, жидкие формы (Биофлор). Исследования, которые бы сравнивали эффективность одних и тех же штаммов пробиотиков в разных формах выпуска, малочисленны. Показана способность капсул с кишечнорастворимой оболочкой обеспечивать наибольшую выживаемость штаммов в желудочно-кишечном тракте, капсулы с лиофилизатами бактерий сохраняют наибольшую концентрацию жизнеспособных бактерий к концу срока годности. В то же время нужно учитывать, что только использование жидких форм (например, Биофлор) либо использование лиофилизата без оболочки (Диалакт, Бифидумбактерин) обеспечивает безопасность приема детьми первых лет жизни. Для детей старше 6 лет и взрослых оптимально применение капсулированных форм (например, Бифидовит, Бифидовит плюс, Диабакт).

Важным является также вопрос эффективной суточной дозы и кратности приема пробиотических препаратов. В РКИ, оценивающих эффективность пробиотиков, как правило, не используются дозы менее $<10^6$ КОЕ/сут. Следует помнить, что подтверждение эффективности штамма в определенной дозе не может служить доказательством его эффективности в меньшей дозе. При назначении пробиотиков необходимо указывать рекомендованную дозу, эффективность которой была изучена.



Прием пробиотиков рекомендуется сочетать с приемом пищи, голодание пациента на фоне основного заболевания может неблагоприятным образом изменить фармакокинетику препарата.

Важным является то, что пробиотики, содержащие *Lactobacillus spp.*, в частности Диалакт, Диабакт, Бифидовит, Бифидовит кидс, Бифидовит плюс, можно назначать в сочетании с пероральным лечением антибиотиками. Также нужно отметить, что кишечнорастворимые капсулы могут полностью или частично утрачивать протективное действие при одновременном приеме блокаторов протонной помпы и не имеют преимуществ перед формами без оболочек.

Исследования безопасности пробиотиков (преимущественно лакто- и бифидобактерий) показывают хорошую переносимость и отсутствие побочных эффектов от их применения в популяции в целом. В некоторых исследованиях можно найти указания на умеренный дискомфорт со стороны желудочно-кишечного тракта (вздутие, распирание, тошнота, изменения вкусовых ощущений). Длительное применение пробиотиков в единичных случаях приводило к таким серьезным побочным эффектам, как развитие системных инфекций, потенциально опасных метаболических реакций (например, чрезмерный синтез D-лактата, избыточная деконъюгация желчных кислот). Такие случаи подробно изучены с выделением групп пациентов, у которых может присутствовать риск при приеме пробиотиков. Это беременные женщины, больные воспалительными заболеваниями кишечника, пациенты с синдромом короткой кишки, пациенты с выраженным иммунодефицитным состоянием, недоношенные новорожденные. Теоретически, применение пробиотиков может привести к гиперстимуляции иммунной системы, горизонтальной передаче генетического материала, обуславливающего антибиотикорезистентность патогенным бактериям.

На сегодняшний день, требованием ВОЗ является исследование антибиотикорезистентности, токсигенности, гемолитической и метаболической активности каждого нового штамма пробиотика. Штаммы, безопасность которых подтверждена, получают статус GRAS (Generally Recognized As Safe) в США или статус QPS (Qualified Presumption of Safety), утверждаемый Европейским агентством по безопасности продуктов питания, в целом признаны безопасными. Использование производителем в составе своих продуктов штаммов, уже получившие статус безопасных, не требует дополнительных исследований безопасности.

Заключение. Назначение пробиотиков в составе лекарственных препаратов и пищевых добавок с учетом индивидуальных факторов влияющих на эффективность и риски побочных эффектов позволит улучшить результаты их применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2019 (Global Health Estimates Technical Paper WHO/DDI/DNA/GHE/2020.2).
2. Perturbations in gut microbiota composition in psychiatric disorders: A Review and Meta-analysis / V.L. Nikolova [et al.] // JAMA Psychiatry. – 2021. – Vol. 78(1). – P. 1343-1354.
3. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review / L. Crovesy, D. Masterson, E.L. Rosado // Eur. J. Clin. Nutr. – 2020. – Vol. 74(9). – P. 1251-1262.
4. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects / P. Marteau, F. Shanahan // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 17(5). – P. 725-740.

DRUGS AND FOOD SUPPLEMENTS PRODUCED BY «FERANE» FOR PATIENTS WITH DISEASES OF DIGESTIVE SYSTEM

Vasilyeva M. A.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus, dr.vasilevamarina@gmail.com

The use drugs and food supplements with probiotics can be optimized through analysis of individual factors affecting the effectiveness and risks of side effects.

DESIGN, SYNTHESIS, AND BIOLOGICAL EVALUATION OF 4-ACYLAMINO-TETRAHYDROBENZISOXAZOLES AS NOVEL HSP90 INHIBITORS

Varabyeva N.A.¹, Salnikova D.I.², Paulovich D.I.¹, Bogdanov F.B.^{2,3}, Mikhaylova A.L.², Sorokin D.V.², Scherbakov A.M.², Lakhvich F.A.¹ and Piven Y.A.¹

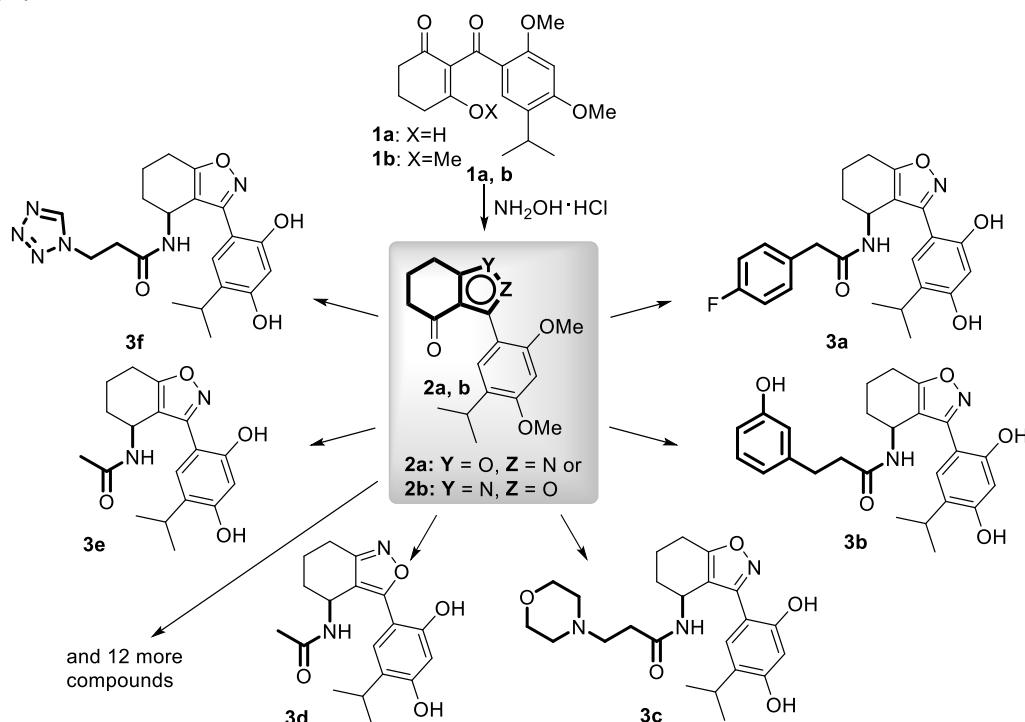
¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Ak. Kuprevich Str. 5/2, 220084, Minsk, Belarus, anastasiya_vorobiova@mail.ru*

²*Department of Experimental Tumor Biology, Blokhin N.N. National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoye sh. 24, Moscow, 115522, Russian Federation*

³*Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovsky Ave., 27, Moscow, 119192, Russian Federation*

Introduction. The 90 kDa heat shock protein (Hsp90) is an ATP-dependent chaperone that is responsible for the folding, activation, and stabilization of more than 200 client oncoproteins, directly associated with key signaling pathways regulating cancer cell growth. Inhibition of the Hsp90 protein folding machinery results in simultaneous disruption of these signaling pathways and induces client protein degradation, which can eventually lead to cell death [1]. Therefore, Hsp90 is considered as an attractive drug target for a wide spectrum of cancers. To date, about 20 drug candidates that target Hsp90 have been evaluated in clinical trials. However, the FDA approved none of them because of toxic effects and/or not enough efficacies [2]. So, the development of new effective Hsp90 inhibitors is an important and promising task.

Results and discussion. The tetrahydrobenzisoxazole core was chosen as a scaffold for the development of novel Hsp90 inhibitors. Computer modeling methods (molecular docking, molecular dynamics simulations, MM/PBSA and MM/GBSA) were used in the process of design and selection of compounds for further synthesis. An efficient protocol for the synthesis of 4-acylamino-tetrahydrobenzisoxazoles was developed. Key intermediates 6,7-dihydrobenzisoxazol-4-ones **2a** and **2b** were prepared from reactions of triketone **1a** or its methyl enol ether **1b** with hydroxylamine, respectively. The final amides **3** were prepared from 6,7-dihydrobenzisoxazol-4-ones **2** in five steps: reduction of the carbonyl group, Ritter reaction, hydrolysis of the amide bond, acylation, and demethylation.





Eighteen target compounds that contain various acyl residues have been synthesized as racemates and evaluated as antiproliferative agents against MCF7 and HCC1954 breast cancer cells. Almost all compounds showed high antiproliferative activity. The IC_{50} values of fifteen compounds ranged from 0.5 to 17.4 μM against MCF7 cells and from 0.3 to 18.4 μM against HCC1954 cells.

Conclusion. Thus, in the course of the work, an efficient approach to the synthesis of 4-acylamino-tetrahydrobenzisoxazoles was developed. Eighteen novel Hsp90 inhibitors have been obtained using this approach. Almost all of them showed high antiproliferative activity against hormone-dependent and HER2-positive breast cancer cells.

Acknowledgments. The authors are grateful for the financial support from the Belarusian Foundation for Fundamental Research (project X22MC-030, chemistry) and the Russian Science Foundation (project 19-15-00245, biology).

REFERENCES

1. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy / J.R. Porter, C.C. Fritz, K.M. Depew // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2010. – Vol. 14(3). – P. 412-420.
2. Pan- and isoform-specific inhibition of Hsp90: Design strategy and recent advances / J. Yu, C. Zhang, C. Song // Eur. J. Med. Chem. – 2022. – Vol. 238. – P. 114516-114534.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА И ЦИСПЛАТИНА НА МОДЕЛИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Винникова О.В., Савин А.О., Зильберман Р.Д., Панибрат О.В, Хрипач В.А.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, labtox@iboch.by

Введение. Онкологическая патология занимает одно из лидирующих мест по причине смертности, в связи с чем остается актуальной проблема поиска новых подходов к лечению больных раком. Химиотерапия является одним из самых востребованных методов воздействия на опухолевые клетки [1]. Однако этот метод не дает полной гарантии выздоровления, не исключает возникновения рецидивов. Применение противоопухолевых средств приводит к развитию целого комплекса нарушений: вторичному иммунодефициту, снижению детоксикационной функции печени, возникновению вторичных злокачественных опухолей и т.д. Особенно часто после введения цитостатиков наблюдается токсическая аплазия кроветворения. Поэтому актуальной является проблема повышения эффективности антибластомной терапии и уменьшения ее побочных эффектов. В ряде работ продемонстрирована антипролиферативная активность брассиностероидов (БС) на моделях раковых клеточных линий, их способность ингибировать ангиогенез и низкая цитотоксичность для нормальных клеток, на основании чего БС можно рассматривать как потенциальные противоопухолевые агенты. Также в исследованиях *in vitro* была показана эффективность совместного применения ряда представителей БС с цисплатином [2]. Цисплатин – комплексное соединение двухвалентной платины, использующееся в онкологии в качестве эффективного противоопухолевого препарата для терапии различных видов рака. Цисплатин особенно эффективен для лечения заболевания на ранней стадии. Основным недостатком препарата является его высокая токсичность [3]. Также показано, что БС имеют много положительных эффектов у млекопитающих: нейропротекторные, противовирусные, анаболические и адаптогенные, иммуностимулирующие, противовоспалительные, ранозаживляющие и т.д. [4]. Основываясь на этих результатах, нами было проведено исследование противоопухолевой активности представителя класса БС на мышинной модели опухолевого роста.

Цель работы – оценить противоопухолевую активность 24-эпибрассинолида (24-ЭБ) и его комбинации с цисплатином на модели аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).



Материал и методы исследования. Исследования провели на половозрелых мышках-самках аутбредного стока ICR массой 18-22 г (получены в виварии ИБОХ НАН Беларуси). 24-ЭБ был предоставлен лабораторией химии стероидов ИБОХ НАН Беларуси. Цисплатин был приобретен у УП «Унидрагмет БГУ». В качестве модели опухолевого роста использовали АКЭ, инокулированную подкожно. Инокулум – 0,1 мл разведенной стерильным изотоническим раствором хлорида натрия асцитной жидкости, содержащей 2×10^6 клеток.

Введение исследуемых соединений начали на 7 день после инокуляции АКЭ. Поскольку 24-ЭБ не растворим в воде, то для его введения экспериментальным животным использовали мелкодисперсную суспензию в 0,3% р-ре крахмала. 24-ЭБ вводили внутривентрикулярно (в/ж) ежедневно однократно в течение 5 дней в разовых дозах 1 мг/кг ($1/24 \times 5$) и 10 мг/кг ($10/24 \times 5$). Раствор цисплатина вводили внутривентрикулярно (в/б) ежедневно однократно в течение 5 дней в разовой дозе 1,6 мг/кг ($1,6/24 \times 5$). Для изучения комбинированного действия 24-ЭБ использовали дозы 1 мг/кг и 10 мг/кг совместно с цисплатином в дозе 1,6 мг/кг. Животные контрольной группы получали р-р NaCl 0,9% в/б и 0,3% р-р крахмала в/ж.

Регистрировали массу тела животных, линейные размеры опухоли (мм) на 1-ые, 7-ые и 14-ые сутки после окончания введения исследуемых соединений. Рассчитывали объем опухоли (V , мм³) и показатель торможения роста опухоли (ТРО%) по формулам (1) и (2) соответственно:

$$V = \frac{a \times b^2}{2} \quad (1),$$

где a , b – длина и ширина опухолевого узла.

$$\text{ТРО}\% = \frac{V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}}{V_{\text{контроля}}} \times 100\% \quad (2),$$

где $V_{\text{контроля}}$ и $V_{\text{опыта}}$ – средний объем опухоли (мм³) в контрольной и экспериментальных группах, соответственно.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Таблица 1. Дизайн исследования противоопухолевой активности 24-ЭБ, его совместного действия с цисплатином в эксперименте на мышках-опухоленосителях АКЭ

Группа	Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Соединение, доза (мг/кг), путь введения		Растворитель		Длит-ть введения, дни
			24-ЭБ, в/ж	Цисплатин, в/б	0,9% р-р NaCl, в/б	0,3% р-р крахмала, в/ж	
			Эксперимент №1				
Контроль	ICR, ♀♀	10	–	–	0,4 мл/20 г	0,4 мл/20 г	5
24-ЭБ	ICR, ♀♀	10	10	–	–	–	5
Цисплатин	ICR, ♀♀	10	–	1,6	–	–	5
24-ЭБ + Цисплатин	ICR, ♀♀	10	10	1,6	–	–	5
Эксперимент №2							
Контроль	ICR, ♀♀	10	–	–	0,4 мл/20 г	0,4 мл/20 г	5
24-ЭБ	ICR, ♀♀	10	1,0	–	–	–	5
Цисплатин	ICR, ♀♀	10	-	1,6			5
24-ЭБ + Цисплатин	ICR, ♀♀	10	1,0	1,6	–	–	5



Результаты. Ежедневное пятикратное внутрибрюшинное введение исследуемых соединений и их комбинаций экспериментальным животным не повлияло на интегральные показатели токсичности такие как двигательная активность, состояние шерстного покрова, вес тела, потребление корма и воды на протяжении всего периода наблюдения (14 суток). Гибели животных не наблюдали.

В группе, где животные получали 24-ЭБ в дозе 1 мг/кг, низкие значения ТРО% (<20%), указывают на отсутствие ингибирующего эффекта на АКЭ. Применение 24-ЭБ в дозе 10 мг/кг свидетельствует о минимальной противоопухолевой активности (ТРО% 20% – 50% на протяжении не менее 7 дней [5]) у исследуемого соединения: 28% и 38% на 7-ые и 14-ые сутки, соответственно.

В группе животных, которым вводили комбинацию 24-ЭБ и цисплатина отметили взаимодействие по типу антагонизм: от угнетения противоопухолевой активности цисплатина (24-ЭБ в дозе 1 мг/кг) до устранения эффекта цисплатина при применении 24-ЭБ в дозе 10 мг/кг. Данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Данные по объему опухолей (мм³, mean±sd) и показателю торможения роста опухоли (ТРО%) у животных–опухоленосителей АКЭ (самки ICR) после введения 24-ЭБ (5-тикратно, в/ж) и цисплатина (5-тикратно, в/б)

Группа животных	Vcp, мм ³ /ТРО%			
	Исходная	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Эксперимент №1				
Контроль	134,9±28,9	331,1±111,9	599,0±295,7	790,5±625,4
24-ЭБ 10 мг/кг	133,3±17,2	299,6±73,4 10%	430,9±160,2 28%	490,2±279,7 38%
Цисплатин 1,6 мг/кг	143,4±26,9	230,9±67,8 30%	324,9±82,7* 46%	322,2±153,8* 59%
Цисплатин 1,6 мг/кг + 24-ЭБ 10 мг/кг	136,1±26,4	234,1±94,0 29%	473,4±170,8 21%	654,1±279,1 17%
Эксперимент №2				
Контроль	142,1±30,8	435,0±114,8	557,9±208,2	850,9±533,7
24-ЭБ 1 мг/кг	137,7±25,5	371,1±105,8 15%	449,8±176,3 19%	784,8±435,0 8%
Цисплатин 1,6 мг/кг	137,9±31,6	282,1±91,3 35%	271,8±83,3* 51%	304,8±108,9* 64%
Цисплатин 1,6 мг/кг + 24-ЭБ 1 мг/кг	146,8±27,6	283,2±118,9 35%	328,4±130,5* 41%	421,0±224,6* 51%

*Примечание – p < 0,05 относительно группы контроль.

Заключение. В эксперименте на мышах-опухоленосителях АКЭ установлена низкая противоопухолевая активность 24-ЭБ при внутрижелудочном пятикратном применении в дозе 10 мг/кг. Взаимодействие 24-ЭБ с цисплатином в условиях эксперимента носит антагонистичный характер, причем эффект обратно пропорционален дозе 24-ЭБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Н. И. Переводчикова [и др.]; под общ. ред. Н. И. Переводчиковой. – 3-е изд., доп. и пер. – Москва: Практическая медицина, 2011. – 512 с.
2. Влияние комбинации цисплатина с брассиностероидами на рост раковых клеток / О.В. Панибрат, В.Н. Жабинский, В.А. Хрипач // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 4. – С. 437-444.
3. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists / R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate // Dalton Trans. – 2018. – Vol. 47(19). – P. 6645-6653.
4. Steroid plant hormones: Effects outside plant kingdom / V.N. Zhabinskii, N.B. Khripach, V.A. Khripach // Steroids. – 2015. – Vol. 97. – P. 87-97.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / М-во здравоохранения и соц. развития Рос. Федерации; ред. кол.: А.Н. Миронов [и др.]. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – С. 640-650.

ASSESSMENT OF ANTITUMOR ACTIVITY OF 24-EPIBRASSINOLIDE AND CISPLATIN AGAINST EHRlich ASCITES CARCINOMA

Vinnikova O.V., Savin A.O., Zilberman R.D, Panibrat O.V., Khripach V.A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, labtox@iboch.by*

Assessment of antitumor activity of 24-epibrassinolide and cisplatin against Ehrlich ascites carcinoma mice model was performed. Low antitumor activity of 24-epibrassinolide upon fivefold intragastric introduction at a dose of 10 mg/kg in an experiment on tumor-bearing mice was established. The interaction of 24-epibrassinolide with cisplatin experimentally is antagonistic and the effect is inversely proportional to the dose of 24-epibrassinolide.

SYNTHESIS OF CYCLIC DIADENOSINE 3',5'-MONOPHOSPHATE USING INCLUSION BODIES EXHIBITING DIADENYLATE CYCLASE ACTIVITY

Vinter M.A., Kazlouski I.S., Zinchenko A.I.

*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220084, Belarus,
Kuprevich str. 2, Belarus, rita.vinter.abc@gmail.com*

Background. Cyclic dimeric adenosine 3',5'-monophosphate (c-di-AMP) (fig. 1) plays a role of pathogen-associated molecular pattern triggering synthesis of interferon and other anti-inflammatory cytokines upon introduction into the body of humans and vertebrata. Such remarkable properties open attractive medical prospects for c-di-AMP as therapeutic agent [1] and vaccine adjuvant [2].

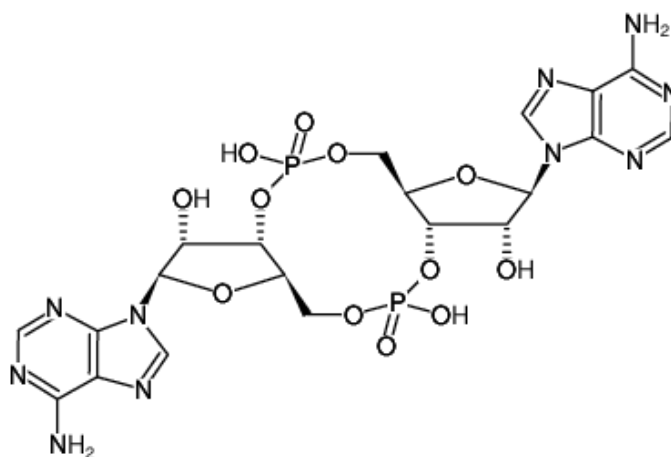


Figure 1. Structural formula of c-di-AMP



Nowadays c-di-AMP is mainly produced by multistage eco-hostile chemical synthesis [3]. The alternative biocatalytic approach to manufacturing c-di-AMP is grounded on monostage condensation of two ATP molecules under the impact of bacterial enzyme – recombinant diadenylate cyclase (DAC). However, heterologous expression of genes in *Escherichia coli* is often complicated by the aggregation of target proteins into the so-called «inclusion bodies». Enzymes incorporated into inclusion bodies generally require laborious solubilization, and few examples of catalytically active inclusion bodies have been reported so far [4]. We were interested whether DAC is capable to display enzymatic activity in the inclusion bodies.

The aim of this work was to engineer a new recombinant strain of *E. coli* of efficiently generating DAC as catalytically active inclusion bodies and further engage these bodies for c-di-AMP synthesis.

Methods. We applied standard genetic engineering and enzymatic catalysis techniques. Structural gene *disA* encoding DAC of *Bacillus thuringiensis* BT 407 (Novagen, USA) was synthesized by PCR procedure using Flash polymerase (ArtBioTech, Belarus) and inserted into plasmid pET42a+ (Novagen, USA). The resulting genetic construction was used to transform the competent cells of *E. coli* Rosetta (DE3) plysS (Novagen, USA). As a result, recombinant bacterial strain of *E. coli* capable to produce DAC of *B. thuringiensis* and designated *E. coli* DAC-22 was derived.

DAC expression in *E. coli* DAC-22 cells was induced by isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The obtained cells were disrupted by ultrasound. The insoluble fraction of the lysate was precipitated by centrifugation at 21 000 g for 20 min, then the precipitate containing inclusion bodies was washed with 1 M urea solution with Triton X-100. After centrifugation, the pellet was washed twice with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 100 mM NaCl and resuspended in the same buffer.

Results. A new bacterial recombinant strain of *E. coli*, producing DAC of *Bacillus thuringiensis* in the form of catalytically active inclusion bodies was created.

The electrophoresis of the *E. coli* DAC-22 proteins in polyacrylamide gel has shown that the ratio of protein with a molecular weight 47 kDa corresponding to the target enzyme significantly increased in the cultural fluid of the recombinant strain after induction with IPTG. According to estimates made by the gel documentation system, DAC accounted for about 70 % of the total cell lysate protein, with approximately 90% of the enzyme localized in the inclusion bodies.

The resulting inclusion bodies were added to the reaction mixture comprising, mM: $MgCl_2$ – 10, Tris-HCl buffer (pH 8.0) – 10, ATP – 5 and incubated at 55 °C during 2 h. Under these conditions the reaction yield reached more than 90% of theoretical maximum.

The course of reaction was controlled by the method of thin layer chromatography in the system of solvents dioxane-water-25% ammonia (4:3:0.25). The reaction products were eluted from the plates with water and yield of the reaction was evaluated spectrophotometrically.

Based on these results, enzyme productivity of the strain, expressed in units of activity, was calculated as 720 U/L of cultural liquid.

C-di-AMP was isolated from the reaction mixture by chromatography on a DEAE-Toyopearl 650 M resin column (Toyo soda, Japan) (Cl⁻-form) using a linear NaCl gradient (0-500 mM). The eluate was concentrated with a rotary evaporator at 55°C. The resulting solution was applied to a Sephadex G-10 column and the end product (13 mg) was eluted with water and dried in vacuum.

It is known, that inclusion bodies represent relatively stable protein formations. They are readily isolated following cell disintegration in the course of simple physical manipulations and may act further as effective reusable enzyme preparations.

To verify this statement, we conducted an experiment testing repeated use of inclusion bodies for biocatalytic synthesis of c-di-AMP. The special experiment proved that inclusion bodies we obtained can be recycled for this purpose at least 10 times.

Conclusions. The recombinant strain of *E. coli* producing DAC of *B. thuringiensis* was engineered, and about 90% of studied enzymatic activity was localized in the fraction of catalytically



active inclusion bodies. The production capacity of the new strain with respect to DAC was 720 U/L of cultural liquid. Using the obtained inclusion bodies as a biocatalyst, 13 mg of chromatographically purified c-di-AMP was synthesized from ATP.

Moreover, for the first time, the possibility of repeated DAC application in the form of inclusion bodies for multiple synthesis of c-di-AMP was demonstrated.

REFERENCES

1. Combination of interleukin-15 with a STING agonist, ADU-S100 analog: A potential immunotherapy for prostate cancer / A.M. Esteves [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – Art. 621550.
2. Cyclic di-adenosine monophosphate: a promising adjuvant candidate for the development of neonatal vaccines / D. Lirussi [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13(2). – Art. 188.
3. Chemical synthesis, purification, and characterization of 3'-5'-linked canonical cyclic dinucleotides (CDNs) / C. Wang [et al.] // *Methods in Enzymology*. – 2019. – Vol. 625. – P. 41-59.
4. Thermostable adenosine 5'-monophosphate phosphorylase from *Thermococcus kodakarensis* forms catalytically active inclusion bodies / S. Kamel [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – Art. 16880.

СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИАДЕНОЗИН-3',5'-МОНОФОСФАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ

Винтер М.А., Казловский И.С., Зинченко А.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, 220084, г. Минск, ул. Купревича, 2, Беларусь, rita.vinter.abc@gmail.com

С помощью техники рекомбинантной ДНК создан новый бактериальный рекомбинантный штамм *Escherichia coli* ДАЦ-22 – продуцент диаденилатциклазы (ДАЦ) *Bacillus thuringiensis*, катализирующей реакцию трансформации аденозин-5'-трифосфата в циклический 3',5'-диаденилат (ц-ди-АМФ). Около 90% рекомбинантного фермента оказалось локализовано во фракции каталитически активных телец включения. Производительность нового штамма в отношении ДАЦ составила 720 ед/л культуральной жидкости. Используя полученные тельца включения в качестве биокатализатора, в работе синтезировано из АТФ 13 мг хроматографически очищенного ц-ди-АМФ.

Кроме того, впервые была продемонстрирована возможность повторного использования ДАЦ в виде телец включения для многократного синтеза ц-ди-АМФ.

ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧЕСКИХ И ТЕРАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПРОКТОВЕРИН

Гапанович В.Н.¹, Фарбер В.Л.², Парахня Е.В.¹, Васильева Е.Н.¹, Павленко В.С.¹, Бердина Е.Л.¹, Власенко Е.К.¹, Андреев С.В.¹, Голякович В.В.²

¹РУП «Научно-практический центр ЛОТИОС», Республика Беларусь, 220034, г. Минск, ул. З. Бядули, 10; lotios@yandex.ru

²ООО «Рубикон», Республика Беларусь, 210002, г. Витебск, ул. М. Горького 62Б, secretar@rubikon.by

Введение. К настоящему времени накоплен значительный опыт, свидетельствующий о том, что многие биологически активные вещества могут оказывать неблагоприятное воздействие на развивающийся плод и новорожденных. Наибольшую опасность представляют развитие тератогенных эффекты, под которыми понимают анатомические пороки развития, нарушения гистогенеза с последующей функциональной неполноценностью органов и систем у плода. Этиология большинства врожденных уродств до конца не ясна [1]. Установлено, что приём лекарственных препаратов (ЛП) в первый триместр беременности (период органогенеза) сопряжен с особым риском развития тератогенных эффектов. Фармакотерапия



во второй и третий триместры, как правило, не приводит к появлению выраженных аномалий развития плода, но может осложняться различными нарушениями функций органов, психического и физического статуса новорожденных [2]. С учетом вышеизложенного в соответствии с современными нормативными требованиями все новые ЛП до применения в клинической практике подлежат изучению на лабораторных животных с целью уточнения потенциально возможных рисков проявления (оригинальные, инновационные) тератогенных свойств на лабораторных животных.

На базе научно-исследовательской лаборатории ООО «Рубикон» разработан комбинированный препарат для лечения геморроя Проктоверин, в состав которого входят следующие активные вещества – бензокаин, папаверина гидрохлорид, декспантенол и цетилпиридиния хлорид.

Цель исследования – провести изучение возможных проявлений эмбриотоксических и тератогенных свойств (антенатальный период) лекарственного препарата «Проктоверин, суппозитории ректальные в контурной ячейковой упаковке № 5×2, № 7×2» при ректальном введении крысам линии Вистар.

Материалы и методы. В опытах использовано 80 беременных крыс-самок и 40 крыс-самцов линии Вистар, массой 230-260 г.

По результатам анализа вагинального мазка определяли готовность самки к спариванию (стадия проэструс, эструс). Самцов к самкам подсаживали в соотношении 1:2 на одни сутки. Первым днем беременности считался день нахождения сперматозоидов в вагинальном мазке.

Из отобранных беременных самок формировали 8 экспериментальных групп крыс: группа интактных животных (не осуществляли никаких введений), 3 контрольные (введение плацебо – твердый жир, основа суппозиторий) и 4 опытные группы (введение ЛП Проктоверин). Каждая группа состояла из 10 беременных самок.

ЛП Проктоверин вводили ректально один раз в сутки, утром в одно и то же время в доимплантационный период (с 1 по 6 сутки беременности) в 10-кратной суточной терапевтической дозе (2867 мг/кг массы тела), в период органогенеза (с 6 по 16 сутки) в суточной терапевтической дозе (286,7 мг/кг массы тела) и 10-кратной суточной терапевтической дозе (2867 мг/кг массы тела) и в период фетогенеза (с 6 по 16 сутки) в 10-кратной суточной терапевтической дозе (2867 мг/кг массы тела). Крысам контрольных серий плацебо вводили в аналогичные периоды беременности в дозе 2867 мг/кг массы тела.

Во время эксперимента ежедневно проводили наблюдение за общим состоянием и поведением крыс-самок. На 1, 7, 14 и 20 сутки беременности животных взвешивали для выявления возможного токсического действия изучаемого ЛП.

На 20-е сутки беременности самок выводили из эксперимента путем декапитации (с предварительной ингаляцией CO₂) и вскрывали. После вскрытия брюшной полости извлекали рога матки, подсчитывали в них количество живых, мертвых и резорбированных плодов, а также количество мест имплантации. Визуально оценивали состояние яичников и определяли количество желтых тел. Осматривали и взвешивали плаценту. У плодов проводили наружный осмотр с целью выявления внешних аномалий, взвешивали и определяли кранио-каудальный размер.

Для проведения гистологического исследования плоды от каждой самки фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. Эмбрионы с визуально регистрируемыми пороками развития фиксировали отдельно. Осуществляли гистологическое исследование эмбрионов всех экспериментальных групп.

Статистический анализ проводили с помощью лицензионного пакета программ «GraphPad Prism 7/00/288» методами непараметрической статистики. Различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты. В ходе исследования эмбриотоксических и тератогенных свойств ЛП Проктоверин не регистрировали случаев гибели беременных самок. У животных опытных



и контрольных групп не отмечено проявления признаков интоксикации, а также статистически достоверных различий при сравнении значений абсолютной массы тела беременных крыс и ее прироста между всеми экспериментальными группами.

При изучении эмбриотоксического и тератогенного действия ЛП Проктоверин у крыс-самок, получавших исследуемый препарат в суточной терапевтической дозе и 10-кратной суточной терапевтической дозе, количество желтых тел, живых и мертвых плодов не изменялось в зависимости от дозы и периода ректального введения ЛП, и находилось в пределах диапазона значений, зарегистрированных для интактных животных и крыс контрольных групп. Также не было отмечено достоверных различий в количестве резорбций во всех контрольных и опытных группах беременных крыс относительно интактных животных. Статистически достоверное (на 13,2%) уменьшение массы плацент при сравнении со значениями данного показателя у интактных животных регистрировали в 1 опытной группе крыс (период органогенеза).

При макроскопическом изучении плацент от части животных опытных и контрольных серий были обнаружены белесоватые ободки по периферии.

Наибольшее количество подобных внешних макроскопических изменений в плацентах обнаружено в доимплантационный и плодный периоды, как в контрольных группах животных, так и при введении ЛП Проктоверин. В период органогенеза доля выявленных плацент с белесоватым налетом была значительно меньше в 3 опытной группе (доза 287,6 мг/кг), чем в аналогичный период в контрольной (1,8% и 10%, соответственно). При изучении соматометрических параметров плодов установлено следующее: масса 20-суточных плодов в 1 (введение ЛП в доимплантационный период в дозе 2867 мг/кг), 2 (введение ЛП в период органогенеза в дозе 2867 мг/кг) и 3 (введение ЛП в период органогенеза в дозе 286,7 мг/кг) опытных группах была достоверно меньше массы плодов интактных крыс – на 14,0, 6,0 и 8,4%, соответственно. В 1 опытной группе также отмечено значимое уменьшение (на 19,9%, $p < 0,05$) массы плодов при сравнении с соответствующей контрольной группой животных.

Сравнение кранио-каудальных размеров плодов в 1, 2, 3 и 4 опытных группах с плодами интактных и контрольных групп достоверных различий не выявило.

При макроскопическом изучении анатомического строения плодов внешних аномалий развития в опытных и контрольных сериях животных выявлено не было.

Во всех экспериментальных группах у некоторых плодов при внешнем осмотре были обнаружены гематомы небольших размеров, в основном в области головы, шеи, спины, хвоста, передних и задних конечностей. При введении беременным самкам 1 опытной группы ЛП Проктоверин в дозе 2867 мг/кг в доимплантационный период, с 1 по 6 сутки беременности, этот показатель составил 15,2%. При введении исследуемого ЛП крысам 2 опытной группы в период органогенеза (6-16 сутки) в дозе 2867 мг/кг и 3 опытной группе – в дозе 286,7 мг/кг гематомы были выявлены у 9,4% и 11,6% плодов, соответственно. В период фетогенеза (16-19 сутки гестации) в опытной группе плоды с гематомами составляли 5,4%.

В 1 контрольной группе беременных самок, которым вводили плацебо с 1 по 6 сутки беременности, гематомы обнаружены у 13,2% плодов, во 2 контрольной группе (введение плацебо с 6 по 16 сутки) – у 11,8% плодов, и в 3 контрольной группе (введение плацебо с 16 по 19 сутки) – у 4,1%. У интактных беременных самок гематомы были обнаружены у 0,9% плодов.

Статистический анализ результатов изучения предимплантационной, постимплантационной и общей эмбриональной смертности между сравниваемыми экспериментальными группами достоверных различий не выявил.

Проведенное гистологическое исследование плодов и плацент всех экспериментальных групп беременных крыс не выявило отклонений в развитии основных органов жизнеобеспечения плодов при ректальном введении ЛП Проктоверин в исследуемых дозах на внутриутробном этапе онтогенеза. Гистологическое строение коры, паравентрикулярных зон, продолговатого мозга, спинного мозга, также, как и строение других органов и тканей, соответствовало сроку фетогенеза. Тератогенных отклонений в развитии органов и тканей в



какой-либо группе, а также межгрупповых различий не было выявлено. Гистологическое строение плацент было сходным во всех экспериментальных группах и соответствовало сроку пренатального развития.

Заключение. Результаты проведенного исследования показали, что наиболее чувствительным периодом развития плодов к ректальному введению ЛП Проктоверин являлся доимплантационный (с 1 по 6 сутки беременности). Изучения предимплантационной, постимплантационной и общей эмбриональной смертности между сравниваемыми экспериментальными группами достоверных различий не выявило. При гистологическом исследовании не обнаружено аномалий развития плодов крыс опытных серий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Friedman J.M, Polifka J.E. Teratogenic effects of drugs: a resource for clinicians (TERIS). 2nd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2000. – 793 p.
2. Scialli A.R. A clinical guide to reproductive and development toxicology. Boca Raton (FL): CRC Press Inc., 1992. – 284 p.

STUDY OF EMBRYOTOXIC AND TERATOGENIC PROPERTIES THE DRUG PROCTOVERINE

Gapanovich V.N.¹, Farber V.L.², Parakhnya E.V.¹, Vasilyeva E.N.¹, Pavlenko V.S.¹,
Berdina E.L.¹, Vlasenko E.K.¹, Andreyev S.V.¹, Golyakovich V.V.²

¹RUE "Scientific and Practical Center LOTHIOS", Republic of Belarus, 220034, Minsk,
Z. Byaduli str., 10; lotios@yandex.ru

²Rubicon LLC, Republic of Belarus, 62B M. Gorky str., Vitebsk, 210002, secretar@rubikon.by

Proctovertine is a combined drug for the treatment of hemorrhoids, which includes the following active substances – benzocaine, papaverine hydrochloride, dexpanthenol and cetylpyridinium chloride. It is used as part of complex therapy in patients with hemorrhoids in the I-II degree phase of exacerbation. The study of the embryotoxic and teratogenic properties (antenatal period) of the drug Proctovertin showed that the most sensitive period of fetal development to rectal administration of Proctovertin was preimplantation (from 1 to 6 days of pregnancy). The study of preimplantation, postimplantation and total embryonic mortality between the compared experimental groups did not reveal significant differences. Histological examination revealed no abnormalities in the development of fetuses of rats of experimental series.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ЭОЗИНА ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ РЕАКЦИЙ ФАГОЦИТОЗА IN VITRO

Герловский Д.О.¹, Литвинко Н.М.¹, Константинов Ф.О.²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, denis2904-83@mail.ru

²Белорусский государственный университет, Республика Беларусь, г. Минск,
220030, пр. Независимости, 4, БГУ, Биологический факультет,

Химиотерапия инфекционных и онкологических заболеваний связана с высокой токсичностью и низкой специфичностью используемых препаратов, а также их малой способностью целенаправленно проникать к месту локализации патогена. Перспективным способом доставки лекарственных препаратов является использование различных природных мембран и их компонентов, например, бактериальных тений – освобождённых от цитоплазмы клеточных оболочек, у которых сохраняются поверхностные антигены. Такие контейнеры обладают иммунологической активностью, могут направленно доставлять препараты к



различным клеткам, в частности, к макрофагам, что может быть использовано при терапии хронических инфекций с характерным незавершённым фагоцитозом патогенного агента.

Целью настоящей работы являлось создание наноконтейнеров на основе липосом и протеоллипосом для адресной доставки препаратов, а также сравнение их свойств в реакциях фагоцитоза *in vitro*.

Методы исследования. Липосомы получали из фосфатидилхолина, протеоллипосомы приготавливали на основе этого же липида с добавлением суспензии теней бактерий *Bacillus subtilis* в изотоническом фосфатном буфере. Для визуализации полученных результатов в качестве препарата включения использовали эозин.

Клетки *Bacillus subtilis* культивировали в пептонно-дрожжевом агаре при 37°C и 120 об/мин 72 ч. Суспензию клеток центрифугировали при 9000 об/мин 15 мин и отмывали в фосфатном буфере в таком же режиме 3 мин. Отмытые клетки инкубировали в растворе смеси кислот согласно методике [1] 1 ч при 37°C. Полученные тени отмывали трижды в фосфатном буфере с центрифугированием при 9000 об/мин 3 мин. Отмытые тени ресуспендировали в фосфатном буфере и хранили при 4°C [1].

При получении протеоллипосом, включающих фосфатидилхолин и бактериальные тени, общий объём смеси составлял 2 мл. Раствор фосфатидилхолина (21 мкл, 187 мкмоль/мл) добавляли в пластиковую пробирку, упаривали хлороформ до получения фосфолипидной плёнки, затем добавляли эозин (0,1 М) и суспензию бактериальных теней в фосфатном буфере до конечного объёма, смешивали, взбалтывали на миксере 10 мин, помещали в стакан со льдом и обрабатывали ультразвуком (22 кГц) в течение 15 с. Липосомальный эозин получали аналогичным способом с использованием фосфатного буфера вместо суспензии бактериальных теней. Липосомальные препараты отделяли от свободного эозина методом гель-фильтрации.

Результаты. Получены наноконтейнеры с включенным в липосомы и протеоллипосомы эозином. Количественное содержание белка в составе протеоллипосом с эозином определяли по методу Лоури с использованием реактива Фолина-Чокальтеу при 750 нм. Наличие фосфатидилхолина в полученных наноконтейнерах определяли тонкослойной хроматографией после его экстракции. Пробу объёмом 0,5 мл растворяли в 0,5 мл смеси хлороформа и метанола в соотношении компонентов 2:1, отделяли хлороформную фазу, наносили капилляром на пластинку и помещали в камеру для хроматографии. В качестве системы растворителей использовали смесь хлороформа, метанола и воды с соотношением компонентов 65:25:4. Полученную хроматограмму проявляли реактивом Васьковского. Фосфолипид приобретал синее окрашивание [2]. Концентрация белка в препаратах протеоллипосом составила 0,086 мг/мл, количество фосфолипида – 1-1,5 мкмоль/мл.

Кроме того, проводили сравнительный анализ спектров поглощения индивидуального эозина и его включенной формы в виде липосом и протеоллипосом. Эозин имеет максимум поглощения при 515 нм (525 нм). Включение эозина в липосомы и протеоллипосомы сопровождается нивелированием пика максимума в его спектре при этой длине волны. В то же время, раствор эозина в ультрафиолетовой области спектра не имеет максимумов поглощения, а полученные липосомы и протеоллипосомы имеют максимумы поглощения при 209 нм, характерные для фосфатидилхолина.

Выполнена постановка реакции фагоцитоза *in vitro*. Три пробы обработанной гепарином крови объёмом 4,5 мл инкубировали при 37°C в течение 18 ч с липосомальным эозином, эозином в составе протеоллипосом, и эозином в чистом виде. После инкубации кровь разделяли на фракции в изотоническом растворе желатина (0,3%) в течение 1 ч. Отбирали фракцию, содержащую лейкоциты. Клетки центрифугировали при 1000 об/мин 15 минут и отмывали физиологическим раствором. Затем клетки разрушали ультразвуком. Суспензию центрифугировали, отбирали супернатант и определяли оптическую плотность при 525 нм в сравнении с плазмой крови.

Оптические плотности клеточных экстрактов в области максимума поглощения эозина статистически достоверно различаются. Данные представлены на рисунке.

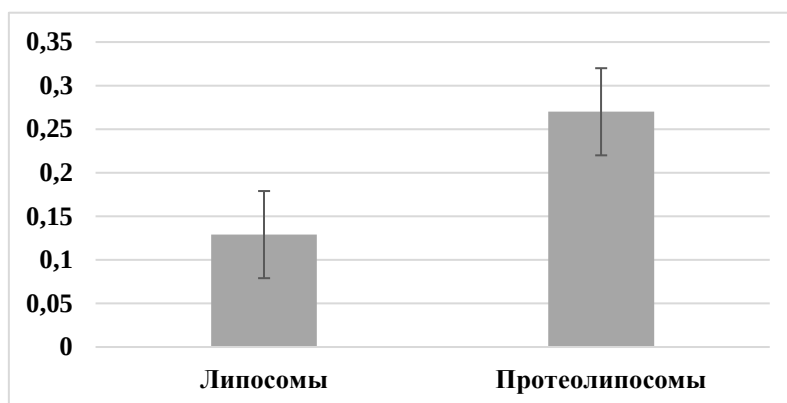


Рисунок. Диаграмма оптических плотностей клеточных экстрактов фракции лейкоцитов при 525 нм

Полученный результат (повышение оптической плотности в случае протеолипосом) объясняется преимущественным фагоцитозом протеолипосом, за счёт белок-белковых взаимодействий наноконтейнера и поверхностных структур лейкоцита.

Заключение. Таким образом, были получены липосомы, протеолипосомы из фосфатидилхолина и клеточных теней *Bacillus subtilis*, содержащие эозин во внутреннем пространстве, а также выявлены различия в оптической плотности клеточных экстрактов в области максимума поглощения эозина при использовании липосомального и протеолипосомального препарата в ходе постановки реакции фагоцитоза с последующим разрушением лейкоцитарной фракции крови, что свидетельствует о преимущественном фагоцитозе протеолипосом, за счёт белок-белковых взаимодействий наноконтейнера и поверхностных структур лейкоцита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hydrochloric acid-treated *Bacillus subtilis* ghosts induce IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha in murine macrophage / Kim Y.-M. // Mol. Cell. Toxicol. – 2022. – Vol. 18(2). – P. 267-276.
2. Литвинко Н.М. Активность фосфолипаз A2 и C при биохимическом моделировании: монография / Нац. акад. наук Беларуси, Гос. науч. учреждение «Ин-т биоорг. химии» – Минск: Технопринт, 2002. – 349 с.

OBTAINING AND USE OF LIPOSOMAL EOSIN FOR CARRYING OUT PHAGOCYTOSIS REACTIONS IN VITRO

Gerlovsky D.O.¹, Litvinko N.M.¹, Konstantinov F.O.²

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, denis2904-83@mail.ru*

²*Belarusian State University, Faculty of Biology, Department of Microbiology*

Liposomes, proteoliposomes from phosphatidylcholine and cell shadows of *Bacillus subtilis*, containing eosin in the internal space, were obtained. The differences in the optical density of cell extracts in the region of eosin absorption maximum were revealed when liposomal and proteoliposome preparations were used in the course of a phagocytosis reaction followed by the destruction of the leukocyte fraction of the blood. This is indicative of the predominant phagocytosis of proteoliposomes due to protein-protein interactions of the nanocontainer with leukocyte surface structures.



ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ПРИ АНТИПСИХОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ: НЕОБХОДИМО ИЛИ ЖЕЛАТЕЛЬНО?

Голоенко И.М.¹, Объедков В.Г.², Докукина Т.В.³, Синявская М.Г.¹

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», 220141, Минск, ул. Скорины 34, cytoplasmic@mail.ru

²УО «Белорусский государственный медицинский университет» 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, ObyedkovVG@gmail.com

³ГУ РНПЦ психического здоровья МЗ РБ, 220053, Минск, Долгиновский тракт, 152, polak0208@mail.ru

Стремительный прогресс в методах генетического и биоинформатического анализа сделал возможным изучение и выбор генетических маркеров с целью персонализации медикаментозной терапии. В медицинской практике накапливаются и осваиваются различные клинические протоколы фармакогенетического тестирования перед назначением препаратов. Алгоритмы применения этих протоколов осложнены необходимостью сопоставления генетических и клинических данных для принятия решения о назначении терапии. Существуют ли в настоящее время факторы, которые могли бы быть решающими аргументами в пользу фармакогенетического тестирования? Как оперативно использовать интерпретацию результатов генетических тестов для рутинной клинической практики? Возможно ли использование предлагаемых алгоритмов персонализации фармакотерапии применительно к имеющимся стандартным клиническим протоколам? Эти и ряд других вопросов становятся, в настоящее время, все более актуальными в медицинской практике.

В лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси в рамках различных программ совместно с РНПЦ Психического здоровья проводились исследования в области фармакогенетики антипсихотиков. Важным этапом наших исследований в настоящий момент, является обобщение полученных нами данных, для ответа на поставленные выше вопросы.

В поисках локусов генов, ассоциированных с риском нежелательных лекарственных реакций и неэффективности антипсихотической терапии, ранее нами был выявлен ряд предиктивных маркеров. Такими маркерами явились генотипы и аллели полиморфных локусов генов дофаминавого рецептора второго типа *DRD2/ANKK1*, фермента цитохрома P 450 *CYP2D6*, Р-гликопротеина *MDR1*, ферментов глутатион-S-трансфераз *GST-M1*, *GST-T1* системы детоксикации ксенобиотиков [1]. Для этих маркеров были определены популяционные частоты для жителей Беларуси и оптимальное количество тестируемых локусов для предикции осложнений [2], обозначены маркеры риска резистентности к терапии антипсихотиками [3,4]. По результатам исследований нами была подготовлена инструкция и разработан патент [5] для дальнейшего внедрения в рутинную клиническую практику фармакогенетического тестирования. Оформлены и используются протоколы для платного генотипирования в лабораториях Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Однако сегодня в практике врача-психиатра принятие решения о проведении тестирования перед назначением антипсихотической терапии является скорее исключением, чем правилом. Во-первых, тестирование не является плановой процедурой до назначения терапии и пока не может проводиться у всех пациентов. Во-вторых, рекомендации по выбору препарата на основе тестирования не могут быть абсолютной гарантией успешности терапии, но увеличивают вероятность отсутствия побочных эффектов и корректного назначения дозы.

Однако фармакогенетическое тестирование может помочь в поиске причин в группе пациентов с частыми госпитализациями и резистентностью к терапии. Возможно, пока именно для этой части пациентов, частое пребывание которых в стационаре финансово наиболее затратно для государственного бюджета, можно оптимизировать персонализированное назначение антипсихотической терапии и включать в клинические алгоритмы возможность фармакогенетического тестирования?



При этом, на наш взгляд, как минимум важно опираться на доступное каждому специалисту обоснование международного фармакогенетического сообщества (PharmGKB), предоставляющего достоверную информацию о случаях, когда необходимо фармакогенетическое тестирование.

На настоящий момент по заключению PharmGKB для 12 антипсихотиков (Pimozide, Aripiprazole, Clozapine, Perphenazine, Thioridazine, Haloperidol, Sertindole, Olanzapine) значимость фармакогенетического тестирования перед выбором препарата является **доказанной**. Тестирование для перечисленных препаратов относится к категориям «требуемого», «целесообразного» и «информативного», которое дается только с высоко достоверной связью «лекарство-ген». Многие из белорусских аналогов вышеперечисленных препаратов в настоящее время используются в психиатрии.

Важно отметить, что единственным главным фармакогеном, как значимым биомаркером при генетическом тестировании, для определения риска осложнений и назначаемых доз нейролептиков, международным фармакогенетическим сообществом утвержден высокополиморфный ген фермента цитохрома P450 *CYP2D6*. Так как с высоким полиморфизмом данного гена связано изменение функции фермента *CYP2D6*, в результате чего могут возникать побочные реакции на лекарственные средства и значительно снижаться эффективность терапии, PharmGKB-ресурс дает протоколы назначения антипсихотиков в зависимости от присутствия генотипов и аллелей риска. Для 23,5% европейского населения, являющихся носителями аллеля *4, присутствует риск снижения метаболизма, по меньшей мере, для 48 препаратов, в том числе антипсихотиков и антидепрессантов, связывающихся с *CYP2D6*. По результатам наших исследований по полиморфному локусу гена *CYP2D6**4 носительство мутантного гомозиготного генотипа *AA* увеличивает риск развития акатизии более чем в 2 раза, носительство аллеля *A* в 2 раза увеличивает риск паркинсонизма, вероятность тяжелого исхода шизофрении также более, чем в 2 раза увеличивается у пациентов с генотипами *AA*, *AG* и аллелем *A*.

Таким образом, фармакогенетическое тестирование при персонализации антипсихотической терапии является необходимым для гена *CYP2D6* (в первую очередь в группе пациентов с частой госпитализацией) для препаратов и их аналогов, указанных международным фармакогенетическим сообществом и желательно для других препаратов, связывающихся с *CYP2D6*.

Мероприятия по созданию и обучению использованию в психиатрических клиниках баз данных по биомаркерам риска нежелательных лекарственных реакций и резистентности к антипсихотической терапии, ускорит стремление врача сделать выбор при назначении препаратов более успешным. К сожалению, проведение фармакогенетического тестирования пока главным образом возможно либо на платной основе в частных медицинских центрах, либо в рамках научных программ. Однако оптимизировать взаимодействие генетики и медицины на стыке клинической фармакогенетики возможно и необходимо уже сегодня, используя уже полученные результаты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Связь риска возникновения острых лекарственно индуцированных экстрапирамидных расстройств при антипсихотической терапии параноидной шизофрении с полиморфизмом генов нейрометаболизма и системы детоксикации ксенобиотиков / Горгун О.В. [и др.] // Военная медицина. – 2019. – №1. – С. 32-40.
2. Анализ количественного распределения генотипов риска лекарственно-индуцированных экстрапирамидных осложнений у больных шизофренией / Голоенко И.М. [и др.] // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 22-23.
3. Генетические факторы риска фармакорезистентности при тяжелом исходе шизофрении / Обьедков В.Г. [и др.] // Всероссийский конгресс с международным участием «Психоневрология: Век XIX – Век XXI», 12-13 мая 2022 года, Санкт-Петербург / СПб.: НМИЦ ПН им. В.М. Бехтерева, 2022. – 272 с.



4. Possible association of polymorphism Cyp2d6 * 4 with frequent hospital stay of patients with schizophrenia / Golubeva T. [et al.] // Pol. J. Appl. Sci. – Vol. 6(2). – P. 29-33.
5. Способ прогнозирования риска акатизии и паркинсонизма, индуцированных антипсихотической терапией шизофрении / Патент от 2020.09.04, №а 20170460 // Авторы: О.Г. Давыденко, В.Г. Обьедков, И.М. Голоенко, О.Д. Левданский, О.В. Горгун, А.С. Кондратенко. Минск. – 2020. – 10 с.

**PHARMACOGENETIC TESTING IN ANTIPSYCHOTIC THERAPY:
NEEDED OR DESIRABLE?**

Halayenka I.M.¹, Obyedkov V.G.², Dokukina T.V.³, Sinyavskaya M.G.¹

¹*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,
cytoplasmic@mail.ru*

²*Belarusian State Medical University, Belarus, ObyedkovVG@gmail.com*

³*Republican Scientific and Practical Center for Mental Health, Belarus, polak0208@mail.ru*

The use of pharmacogenetic testing before prescribing antipsychotic drugs in clinical practice is still difficult. Testing is not a planned procedure before the appointment of therapy and cannot yet be carried out in all patients, and recommendations for choosing a drug based on testing cannot be an absolute guarantee of the success of therapy, but increase the likelihood of the absence of side effects and the correct dose. According to the results of our studies on the polymorphic locus of the CYP2D6 *4 gene, the carriage of the mutant homozygous AA genotype increases the risk of developing akathisia by more than 2 times, the carriage of the A allele by 2 times increases the risk of parkinsonism, the likelihood of a severe outcome of schizophrenia also more than 2 times increases in patients with the AA, AG genotypes and the A allele. We conclude that pharmacogenetic testing during personalization of antipsychotic therapy is necessary for the Cyp2D6 gene (primarily in the group of patients with frequent hospitalization) for drugs and their analogues indicated by the international pharmacogenetic community (PharmGKB) and is desirable for other drugs that have a CYP2D6 substrate.



ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТРАНСКУТОЛА НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ПРОПРАНОЛОЛА ГИДРОХЛОРИДА ИЗ ГЕЛЕЙ В ОПЫТАХ *IN VITRO*

Голяк Н.С.

Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь,
220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, goliakns@mail.ru

Резюме. Исследовано высвобождение пропранолола гидрохлорида из гелей без транскутола и с содержанием транскутола 2,5% и 5,0% м/м в опытах *in vitro* методом равновесного диализа через полупроницаемую мембрану из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 25 Å. Установлено, что транскутол не влияет на высвобождение пропранолола гидрохлорида в условиях эксперимента. Выход пропранолола гидрохлорида увеличивается пропорционально со временем диализа из трех образцов гелей, значимых различий в результатах нет.

Введение. Ифантильная гемангиома (ИГ) представляет собой доброкачественную сосудистую опухоль и встречается в 5-10% у детей первого года жизни и в 30% у недоношенных детей [1]. Впервые успешные результаты лечения ИГ пропранололом при пероральном приеме были случайно обнаружены и опубликованы французскими педиатрами в 2008 году [2]. Так как пропранолол относится к неселективным β -адреноблокаторам, при системном лечении ИГ пропранололом побочными эффектами могут быть брадикардия, гипотензия, гипогликемия, гиперкалиемия и бронхоспазм. Поэтому перспективным направлением является локальное использование пропранолола. Price A. с соавторами проанализировали литературные источники по местному применению пропранолола с целью лечения ИГ и нашли 12 статей в период с 2012 по март 2017 года, включающих 597 пациентов и 632 гемангиом. В работах использовали кремы, мази и гели пропранолола, которые готовили местные фармацевтические лаборатории, так как зарегистрированных лекарственных форм пропранолола для наружного применения не существует [3]. Химические энхансеры проницаемости усиливают высвобождение действующих веществ из мягких лекарственных форм. Среди усилителей проницаемости в последнее время часто используют транскутол – моноэтиловый эфир диэтиленгликоля [4]. Это соединение представляет собой жидкость с плотностью 0,9902 г/см³, химическая формула C₆H₁₄O₃, молекулярная масса 134,14 г/моль.

Цель. Исследование высвобождения пропранолола гидрохлорида из гелей без транскутола и с содержанием транскутола 2,5% и 5,0% м/м в опытах *in vitro*.

Материалы и методы. Гели пропранолола гидрохлорида готовили по следующей технологии: пропранолола гидрохлорид (производитель Changzhou Yabang Pharmaceutical Co., Ltd., Китай) растворяли в воде очищенной и получали раствор с концентрацией 5,0% м/м. Гидроксиэтилцеллюлозу (ГЭЦ, Natrosol 250 M, производитель Ashland) смешивали с пропиленгликолем. В полученную суспензию вливали при постоянном перемешивании приготовленный раствор пропранолола гидрохлорида и рассчитанное количество воды очищенной. В качестве энхансера проницаемости в гели добавляли 2,5% и 5,0% м/м транскутола (производитель Gattefosse). Конечная концентрация пропранолола гидрохлорида во всех гелях составляла 3% м/м, ГЭЦ – 1,5% м/м, пропиленгликоля – 25% м/м. Составы гелей приведены в таблице 1.

Качество гелей оценивали по внешнему виду (визуально) и количественному содержанию пропранолола гидрохлорида. Для количественного определения навеску исследуемого образца геля массой 1,25 г растворяли в 40 мл воды очищенной в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводили до метки водой очищенной, перемешивали; 1 мл полученного раствора количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили водой очищенной до метки, перемешивали. Измеряли оптическую плотность полученного раствора при 290 ± 2 нм в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм на спектрофотометре Varian Cary® 50, раствор сравнения – вода очищенная. Предварительно доказывали отсутствие



влияния вспомогательных веществ геля на максимум спектра пропранолола гидрохлорида. Для этого готовили образцы плацебо для всех трех гелей и разбавляли их водой очищенной аналогично тому, как готовили растворы для количественного определения. Концентрацию пропранолола гидрохлорида рассчитывали, используя калибровочный график. Каждый образец исследовали трижды.

Таблица 1. Составы гелей пропранолола гидрохлорида

	Количество на 100 г геля				
	5% м/м водный раствор пропранолола	пропилен-гликоль	ГЭЦ	вода очищенная	транскутол
Гель № 1 (без транскутола)	60,0 г	25,0 г	1,5 г	13,5 г	-
Гель № 2 (2,5% транскутола)	60,0 г	25,0 г	1,5 г	11,0 г	2,5 г
Гель № 3 (5,0% транскутола)	60,0 г	25,0 г	1,5 г	8,5 г	5,0 г

Высвобождение пропранолола гидрохлорида *in vitro* проводили методом равновесного диализа через полупроницаемую мембрану Visking dialysis tubing диаметром 49 мм. Диализную мембрану использовали из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 25 Å. Мембрану разрезали на прямоугольники размером 60×49 мм, предварительно замачивали в воде очищенной на 10 минут. На мембрану помещали образец геля в количестве 1,0 г и плотно закрепляли на диализную трубку диаметром 4 см. Трубку помещали в емкость с диализной средой на глубину 2-4 мм. Среда высвобождения – вода очищенная, температура – $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Температуру диализной среды поддерживали с помощью водяной бани. Объем среды высвобождения 100 мл. Диализ проводили в течение 6 ч. Частота отбора проб для анализа с восполнением среды высвобождения составила 1 ч; 2 ч; 3 ч, 6 ч. Объем отбора 5 мл. Для полученных проб регистрировали оптическую плотность на спектрофотометре Varian Cary®50 при длине волны $290 \pm 2\text{ нм}$ в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм. Концентрацию высвободившегося пропранолола гидрохлорида определяли исходя из оптической плотности растворов с известной концентрацией. Каждый образец исследовали трижды.

Результаты. Результаты оценки внешнего вида гелей и количественного содержания пропранолола гидрохлорида представлены в таблице 2.

Таблица 2. Оценка качества гелей

	Внешний вид	Количественное содержание пропранолола гидрохлорида, мг/г ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$) (n=3)
Гель № 1 (без транскутола)	Прозрачная бесцветная однородная гелеобразная масса, не содержащая посторонних примесей	$30,0 \pm 0,9$ мг/г
Гель № 2 (2,5% транскутола)	Прозрачная бесцветная однородная гелеобразная масса, не содержащая посторонних примесей	$30,0 \pm 1,3$ мг/г
Гель № 3 (5,0% транскутола)	Прозрачная бесцветная однородная гелеобразная масса, не содержащая посторонних примесей	$30,0 \pm 1,2$ мг/г



Результаты высвобождения пропранолола гидрохлорида из гелей представлены в таблице 3.

Таблица 3. Процент высвобождения пропранолола гидрохлорида из гелей

	% Высвобождения пропранолола гидрохлорида, ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$) (n=3)			
	1 час	2 часа	3 часа	6 часов
Гель № 1 (без транскутола)	25,1 $\pm$ 1,8	42,5 $\pm$ 2,3	61,2 $\pm$ 2,5	91,1 $\pm$ 3,2
Гель № 2 (2,5% транскутола)	26,8 $\pm$ 2,2	43,9 $\pm$ 2,4	62,6 $\pm$ 2,7	92,4 $\pm$ 2,3
Гель № 3 (5,0% транскутола)	25,9 $\pm$ 2,6	42,8 $\pm$ 3,1	61,7 $\pm$ 2,9	91,5 $\pm$ 2,8

Как видно из данных таблицы 3, значимых различий в высвобождении пропранолола гидрохлорида между образцами гелей нет. Четверть действующего вещества высвобождается уже через час эксперимента, через 6 часов более 90% переходит в среду растворения. Можно сделать вывод, что транскутол не влияет на высвобождение пропранолола гидрохлорида из гелей в исследованиях высвобождения *in vitro* методом равновесного диализа.

Заключение. Исследовано высвобождение пропранолола гидрохлорида из гелей без транскутола и содержанием транскутола 2,5% и 5,0% м/м в опытах *in vitro* методом равновесного диализа через полупроницаемую мембрану из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 25 Å. Установлено, что транскутол не влияет на высвобождение пропранолола гидрохлорида в условиях эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новые подходы к решению старой проблемы / Хачатрян Л.А. [и др.] // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2022. – Т. 21, № 1. – С.122-135.
2. Propranolol for severe hemangiomas of infancy / Léauté-Labrèze C. [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2008. – Vol. 358(24). – P. 2649-2651.
3. Topical propranolol for infantile haemangiomas: a systematic review / Price A. [et al.] // Journal Eur. Acad. Dermatol. Venereol. – 2018. – Vol. 32. – P. 2083-2089.
4. Химические транскутанные энхансеры. Транскутол / Струсовская О.Г., Поройский С.В., Струсовская А.Г. // Химико-фарм. журнал. – 2018. – Т. 52, № 11. – С.3-8.

EFFECT OF TRANSCUTOL ON PROPRANOLOL HYDROCHLORIDE RELEASE FROM GELS *IN VITRO*

Golyak N.S.

Belarusian State Medical University, 220116, Republic of Belarus, Minsk, 83 Dzerzhinsky Ave.,
goliakns@mail.ru

The release of propranolol hydrochloride from gels with transcutol 2,5% and 5,0% m/m and without transcutol has been investigated *in vitro* experiments using the method of equilibrium dialysis through a semi-permeable membrane consisting of regenerated cellulose with 25 Å pore diameter. Transcutol did not affect the propranolol hydrochloride release in experimental conditions. Propranolol hydrochloride yield proportionally increases with dialysis time from the three gel samples without significant differences between study groups.

NOVEL BENZIMIDAZOLE CONJUGATES WITH A BENZAMIDE LINKER AS POTENTIAL PROTEIN KINASE INHIBITORS: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Golyakovich A.V., Bozhok T.S., Panibrat O.V., Farina A.V., Kalinichenko E.N.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, kalinichenko@iboch.by*

In recent decades, therapies targeting various growth factor receptors have been developed and approved for cancer treatment. Small-molecule inhibitors of receptor protein kinases show excellent outcomes compared to conventional chemotherapy. However, tumors often develop resistance to such treatment, adjusting their kinase expression profile. In addition, various mutants protein kinases may appear. Thus, novel receptor protein kinase inhibitors with specific selectivity to overcome cancer cell resistance are desired.

The novel benzimidazole series was designed to meet the four main pharmacophore features reported for sorafenib (Figure1) [1]. Sorafenib is an oral receptor kinase inhibitor with activity against VEGFR-2, PDGF receptor- β , and Raf-1.

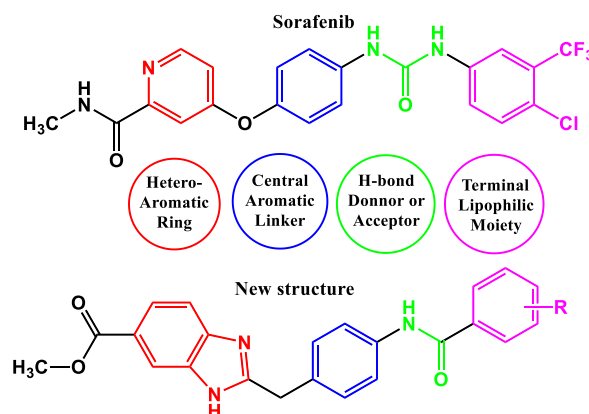
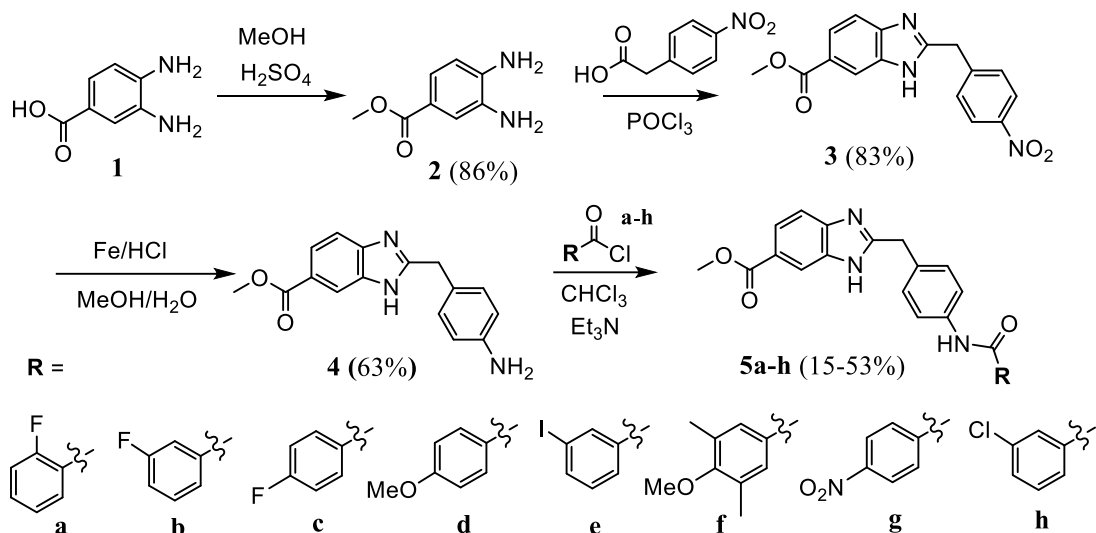


Figure 1. Design of the benzimidazole conjugates based on pharmacophore structural features of sorafenib

A key modification was conducted via replacing the pyridine base with its benzimidazole bioisostere. Benzimidazole is one of the most important and explored heterocyclic aromatic organic compounds because of their versatility in biological actions as well as synthetic applications in medicinal chemistry [2]. The structural similarity of amino derivatives of benzimidazole with purines makes it a fascinating nucleus for the development of anticancer agents.

As illustrated in Figure 1, the proposed benzimidazole derivatives **5a-h** exhibit pharmacophore features similar to sorafenib, where the terminal benzimidazole ring could occupy the hinge region of the ATP binding site. Also, the central aromatic benzene ring linked by a flexible CH_2 -bond could occupy the area between the hinge region and the DFG domain of the activation loop. In addition, the amide group could act as H-bond donors and/or acceptors and finally, the phenyl ring represents the terminal hydrophobic moiety that could occupy the allosteric hydrophobic pocket through several hydrophobic interactions [3].

Novel benzimidazole derivatives **5a-h** were synthesized by condensation of amine **4** with various benzoyl chlorides (**a-h**) according to the methodologies presented in Scheme 1. Amine **4** was obtained by reduction of nitro compound **3**, which in its turn was obtained by condensation of 3,4-diaminobenzoic acid methyl ester (**2**) with 4-nitrophenylacetic acid. Methylation of 3,4-diaminobenzoic acid (**1**) was carried out by heating in methanol in the presence of sulfuric acid. Next, the resulting methyl ester of 3,4-diaminobenzoic acid was condensed with 4-nitrophenylacetic acid in acetonitrile under the action of a 10-fold excess of phosphorus oxychloride at reflux.



Scheme. Synthesis of the target compounds **5a-h**

Reduction of benzimidazole derivative **3** was performed by refluxing it with iron powder and hydrochloric acid in the mixture of methanol and water. Resulting amine **4** was isolated from the reaction mixture by extraction. Substituted benzoyl chlorides (**a-h**) were obtained from corresponding acids and condensed with amine **4** in chloroform with triethylamine. The products were extracted from the reaction mixture, purified by liquid chromatography and crystallized from diethyl ether.

The structures of synthetic products were established by ^1H , ^{13}C , and ^{19}F NMR spectroscopy and mass spectrometry.

The prepared compounds were evaluated for their potential antitumor activity against HepG2 (human liver cancer), MCF-7 (breast adenocarcinoma), K562 (chronic myelogenous leukemia), HL-60 (promyelocytic leukemia), Caco-2 (colorectal adenocarcinoma), OKP-GS (renal cell carcinoma) and their corresponding selective cytotoxicity was estimated using normal human lymphoblastoid (RPMI 1788) cells (Table). Sorafenib was used as a positive reference compound.

Table. *In vitro* anti-proliferative activities of targets compounds **5a-h** against cancer cell lines and normal human lymphoblastoid cells (RPMI 1788)

Comp.	IC ₅₀ (μM) ¹						
	HepG2	MCF-7	K562	HL-60	Caco-2	OKP-GS	RPMI1788
5a	53.27	41.39	14.44	21.17	51.89	>50	18.59
5b	53.27	45.41	18.95	50.20	>50	>50	16.75
5c	59.10	59.38	15.33	>50	25.39	>50	48.79
5d	18.33	22.59	>50	>50	25.18	19.99	16.40
5e	>50	>50	28.53	>50	>50	>50	>50
5f	26.88	>50	>50	>50	>50	>50	23.36
5g	20.65	41.90	28.53	>50	27.45	58.43	16.47
5h	>50	>50	>50	>50	>50	>50	52.50
Reference Compounds							
Sor.	4.02	13.75	1.43	6.20	5.03	7.06	2.72

¹ IC₅₀ – the concentration that causes 50% growth inhibition.

Analysis of the results revealed that almost all compounds showed antiproliferative activity, but to a lesser extent than the reference compound sorafenib. So, we should note some features of the



properties of new derivatives. Compounds bearing a fluorobenzoyl moiety (**5a-c**) showed better selectivity and cytotoxic activity towards chronic myeloid leukemia K562 cell line (IC₅₀ values of 14.44, 18.95 and 15.33 μ M, respectively) than their analogs. Moreover, it is worthy to mention that the 4-methoxy derivative **5d** showed higher inhibitory activity towards HepG2 and OKP-GS cancer cell lines.

Thus, eight new benzimidazole conjugates with a benzamide linker were synthesized as potential inhibitors of protein kinases and tested for antiproliferative activity *in vitro*. Promising candidates for further structural modifications were found.

REFERENCES

1. Pharmacophore modeling studies of type I and type II kinase inhibitors of Tie2 / Q.Q. Xie [et al.] // J. Mol. Graph. Model. – 2009. – Vol. 27. – P. 751-758.
2. Benzimidazole: A Multifaceted Nucleus for Anticancer Agents / Y. Bansal [et al.] // Curr. Org. Chem. – 2021. – Vol. 25. – P. 669-694.
3. Design, synthesis, molecular modeling and biological evaluation of novel Benzoxazole-Benzamide conjugates via a 2-Thioacetamido linker as potential anti-proliferative agents, VEGFR-2 inhibitors and apoptotic inducers / I.H. Eissa [et al.] // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. – 2022. – Vol. 37. – P. 1587-1599.

НОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ БЕНЗИМИДАЗОЛА С БЕНЗАМИДНЫМ ЛИНКЕРОМ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНКИНАЗ: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Голякович А.В., Божок Т.С., Панибрат О.В., Фарина А.В., Калиниченко Е.Н.
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, kalinichenko@iboch.by

В качестве потенциальных ингибиторов протеинкиназ синтезировано восемь новых конъюгатов бензимидазола с бензамидным линкером и проведено тестирование их антипролиферативной активности *in vitro*. Обнаружены перспективные кандидаты для дальнейших структурных модификаций.

СОЕДИНЕНИЯ ЗОЛОТА, ИРИДИЯ И РУТЕНИЯ С ФОСФИТНЫМИ ЛИГАНДАМИ НА ОСНОВЕ ГЛЮКОЗЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ АГЕНТЫ

Гончар М.Р., Нинин Ф.С., Милаева Е.Р., Назаров А.А.
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991,
г. Москва, Ленинские горы, д.1, с. 3, mari.kainas@yandex.ru

Из-за многочисленных побочных эффектов препаратов платины ведется поиск новых противоопухолевых соединений других металлов. Комплексы золота, иридия и рутения активно изучаются для борьбы со злокачественными заболеваниями, поскольку данные металлы могут вызывать гибель раковых клеток, имея отличные от препаратов платины механизм действия и профиль токсичности.

Были получены три серии соединений, общая структура которых состоит из нескольких фрагментов: глюкоза (один из основных источников энергии в клетке, легко усваивается организмом), урацил или тимин (пиримидиновые основания, которые являются неотъемлемыми компонентами всех живых организмов и способствуют увеличению водорастворимости) или 5-фторурацил (биологически активное соединение с известным противоопухолевым действием, ингибирует процесс деления клеток путем блокирования синтеза ДНК и образования структурно несовершенной РНК), фрагмент бексаротена (агонист ретиноидного X рецептора, который применяется для перорального или местного лечения Т-



клеточной лимфомы) и атомов металлов (золота(I), иридия(II) или рутения(II)), которые обеспечивают цитотоксичное действие, отличное от механизма действия платиновых препаратов.

Для отбора соединений, как потенциальных лекарственных средств, важен такой физико-химический параметр, как стабильность соединений. Гидролиз серии комплексов рутения и золота был изучен методом ЯМР на ядре ^{31}P при создании раствора соединений в дейтерированной воде с 5% содержанием ДМСО. Было обнаружено, что гидролиз урацильного соединения происходит намного быстрее, чем тиминового. Изучив полученные данные, можно сделать вывод, что наличие одной метильной группы существенно повышает стабильность комплексов, что, по-видимому, связано с изменением гидрофильно-липофильного баланса [1,2].

Антипролиферативная активность полученных соединений была оценена с использованием МТТ-теста и выражена в концентрации полуингибирования IC_{50} .

Исследования показали, что введение в структуру фосфитов фрагмента бексаротена значительно увеличивает активность соединений: фосфиты обладают антипролиферативными свойствами в высоких или средних микромолярных концентрациях и почти во всех случаях более активны, чем исходное органическое противоопухолевое соединение.

Введение в структуры фосфитов хлорида золота(I) привело к снижению активности лигандов с бексаротеном, что может быть связано с быстрым гидролизом комплексов золота, а также с различными биохимическими препятствиями попадания в клетку комплексов, содержащих экзогенный металл. Комплексы иридия проявили сравнительно низкую активность по сравнению с сериями рутения или же золота. Комплексы рутения с модифицированными фосфитами можно назвать перспективными соединениями для дальнейшего изучения, поскольку значения IC_{50} ниже, чем у клинически используемого противоопухолевого соединения – цисплатина, или же незначительно ниже или выше на различных клеточных культурах. Видно, что соединения с фрагментом тимина и урацила оказались активнее почти в 5 раз аналогичного соединения с фрагментом 5-фторурацила, что говорит о важности заместителя в пиримидиновых основаниях.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что соединения рутения могут иметь уникальный механизм действия, который включает одновременное воздействие всех фрагментов комплексов на составляющие клетки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-53-26002.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hydrolytically stable organometallic ruthenium complexes with glucose-based phosphite ligands / Gonchar M.R. [et al.] // Russian Chemical Bulletin, Springer Nature. – 2022. – Vol. 71(5). – P. 962-966.
2. Ruthenium(II)-arene and triruthenium-carbonyl cluster complexes with new water-soluble phosphites based on glucose: Synthesis, characterization and antiproliferative activity / Gonchar Maria R. [et al.] // Journal of Organometallic Chemistry. – 2022. – Vol. 919. – P. 121312.

COMPOUNDS OF GOLD, IRIDIUM, AND RUTHENIUM WITH GLUCOSE-BASED PHOSPHITE LIGANDS AS PROMISING ANTIPROLIFERATING AGENTS

Gonchar M.R., Ninin F.S., Milaeva E.R., Nazarov A.A.

Lomonosov Moscow State University, mari.kainas@yandex.ru

Three series of compounds were obtained, the general structure of which consists of several fragments: glucose (one of the main sources of energy in the cell, easily absorbed by the body), uracil or thymine (pyrimidine bases that are integral components of all living organisms and contribute to an increase in water solubility) or 5-fluorouracil (a biologically active compound with a known antitumor effect, inhibits the process of cell division by blocking DNA synthesis and the formation of structurally imperfect RNA), a fragment of bexarotene (an agonist of the retinoid X receptor, which is used for oral or topical treatment of T-cell lymphoma) and metal atoms (gold (I), iridium (II) or



ruthenium (II)), which will provide a cytotoxic effect that is different from the mechanism of action of platinum drugs.

The antiproliferative activity of the obtained compounds was assessed using the MTT assay and expressed as the IC₅₀ half-inhibition concentration.

Based on the studies performed, it can be concluded that ruthenium compounds may have a unique mechanism of action, which includes the simultaneous action of all fragments of the complexes on the constituent cells.

СИНТЕЗ СЛОЖНОГО ЭФИРА АБИРАТЕРОНА, АЦИЛИРОВАННОГО МЕТИОНИНОМ

Грачева Ю.А., Берсенева Д.А., Ларин К.А., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, г. Москва,
ул. Ленинские горы д.1, стр.3, bersenevada1410@gmail.com*

Введение. По данным статистики рак предстательной железы занимает 2-е место (12,9%) в структуре онкологической заболеваемости у мужчин в России. Общепринятой методикой лечения таких пациентов является андрогенная терапия. Необходимость гормональной терапии возникает у 30% пациентов, перенесших хирургическое лечение или лучевую терапию, ввиду развития у них рецидива заболевания. Гормональная терапия у значительного числа пациентов приводит к длительной ремиссии заболевания, однако неизбежно развивается кастрационно-резистентная форма рака предстательной железы. Критичным ферментом в синтезе андрогенов является цитохром P450 (CYP17A).

Абиратерон (ZYTIGA®) – полусинтетический стероидный ингибитор цитохрома P450 необратимо блокирует гидроксилазную и лиазную активность CYP17A и применяется для лечения метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы в виде пролекарства – абиратерона ацетата в дозе 1 г/сутки. [1,2] Абиратерон подвергается метаболизму в печени с участием цитохрома P450, преимущественно CYP3A4 и 2D6, включая сульфатирование, гидроксилирование и окисление. В ходе лечения у пациентов могут развиваться признаки гепатотоксичности (повышение активности аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы или концентрации билирубина), что требует сокращения вводимой дозы до 500 мг, а, следовательно, снижает эффективность терапии [3]. С целью поиска новых эффективных ингибиторов CYP17A ведутся исследования по модификация молекулярной структуры абиратерона [4].

Цель работы – разработка синтетической схемы получения и синтез прототипа лекарственного препарата абиратерона, ацилированного метионином, L-метионин, (3β)-17-(3-пиридинил)андроста-5,16-диен-3-ил эфира, и проведение первичного скрининга.

Данная работа направлена на модификацию абиратерона путем введения фрагмента аминокислоты метионина. Выбор метионина обусловлен его применением в качестве гепатопротекторного средства для предупреждения токсических поражений печени [5]. Гидролиз ацилированного абиратерона в клетке позволит вводить одновременно метионин, который выполняет функцию гепатопротектора, что, в свою очередь, обеспечивает сочетанный эффект действия комбинации препаратов.

Общая формула L-метионин, (3β)-17-(3-пиридинил)андроста-5,16-диен-3-ил эфира приведена в патенте [4], однако синтез целевого продукта не описан.

Методы исследования. Соединение L-метионин, (3β)-17-(3-пиридинил)андроста-5,16-диен-3-ил эфир получен многостадийным синтезом и охарактеризован с помощью ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии.

Результаты. В качестве исходного вещества были использованы коммерчески доступные ацетат абиратерона и метионин. Первоначально проводили гидролиз ацетата абиратерона (выход продукта 92%). В спектре ЯМР ¹H в CDCl₃ абиратерона наблюдается



сдвиг сигнала в область сильного поля относительно ацетата абиратерона, что свидетельствует об образовании свободной ОН- группы. Затем проводили ацилирование абиратерона защищённой аминокислотой. В качестве защитной группы для метионина использовали *трет*-бутоксикарбонильную группу (Вос) с использованием $\text{Вос}_2\text{О}$. Образование продукта доказано методом ЯМР и масс-спектрометрии. Для активации аминокислоты использовали N-гидроксисукцинимид. В спектре ЯМР ^1H в CDCl_3 продукта наблюдается сдвиг сигналов, соответствующих пиридиновому кольцу в область сильного поля относительно сигналов в абиратероне. Об образовании продукта свидетельствует также соотношение интегральных интенсивностей сигналов протонов при двойных связях в абиратероне, протонов метильной группы метионина и протонов *трет*-бутильного фрагмента защиты. После снятия Вос-защиты получен целевой сложный эфир абиратерона и метионина с выходом 87%. Образование продукта также доказано методом ЯМР-спектроскопии.

При проведении скрининга в качестве образцов сравнения использованы абиратерон, абиратерона ацетат. Скрининг проведен с использованием ряда клеточных линий рака человека методом МТТ.

Заключение. В ходе настоящей работы предложена схема синтеза, получен и охарактеризован сложный эфир абиратерона и метионина – L-метионин, (3 β)-17-(3-пиридинил)андроста-5,16-диен-3-ил эфир. В соответствии с лабораторным регламентом реакции осуществляются при комнатной температуре при нормальных условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (№ 22-23-00295).

ЛИТЕРАТУРА

1. CYP17A1 inhibitor abiraterone, an anti-prostate cancer drug, also inhibits the 21-hydroxylase activity of CYP21A2 / Malikova J. [et al.] // Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. – 2017. – Vol. 174. – P. 192-200.
2. Experience with abiraterone acetate in the treatment of metastatic prostate cancer / Gritskevich A.A., Mishugin S.V., Rusakov I.G. // P.A. Herzen Journal of Oncology. – 2015. – Vol. 4(4). – P. 31-35.
3. Safety and efficacy of abiraterone acetate plus prednisolone in patients with castration-resistant prostate cancer: a prospective, observational, post-marketing surveillance study / Koroki Y. [et al.]. // Japanese Journal of Clinical Oncology. – 2021. – Vol. 51(9). – P. 1452-1461.
4. Patent US 2015/0337003 A1. Pub. Date: Nov. 26, 2015.
5. Methionine metabolism in chronic liver diseases: an update on molecular mechanism and therapeutic implication / Z. Li [et al.] // Sig. Transduct. Target Therapy. – 2020. – Vol. 5. – P. 280.

SYNTHESIS OF ESTER OF ABIRATERONE ACYLATED WITH METHIONINE

Gracheva Yu.A., Berseneva D.A., Larin K.A., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R.

Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, bersenevada1410@gmail.com

Abiraterone is a semi-synthetic steroid inhibitor of cytochrome P450 used as a prodrug in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. This work is aimed at modifying abiraterone by introducing a fragment of the amino acid methionine. The choice of methionine is due to its use as a hepatoprotective agent to prevent toxic liver damage. Hydrolysis of acylated abiraterone in the cell will allow simultaneous administration of methionine, which acts as a hepatoprotector, which, in turn, provides a combined effect of twin drug. In the course of this work, a synthesis scheme was proposed, and an ester of abiraterone and methionine (L-methionine, (3 β)-17-(3-pyridinyl)androsta-5,16-dien-3-yl ester) was obtained and characterized.



АПРОБАЦИЯ СИНТЕЗА И ПИЛОТНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ ПЕРСПЕКТИВНОЙ НЕИНЪЕКЦИОННОЙ ПЕПТИДНОЙ ЛЕЧЕБНО- ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Грибовская О.В.¹, Цыганков А.М.², Мартинович В.П.¹, Голубович В.П.¹, Янченко В.В.²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, olymelnik@yandex.ru

²Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»; 210009, Витебск, пр-т Фрунзе, 27, rst_vitebsk@inbox.ru

Вирус оспы обезьян (далее – ВОО) известен более 26 лет. В конце июня 2022 года комитет ВОЗ признал «чрезвычайный характер» ВОО обезьян и призвал контролировать распространение инфекции. Оспа обезьян – вирусное зоонозное заболевание, симптомы которого схожи с клиническими проявлениями натуральной оспы, однако течение болезни в случае оспы обезьян обычно менее тяжелое. После ликвидации натуральной оспы в 1980 г. и последующего прекращения использования вакцин против натуральной оспы на первое место по степени патогенности для человека среди ортопоксвирусов вышла оспа обезьян. ВОО представляет собой двуспиральный ДНК-вирус, относящийся к роду *Orthopoxvirus* в семействе *Poxviridae*. По результатам нескольких обсервационных исследований эффективность вакцины от натуральной оспы для профилактики оспы обезьян составляет около 85%. Вакцинированные от натуральной оспы в прошлом могут переносить оспу обезьян в более легкой форме. В 2019 г. для профилактики оспы обезьян была одобрена новая двухдозовая вакцина на основе модифицированного вируса коровьей оспы (штамм *Ankara*), доступ к которой пока ограничен [1,2]. Так, с целью проверки действия на клетки системы иммунитета, был синтезирован пептид р3-11, который представляет собой фрагмент поверхностного белка ВОО - I2L IMV membrane protein [Monkeypox virus Zaire-96-I-16 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAL40521.1>)], последовательностью Lys-Leu-Tyr-Ala-Ala-Ile-Phe-Gly-Val. В качестве сравнения мы использовали пептид вируса простого герпеса (далее – ВПГ), его аминокислотная последовательность – Arg-Met-Leu-Gly-Asp-Val-Met-Ala-Val, эта последовательность общая для ВПГ 1 и 2 типа. Был произведен биоинформационный анализ по алгоритму [3]. Пептид р3-11 имел IC₅₀ для HLA*A02:01, равную 2,5 нМ, был нетоксичен (LD₅₀ – 6000 мг/кг, 6 класс токсичности). Пептид ВПГ имел IC₅₀ для HLA*A02:01, равную 3,6 нМ, был нетоксичен (LD₅₀ – 2000 мг/кг, 4 класс токсичности).

Цель данного исследования – оценка влияния короткого синтетического пептида, основы неинъекционной лечебно-профилактической пептидной вакцины, на клетки крови человека в исследованиях *in vitro*.

Для идентификации клеток крови, ответивших на пептид, были использованы маркеры, которые экспрессируются на всех лейкоцитах (CD45), а также маркер стволовых клеток (CD34) и маркер ранней активации лимфоцитов (CD69) [4].

Было проведено анкетирование и исследование клеток крови 8 добровольцев в возрасте 19–20 лет, чьи образцы венозной крови собраны в июле–октябре 2022 года. Участникам было предложено заполнить ретроспективную анкету, добровольное информированное согласие. Вопросы в анкетах касались возраста, наличия хронических заболеваний, прививочного анамнеза.

Исследование показателей клеточного иммунитета проводили методом проточной цитометрии по следующему алгоритму: во взятую натощак венозную кровь с 100 ЕД гепарина добавляли пептид р3-11 или пептид ВПГ соответственно. В качестве контроля использовали цельную гепаринизированную кровь со смесью антител (CD45 PE-TR, CD34 R-PE, CD69 PE-Cy5.5). После инкубации и добавления лизирующего раствора оценивали 100 000 клеток. В таблице отражены результаты исследования.



Таблица. Количество стволовых клеток ($CD34^+$) и активированных лимфоцитов ($CD69^+$) на 100 000 клеток крови исследованных образцов

Образец крови	1	2	3	4	5	6	7	8
Исходное количество стволовых клеток ($CD34^+$) / акт. лимфоцитов ($CD69^+$)	229/1	169/2	122/35	31/112	38/40	27/18	69/70	35/45
Количество клеток ($CD34^+$) / ($CD69^+$) после 2 часов инкубации с пептидом р3–11	61/18	39/6	48/88	79/495	36/88	53/48	46/219	34/80
% изменения	-275,4/94,4	-333,3/66,6	-154,1/60,2	60,7/77,3	-5,5/54,5	49,0/62,5	-50/68	-2,9/43,7
Количество клеток ($CD34^+$) / ($CD69^+$) после 2 часов инкубации с пептидом ВПГ	51/74	69/508	38/69	58/10	21/1	63/53	72/166	38/88
% изменения	-349,0/98,6	-144,9/99,6	-221,0/49,2	46,5/-1020,0	-80,9/-3900,0	57,1/66,0	4,1/57,8	7,9/48,8

В каждой паре сравнения «до и после инкубации» имеется тенденция роста активированных пептидом р3–11 лимфоцитов ($CD45^+ CD69^+$), для пептида ВПГ – 6 из 8. Для 6 из 8 пар сравнения имеется тенденция снижения стволовых клеток ($CD45^+ CD34^+$) для пептида р3–11, для пептида ВПГ – 4 из 8, (рисунок).

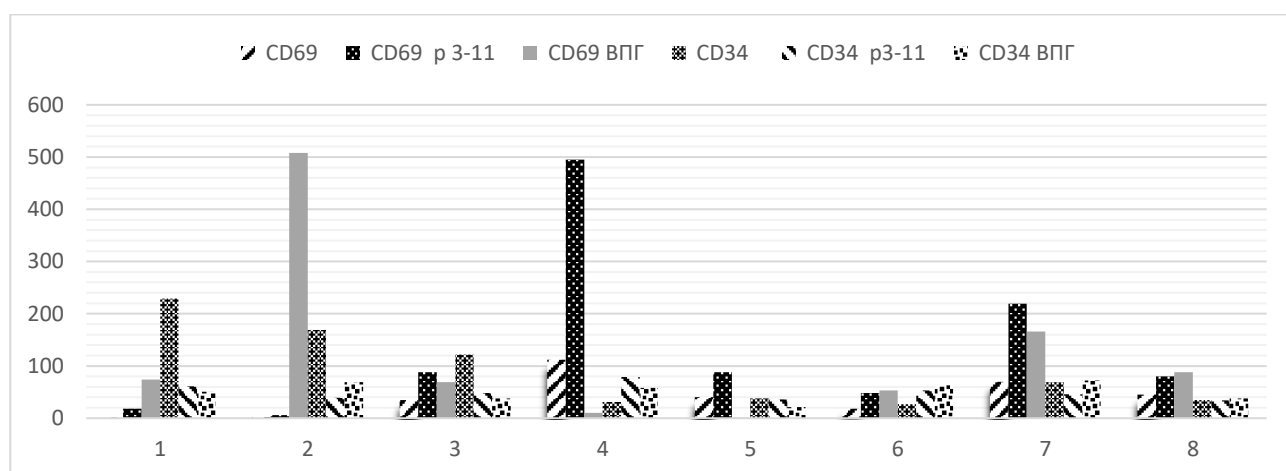


Рисунок. Количество клеток $CD34^+$ и $CD69^+$ до и после инкубации с пептидами ВПГ и р3–11 в крови добровольцев

Таким образом, пептид р3–11 активировал лимфоциты крови в тесте *in vitro* у всех 8 добровольцев, пептид ВПГ активировал лимфоциты у 4 из 8 добровольцев. Результат исследования показал, что чем ниже IC_{50} пептида, тем выше его иммуногенность и, как следствие, клеточный ответ.

Первым шагом в создании пептидной вакцины в РБ является подтверждение гипотезы об активации лимфоцитов короткими пептидами. Таким образом, используемый в этой работе пептид ВОО показал, что он активировал лимфоциты всех добровольцев, обладал более высокой иммуногенностью, чем пептид ВПГ. В нашей работе апробирован метод, позволяющий оценивать активацию короткими пептидами лимфоцитов периферической крови. Вне зависимости от HLA–A фенотипа исследуемых, пептид ВОО мог связываться с лимфоцитами, что говорит о его универсальности и косвенной распространенности HLA–A02:01 фенотипа или активации лимфоцитов со схожим HLA фенотипом. В дальнейших



исследованиях мы планируем увеличить количество участников исследования, включить для апробации метода пептиды из последовательности иных вирусных белков, изучить изменения концентрации гамма-интерферона под влиянием синтезированных пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. The WHO declaration of monkeypox as a global public health emergency / Nuzzo J.B., Borio L.L., Gostin L.O. // *Jama*. – 2022. – Т. 328. – №. 7. – С. 615-617.
2. Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison / Shchelkunov S.N. [et al.] // *FEBS letters*. – 2001. – Т. 509. – №. 1. – С. 66-70.
3. Поиск безопасных иммунодоминантных пептидов SARS COV-2 in silico / Цыганков А.М., Янченко В.В. // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. – 2021. – №. 3. – С. 45-55.
4. Effect of COVID-19 peptides on leukocytes / Olga V. Gribovskaya [et al.] // VII International conference on chemistry. Structure and function of biomolecules – Minsk, November 23-25, 2021. – Book of Abstracts, P. 87-88.

APPROBATION OF THE SYNTHESIS AND PILOT EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY OF A PROMISING NON-INJECTABLE PEPTIDE THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC VACCINE AGAINST MONKEYPOX VIRUS AND HERPES SIMPLEX VIRUS

Gribovskaya O.V.¹, Yanchenko V.V.², Tsygankov A.M.², Martinovich V.P.¹, Golubovich V.P.¹

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, olymelnik@yandex.ru*

²*Vitebsk State medical University, Vitebsk, Frunze Av., 27, Republic of Belarus,
rst_vitebsk@inbox.ru*

This work continues the study of synthetic peptides immunodominant for the HLA–A02:01 phenotype with a low calculated concentration of half-maximal inhibition. One of them is a fragment of the membrane protein of the monkeypox virus, peptide p3-11. The other is a fragment of the envelope glycoprotein of the herpes simplex virus, common to types 1 and 2 viruses. Both peptides were obtained by classical peptide synthesis in solution. The study involved 8 volunteers. The study of cellular immunity parameters was carried out using a Cytomics FC 500 flow cytometer. As a result of the work, the effect of synthetic peptides on blood cells was tested. We have shown that the studied synthetic peptides, which are possible candidates for peptide vaccines, changed the expression of CD34 and CD69 molecules in cells of the immune system. Regardless of the HLA–A phenotype of the subjects under study, the peptides could bind to a part of blood leukocytes, which indicates the universality of these peptides.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАВЫ КАДИЛА МЕЛИССОЛИСТНОГО

Гурина Н.С., Некрашевич Я.В.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»
220083, Республика Беларусь, г. Минск, пр. Дзержинского, 83, bsmu@bsmu.by*

Введение. В настоящее время в качестве наиболее перспективных антиоксидантов рассматриваются вещества природного, в т.ч. растительного происхождения. Согласно литературным данным, среди природных антиоксидантов, сочетающих низкую токсичность со способностью эффективно ингибировать процессы свободнорадикального окисления в живых организмах, ведущую роль играют фенольные соединения [1,2].

Определение антиоксидантной активности лекарственных растений и оценка ее эффективности является важнейшей задачей для разработки новых лекарственных препаратов, обладающих антиоксидантной активностью. В связи с этим перспективным



объектом исследования является трава кадила мелиссолистного (*Melittis melissophyllum* L.). Трава *M. melissophyllum* L. содержит широкий спектр биологически активных веществ, применяется в народной медицине [3], что обуславливает интерес к лекарственному растительному сырью с позиции изучения потенциальной антирадикальной активности.

Цель работы. Изучение антирадикальной активности водных и водно-спиртовых извлечений травы кадила мелиссолистного *in vitro*, используя DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) в качестве источника свободных радикалов.

Материалы и методы. Объектом исследования служила трава кадила мелиссолистного, собранная в период цветения в 2022 г. на учебно-полевом участке в д. Новое поле (Минский район, Минская область). Антирадикальную активность определяли по методу восстановления стабильного свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил в 96,4% этиловом спирте. Степень обесцвечивания раствора DPPH при добавлении извлечений определяли спектрофотометрически при длине волны 517 нм.

Результаты. Исследовано влияние полярности экстрагента на величину суммарной антирадикальной активности и выявлена обратно пропорциональная зависимость. Максимальная степень ингибирования свободных радикалов наблюдалась у 96,4% спиртового извлечения – 90,2%±0,9%, минимальная – у водного извлечения и составила 80,0%±1,6%.

Заключение. Полученные результаты показывают возможность использования травы кадила мелиссолистного как источника антиоксидантов, а также перспективность разработки лекарственных препаратов на его основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Antioxidant Activities of *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae) / B. Kaurinovic [et al.] // *Molecules*. – 2011. – Vol. 16(4). – P. 3152-3167.
2. Chemical Diversity of Bastard Balm (*Melittis melissophyllum* L.) as Affected by Plant Development / I. Szymborska-Sandhu [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25(10). – Art. 2421.
3. Лекарственные растения белорусской Фармакопеи / Н.С. Гурина [и др.]; под ред. Н.С. Гуриной. – Минск: «Профессиональные издания», 2020. – 235 с.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *MELITTIS MELISSOPHYLLUM* L. HERB

Gurina N.S., Nekrashevich Ya.V.

Educational Institution «Belarusian State Medical University»

220083, Republic of Belarus, Minsk, Dzerzhinsky Ave., 83, bsmu@bsmu.by

Currently, natural substances are considered as the most promising antioxidants, incl. plant origin. According to the literature data, among natural antioxidants that combine low toxicity with the ability to effectively inhibit free radical oxidation processes in living organisms, phenolic compounds play a leading role.

Determining the antioxidant activity of medicinal plants and evaluating its effectiveness is the most important task for the development of new drugs with antioxidant activity. In this regard, a promising object of research is *Melittis melissophyllum* L. herb. The *M. melissophyllum* L. herb contains a wide range of biologically active substances and is used in folk medicine, which causes interest in medicinal plant materials from the standpoint of studying potential antiradical activity.

Objective: to study the antiradical activity of water and water-ethanol extracts of the *Melittis melissophyllum* L. *in vitro* using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) as a source of free radicals.

Materials and methods. The object of the study was the *Melittis melissophyllum* L. herb, collected during the flowering period in 2022 year on a training field plot in the village of Novoye Pole (Minsk district, Minsk region). Antiradical activity was determined by the method of reduction of the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl in 96.4% ethanol. The degree of discoloration of the DPPH solution upon addition of extracts was determined spectrophotometrically at a wavelength of 517 nm.



Results. The influence of solvent polarity for extraction on the value of the total antiradical activity was investigated, and an inversely proportional dependence was revealed. The maximum degree of inhibition of free radicals was observed in 96.4% of the ethanol extract – $90.2\% \pm 0.9\%$, the minimum – in the water extract and amounted to $80.0\% \pm 1.6\%$.

Conclusion. The results obtained show the possibility of using the *Melittis melissophyllum* L. herb as a source of antioxidants, as well as the prospects for the development of drugs based on it.

РОЛЬ N-ПАЛЬМИТОИЛЭТАНОЛАМИНА В НОЦИЦЕПТИВНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЛОКАДЕ GPR18 ИЛИ PPAR α РЕЦЕПТОРОВ У КРЫС С ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИЕЙ

Доронькина А.С.¹, Жаворонок И.П.¹, Михальчук А.Л.², Богдан В.Г.³

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь, г. Минск, 220072, ул. Академическая, 28, biblio@fizio.bas-net.by

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2

³Отделение медицинских наук НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220072, г. Минск, пр-т Независимости, 66

Введение. N-ациламида участвуют в модуляции высвобождения нейротрансмиттеров, функционировании клеточных энергетических систем, и оказывают мембранопротекторные, антиоксидантные, кардиопротекторные, иммуномодулирующие, противовоспалительные эффекты при патологических процессах и состояниях, включая боль и воспаление. Они способны взаимодействовать с мембранными сопряженными с G-белком орфанными рецепторами, каннабиноидными рецепторами CBR1 и CBR2, а также ядерными PPARs рецепторами и TRPV1-рецепторами. Представленное исследование направлено на выявление вклада орфанных мембранных рецепторов GPR18 и ядерных PPAR α рецепторов в реализацию антиноцицептивных эффектов N-пальмитойлэтанолamina при экспериментальной нейропатии.

Цель работы – изучить влияние однократного введения N-пальмитойлэтанолamina на ноцицептивную чувствительность у крыс с экспериментальной периферической мононейропатией после фармакологической блокады GPR18 или PPAR α рецепторов.

Методы. Исследования выполнены на белых крысах-самцах стока Wistar (n = 21) с массой тела 200-220 г. Все животные находились в контролируемых условиях окружающей среды на одинаковом (стандартном) рационе, имели свободный доступ к воде и пище. Эксперименты проводили с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на лабораторных животных [1].

Исследуемые вещества. N-пальмитойлэтанолamin (PEA) (синтезирован в лаборатории химии липидов ИБОХ НАН Беларуси), а также PSB-CB5 и GW6471 (производства Tocris, Великобритания), растворяли в смеси, состоящей из этанола, Твина 80 и апиогенного физиологического раствора в соотношении 1:1:8. Введение одного из антагонистов соответствующих рецепторов осуществляли внутрибрюшинно на 7-е сутки в дозе 1 мг/кг, а через 10 минут вводили PEA, в дозе 1,5 мг/кг.

Животные были разделены на следующие группы: лигирование (n=10), лигирование + PSB-CB5 + PEA (n = 7), лигирование + GW6471+PEA (n = 7).

Моделирование травмы седалищного нерва осуществляли путем его тройного лигирования на уровне верхней трети бедра до трифуркации [2]. Измеряли порог (ПНР) [5] и латентный период ноцицептивных реакций (ЛПНР) [3], определяемые в тестах «Рандалла–Селитто» и «Горячая пластина» на 1, 7 и 14-е сутки.



Результаты и обсуждение. На 7-е сутки после операции отмечали статистически значимое снижение показателей ПНР на 29,3% ($p < 0,0002$) в ипсилатеральной конечности и ЛПНР на 34,5% ($p < 0,005$), что свидетельствует о развитии механической и термической гипералгезии. Повышенная чувствительность к указанным стимулам в контрольной группе сохранялась на протяжении всего послеоперационного периода наблюдения. После введения РЕА крысам с периферической нейропатией при предварительной фармакологической блокаде мембранных рецепторов GPR18, связанных с G-белком, отмечено повышение показателей ПНР ипсилатеральной конечности на 14,3%, однако достоверных различий со значениями на 7-е сутки до введения исследуемых веществ получено не было. Тем не менее, были зарегистрированы статистически значимые изменения ЛПНР. Анальгезирующая активность исследуемого вещества на фоне блокады GPR18 в этом тесте составила 20,9% ($p < 0,02$). Заблаговременная инъекция GW6471 антагониста PPAR α рецепторов с последующим введением РЕА приводила к статистически значимому увеличению значений ПНР на 21,6% ($p < 0,03$) и ЛПНР на 25,3% ($p < 0,02$).

Заключение. У крыс после лигирования седалищного нерва на фоне блокады PPAR α рецепторов, РЕА оказывал антиноцицептивное действие, о чем свидетельствуют достоверные изменения значений порога и латентного периода ноцицептивных реакций.

В свою очередь после введения антагониста GPR18 рецепторов анальгетическое действие РЕА было менее выражено, статистически значимые данные получены только при регистрации ЛПНР.

Полученные результаты можно объяснить тем, что при блокаде PPAR α ядерных рецепторов антиноцицептивное действие потенциально происходит благодаря взаимодействию РЕА с PPAR γ , а также возможно вовлечение других рецепторных систем, отличных от PPARs, орфанных (GPR18, GPR55), каннабиноидных CBR1 и CBR2, а также TRPV1-рецепторов [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Об утверждении ветеринарно-санитарных правил по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках [Электронный ресурс]: постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Респ. Беларусь, 21 мая 2010 г., № 36. – Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь. – Режим доступа: <https://pravo.by/document/?guid=3961&p0=W210p0118>. – Дата доступа: 22.09.2022.
2. The influence of rat strain of the development of neuropathic pain and comorbid anxio-depressive behavior after nerve injury / S. Hestehave, G. Munro // Scientific reports. – 2020. – Vol. 10(1). – P.218-225.
3. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice / L. Menendez [et al.] // J. Neurosci. Meth. – 2002. – Vol. 113(1). – P. 91-97.
4. PPARs and pain / B.N. Okine, J.C. Gaspar, D. P. Fin // Journal of Pharmacology. – 2019. – Vol. 176. – P. 1421-1442.
5. Randall-Selitto Test: a New Approach for the Detection of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury / E. Santos- Nogueira [et al.] // J. Neurotrauma. – 2012. – Vol. 29(5). – P. 898-904.



THE ROLE OF N-PALMITOYLETHANOLANINE IN NOCICEPTIVE SENSITIVITY DURING PHARMACOLOGICAL BLOCADE OF GPR18 OR PPAR α RECEPTORS IN RATS WITH PERIPHERAL NEUROPATHY

Doronkina A.S.¹, A.L. Zhavoronok I.P.¹, Mikhalechuk A.L.², Bogdan V.G.³

¹*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus, 220072 Minsk, st. Akademicheskaya, 28, biblio@fizio.bas-net.by*

²*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus, 220084, Minsk, st. Academic Kuprevich, 5/2*

³*Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus, 220072, Minsk, Nezavisimosti Ave., 66*

The effect of palmitoylethanolamide in the pharmacological blockade of membrane GPR18 and nuclear PPAR α receptors on nociceptive responses in normal rats and in rats with experimental peripheral neuropathy has been studied. PEA injection against the background of blockade of PPAR receptors resulted in a pronounced analgesic effect. The analgesic effect of PEA was less intense after the injection of the GPR18 receptor antagonist, statistically significant data were obtained only when LPNR was registered.

СИНТЕЗ ТРИКАРБОЦИАНИНОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО МЕЗО-ПОЛОЖЕНИЮ АМБИДЕНТНЫМИ НУКЛЕОФИЛАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ АМИНОГРУППУ, ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬДЕГИДОВ

Дорошенко И.А., Говтвань А.О., Беклемишев М.К., Подругина Т.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, Ленинские горы д.1, с.3, 119991, doroshenkoiran@gmail.com

На современном этапе научно-технического развития определяющую роль играет практическое использование сложных молекулярных и супрамолекулярных систем. Так, в частности, цианины, поглощающие в ближней ИК-области, широко используются для мониторинга некоторых биологических функций в живых системах, что связано с их абсорбцией многими биологическими молекулами, а также в качестве флуоресцентных зондов как инструментов визуализации процессов, происходящих в реальном времени, за счет изменения одного из ключевых параметров флуоресценции в процессе связывания с мишенями (аналитами) [1,2].

Для определения альдегидов при помощи трикарбоцианинов предполагается использование прямого флуориметрического определения. Краситель, модифицированный по мезо-положению, должен содержать свободную аминогруппу в структурном фрагменте, связанным с сопряженной системой флуорофора. Таким образом, в результате связывания аминогруппы с карбонильной группой обеспечивается разгорание флуоресценции, являющееся аналитическим сигналом.

В данной работе предложен подход к синтезу конформационно закрепленных трикарбоцианиновых красителей, модифицированных по мезо положению как свободной аминогруппой, так и включенной в ароматическую систему (*пара*- и *мета*-аминофенолы). Анализ их физико-химических свойств показал, что новые, неописанные ранее флуорофоры, имеющие свободную аминогруппу в прямом сопряжении с полиметиновой системой трикарбоцианина, являются перспективными аналитами для определения альдегидов за счет эффективного связывания с карбонильной группой, сопровождающегося разгоранием флуоресценции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проект № 20-03-00334.



ЛИТЕРАТУРА

1. Heptamethine Cyanine-Based Application for Cancer Theranostics / Zhang L. [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Vol. 12. – Art. 764654.
2. Проскурнина М.В. [и др.]. Флуорофоры с индолениновым скаффолдом и их применение в биомедицинских целях. – Уфа: Гилем, 2016. – 125 с.

SYNTHESIS OF TRICARBOCYANINES WITH MODIFIED *MESO*-POSITION BY AMBIDENT NUCLEOPHILES WITH AN AMINO GROUP FOR SELECTIVE DETERMINATION OF ALDEHYDES

Doroshenko I.A., Govtvan A.O., Beklemishev M.K. and Podrugina T.A.

Lomonosov Moscow State University, Russian Federation, Moscow, Leninskie Gory 1/3, 119991, doroshenkoiran@gmail.com

At the present stage of scientific and technological development, the application of complex molecular and supramolecular systems plays a decisive role. Tricarbocyanines are supposed to be used for the detection of aldehydes by the mean of fluorimetric determination. The *meso*-modified dye must contain a free amino group in the structural fragment associated with the conjugated fluorophore system. Thus, the fluorescence build-up is provided as a result of the binding of the amino group to the carbonyl group.

In this work, we propose an approach to the synthesis of conformationally fixed tricarbocyanine dyes modified at the *meso*-position both with a free amino group and included in the aromatic system (para- and meta-aminophenols). An analysis of their physicochemical properties showed that new fluorophores having a free amino group in direct conjugation with the polymethine system are promising analytes for the determination of aldehydes due to efficient binding to the carbonyl group, accompanied by fluorescence enhancement.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИНЕРАЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Дребенкова И.В., Зайцев В.А.

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Республика Беларусь, г. Минск, 220012, ул. Академическая, д. 8, spectrometric@rspch.by

В настоящее время для оптимизации пищевого рациона различных групп населения широкое применение находят биологически активные добавки (далее – БАД), в частности, как дополнительный источник эссенциальных макро- и микроэлементов. Важнейшая задача гигиены питания – контроль БАД по показателям безопасности (содержание токсичных элементов) и качества (содержание эссенциальных элементов). Для получения достоверных результатов лабораторных испытаний БАД по показателям качества и безопасности необходимо наличие эффективных и точных методик определения химических элементов в данных матрицах.

Первым этапом элементного анализа БАД является пробоподготовка, основными задачами которой являются количественный перевод определяемых элементов в раствор (минерализация), исключение потерь легколетучих компонентов, отсутствие случайных загрязнений, минимальное значение фона, устранение контакта химиков-аналитиков с агрессивными веществами. Стадия деструкции пробы – самая длительная и трудоемкая, но в метрологическом плане определяющая.

Большинство методов минерализации проб основано на окислении органического вещества тем или иным способом. Основные варианты способов минерализации образцов – сухое и мокрое озоление.



Сухое озоление (сухая минерализация) представляет собой нагревание пробы при температуре 400-500°C в муфельной печи в тигле до полного окисления углеродсодержащего материала до углекислого газа [1]. Преимущества этого метода – удобство, простота, доступность, отсутствие реактивов, вносящих загрязнение. Недостатки сухого озоления – длительная продолжительность процесса, отсутствие возможности применения для определения летучих компонентов, таких как ртуть, сурьма, мышьяк, висмут, селен, кадмий и свинец [2].

Мокрое озоление (мокрая минерализация) заключается в нагревании пробы с жидкими окислителями, в качестве которых используют серную, азотную и хлорную кислоты. В аналитической практике используют автоклавную и микроволновую минерализацию проб.

Преимущества автоклавной минерализации – снижение потерь определяемых элементов и количества используемых реагентов, повышение эффективности деструкции исследуемых проб, повышение скорости минерализации. Недостатки автоклавного разложения – высокое давление за счет выделения больших объемов CO_2 и NO_2 вследствие разрушения органической матрицы, а также ограничения разложения образцов с большим содержанием жиров и масел из-за опасности взрыва. Несмотря на это, эффективное и безопасное использование автоклавов с традиционными источниками нагрева гарантировано при подобранных условиях минерализации, которые зависят от температуры, соотношения масс анализируемого образца и окисляющих агентов, давления в реакционной емкости аналитического автоклава.

Наиболее эффективным способом разложения проб является использование микроволновых полей, осуществляемым в микроволновых печах, основным рабочим элементом которых служит магнетрон. В случае микроволновой пробоподготовки в автоклаве образец растворяется за счет трех факторов: температуры, давления и микроволнового облучения. Энергия микроволнового излучения передается непосредственно образцу. Последний фактор позволяет значительно повысить эффективность пробоподготовки.

Цель данной работы – обосновать выбор оптимального(ых) способа(ов) минерализации БАД для проведения элементного анализа спектрометрическим методом.

Объекты исследований – модельные пробы 3 групп БАД (на основе чистых субстанций, на основе растительных и животных жиров, на основе растительного сырья) с добавкой государственных стандартных образцов (далее – ГСО) токсичных (мышьяк (As), свинец (Pb), кадмий (Cd)) и эссенциальных (кальций (Ca), магний (Mg), калий (K), натрий (Na), фосфор (P), железо (Fe), цинк (Zn), селен (Se), медь (Cu), марганец (Mn)) элементов в различных концентрациях.

Сухая минерализация образцов БАД была реализована их озолением в электропечи сопротивления СНОЛ-7,2/1100 (Литва).

Мокрая минерализация исследуемых объектов была выполнена 2 способами – микроволновым и автоклавным разложением. Автоклавное разложение проводили в многооперационном автоклавном комплексе пробоподготовки МКП-04 (Россия), микроволновое – в микроволновой системе разложения проб Торех+ (PreeKem, Китай).

Для элементного анализа модельных проб БАД, минерализованных различными методами, использовали атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой iCAP 7200 Radial «Thermo Fisher Scientific» (США), оснащенный пневматическим и ультразвуковым распылителями.

Для обоснования выбора оптимальных способов минерализации для модельных проб БАД с добавкой ГСО токсичных и эссенциальных элементов и минерализованных вышеперечисленными способами, был рассчитан метрологический показатель «правильность».

Критерии оценки метрологического показателя «правильность» были следующими: 50% – удовлетворительный; более 50% – приемлемый; менее 50% и более 130% – неприемлемый.



В результате проведенных исследований установлено, что при автоклавном разложении показатель правильности для БАД на основе чистых субстанций был неприемлемым для Pb и приемлемым для всех остальных исследуемых элементов (Cd, Se, As, K, Cu, Fe, P, Na, Zn, Ca, Mg и Mn), для БАД на основе растительных и животных жиров был неприемлемым для Se и Pb, удовлетворительным для As, приемлемым для Fe, Zn, Cd, Cu и Mg, для БАД на основе растительного сырья был приемлемым для As, Pb, Cd, Se, Cu, Fe, Zn, Mn, Ca и Mg.

Показано, что при микроволновом разложении показатель правильности для БАД на основе чистых субстанций был неприемлемым для Pb и приемлемым для всех других исследуемых элементов (Cd, Se, As, K, Cu, Fe, P, Na, Zn, Ca, Mg и Mn), для БАД на основе растительных и животных жиров был удовлетворительным для As и приемлемым для всех других исследуемых элементов (Se, Cd, Zn, Mg, Cu, Fe, Pb), для БАД на основе растительного сырья был приемлемым для As, Cd, Pb, Se, Zn, Fe, Mn, Cu, Mg и Ca.

Установлено, что при сухой минерализации показатель правильности для БАД на основе чистых субстанций был неприемлемым для Se и P, приемлемым для Mn, Pb, Fe, As, Cd, K, Na, Zn, Cu, Mg, Ca, для БАД на основе растительных и животных жиров был неприемлемым для As и Se и приемлемым для Cd, Cu, Zn, Mg, Fe, Pb, для БАД на основе растительного сырья был неприемлемым для Se, Cd, Pb, As, Cu, Fe, Zn и приемлемым для Mn, Mg, Ca.

Таким образом, оба способа мокрой минерализации БАД являются предпочтительными по сравнению с сухой. При этом микроволновое разложение по сравнению с автоклавным позволяет существенно (в 3,5 раза) сократить время, необходимое для перевода образцов в минерализат, поэтому данный способ предпочтителен.

По результатам выполненного исследования обоснован выбор оптимального способа минерализации 3 групп БАД для проведения элементного анализа методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой, которым является микроволновое разложение.

Работа выполнена в рамках задания 02.12 «Разработать и внедрить методику одномоментного измерения массовых концентраций токсичных и эссенциальных элементов в биологически активных добавках к пище и специализированной пищевой продукции методом атомной спектроскопии» подпрограммы «Безопасность среды обитания человека» ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг» (2021-2025 годы).

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы разложения в аналитической химии / Р. Бок. – М.: Химия, 1984. – 432 с.
2. Сравнительная оценка способов пробоподготовки пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья при их сертификации и токсикологическом анализе / З.А. Темердашев [и др.] // Изв. вузов. Пищевая технология. – 2000. – № 2–3. – С. 69-73.

MODERN METHODS OF THE MINERALIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUPPLEMENTS FOR SPECTROMETRY ELEMENTAL ANALYSIS

Drebenkova I.V., Zaitsev V.A.

*Republican unitary enterprise «Scientific practical centre of hygiene», Minsk, Belarus,
spectrometric@rspch.by*

The choice of optimal method of mineralization of 3 groups biologically active additives for elemental analysis by atomic emission spectrometry has been substantiated. Microwave decomposition is preferable.



КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКА КОЛИСТИНА В ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Дубовская Л.В., Широчина И.В., Горбачева И.В., Свиридов О.В.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, Dubovskaya@iboch.by

Введение. Доктрина национальной продовольственной безопасности предполагает полную доступность здоровой и питательной пищи для населения нашей страны. Безопасность продовольствия означает, в частности, отсутствие токсичных соединений, приводящих к недопустимому риску вредного воздействия на здоровье человека и его будущие поколения [1]. Антибиотики относятся к такому роду токсикантов, присутствие которых в концентрациях выше предельно допустимых значений в продуктах питания и продовольственном сырье приводит к развитию дисбактериозов, аллергических заболеваний, снижению иммунитета и другим серьезным расстройствам. Поэтому необходимо осуществлять контроль содержания остаточных количеств антибиотиков в продуктах питания. Для этой цели применяют инструментальные физико-химические и иммунные методы анализа. Однако, проведение, например, высокоэффективной жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией требует использования дорогостоящего оборудования, работы высококвалифицированного персонала и выполнения трудоемкой пробоподготовки. Метод иммуноферментного анализа (ИФА) пригоден для проведения скрининговых исследований, так как позволяет одновременно тестировать большое количество проб, и при этом не требуется дорогостоящее оборудование. Колистин (Кл) открыт в 1949 году, по химической структуре относится к циклическим полипептидным антибиотикам ряда полимиксинов и вырабатывается *Bacillus polymixa* [2]. Являясь высоко катионизированным соединением, Кл взаимодействует с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточной оболочки грамотрицательных бактерий, что приводит к нарушению проницаемости и гибели микроорганизмов. По решению ВОЗ Кл отнесен к антибиотикам резерва и в медицине используется для лечения заболеваний, вызванных мультирезистентными бактериями. Поэтому его применение в сельском хозяйстве, распространение в окружающей среде и попадание в организм человека с продуктами питания животного происхождения связано с опасностью появления штаммов, нечувствительных к этому резервному антибиотику. В странах таможенного союза, в том числе и в Беларуси, максимально допустимый уровень Кл в мясе, жире (все виды продуктивных животных) и рыбе – 0,15 мг/кг, в молоке – 0,05 мг/кг, в яйце и жидких яичных продуктах – 0,3 мг/кг, в почках – 0,2 мг/кг и печени – 0,15 мг/кг [3]. В странах Евросоюза приняты такие же нормы.

Цель нашего исследования – разработка экологически безопасного, надежного в анализе и удобного в эксплуатации импортозамещающего набора реагентов современного технического уровня для количественного определения Кл в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения.

Материалы и методы. Состав набора и пробоподготовка. Иммуносорбент – полистирольный микропланшет со специфически иммобилизованными кроличьими поликлональными антителами к Кл на пассивно адсорбированных антивидовых антителах барана. Градуировочные пробы, пероксидазный конъюгат Кл, растворы для экстракции Кл и для разведения экстрактов – жидкие препараты, готовые к употреблению. Экстракцию Кл из измельченных образцов мяса, птицы, рыбы, субпродуктов и аквакультур животного происхождения проводят следующим образом. К 1 г измельченного образца добавляют 4 мл раствора А для экстракции и 1 мл гексана, смесь перемешивают в течение 10 мин на вортексе или вручную, добиваясь гомогенности, центрифугируют 10 мин при 4000g. Из молока и других жидких молочных и кисломолочных продуктов Кл экстрагируют, добавляя к 4 г образца 0,25 мл экстрагирующего раствора Б и далее обрабатывают как в предыдущем



примере. Далее 0,025 мл водного супернатанта разводят в 20 раз, добавляя 0,475 мл раствора В.

Схема проведения анализа. В лунки планшета вносят по 0,05 мл градуировочных проб или разведенных экстрактов исследуемых проб и по 0,05 мл конъюгата, инкубируют 50 мин при температуре (20-25)°С без встряхивания. Растворы аспирируют, лунки промывают три раза по 0,2 мл. Затем вносят по 0,1 мл хромоген-субстратной смеси, инкубируют в течение 15 мин при температуре (20-25)°С и останавливают реакцию внесением 0,1 мл стоп-реагента. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на многоканальном планшетном фотометре при длине волны 450 нм.

Полноту экстракции Кл из различных матриц определяют методом добавок. Требуемое количество Кл вносят в пробирку с 1 г измельченного образца, перемешивают на вортексе в течение 10 мин при температуре (20-25)°С. Далее проводят экстракцию и иммуноанализ. Измеряли концентрацию Кл в образце и соотносили количества экспериментально определенного и внесенного антибиотика.

Тест на воспроизводимость результатов по 10 независимым измерениям проводили в рамках одного анализа следующим образом. К 45 мл жидкого молочного продукта добавляли Кл до конечной концентрации 25 мкг/кг, в 10 пробирок вносили по 1 г измельченных образцов мышечной ткани и Кл из расчета 100 мкг/кг для курицы и 400 мкг/кг для свинины. Экстракцию и анализ проводили по описанной выше схеме. Воспроизводимость определяли как коэффициент вариации полученных результатов, рассчитанный по формуле $S/X_{\text{ср}} \cdot 100\%$, где $X_{\text{ср}}$ – среднее арифметическое значение для полученных результатов, а S – среднее стандартное отклонение.

Результаты. В наборе ИФА-Колистин использован метод твердофазного прямого конкурентного ИФА. Кл экстрагируют из измельченных образцов продуктов питания или продовольственного сырья животного происхождения одним из представленных в наборе растворов. В лунки планшета вносят раствор конъюгата колестины с пероксидазой из корней хрена (Кл-ПХ) и добавляют градуировочные растворы с известной концентрацией Кл и подготовленные к анализу растворы проб. Во время инкубации конъюгат и свободный колестин в составе градуировочной или исследуемой пробы конкурируют за сайты связывания на иммобилизованных в лунках иммуносорбента антителах. После промывания, в ходе которого из лунок удаляют не прореагировавшие с антителами компоненты, добавляют хромоген-субстратный раствор, позволяющий визуализировать результат конкурентных взаимодействий. Внесение стоп-реагента останавливает ферментативную реакцию, одновременно изменяя окраску раствора с голубого цвета на желтый. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации Кл в пробе, т.е. чем выше концентрация Кл, тем ниже биоспецифическая адсорбция Кл-ПХ на функционализированной твердой фазе. Используя результаты измерений оптической плотности, полученные для градуировочных проб, строят градуировочный график, с помощью которого определяют содержание Кл в исследуемых пробах. Набор комплектуется программой, совместимой с Microsoft Excel, в которой в автоматическом режиме производится математическая обработка полученных данных. Выполняется расчет концентрации Кл в исследуемом продукте с учетом степени разведения образца при пробоподготовке, конечный результат рассчитывается как среднее арифметическое двух значений концентрации Кл в исследуемом продукте в мкг/кг. Поскольку Кл несет высокий положительный заряд, то в пищевом матриксе этот антибиотик находится в связанном с другими компонентами состоянии. Поэтому для получения максимальной полноты извлечения важно правильно подобрать составы экстрагирующих растворов. Анализ данных, представленных в таблице 1, подтверждает, что степень извлечения антибиотика из ряда матриц близка к 100% при различных концентрациях Кл.

Для более точного определения концентрации в ИФА необходима высокая воспроизводимость получаемых результатов, которую определяли в рамках одного эксперимента отдельно для каждого продукта, используя в качестве матриц кефир,



курятину и свинину с нагрузками Кл соответственно 25,0; 100,0 и 400,0 мкг/кг ($n=10$). Коэффициент вариации составил 12,9% для кефира, 8,5% – для курятины и 9,1% для свинины, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к иммуноферментному анализу [4]. Правильность измерений можно оценить по открытию точных добавок Кл в исследуемые образцы (таблица).

Таблица. Полнота экстракции Кл из продуктов питания животного происхождения

п/п	Матрикс	Нагрузка Кл, мкг/кг	Концентрация Кл, определенная в анализе, мкг/кг	Открытие внесенного Кл, %
1	Кефир, 2,5 %	25	24,3±0,85	97,2±3,4
2	Свинина	20	19,2±1,1	96,0±5,5
3	Курятина	100	97,6±5,4	97,6±5,4
4	Свинина	400	402,0±17,5	100,5±4,4
5	Говядина	900	850±32,7	94,5±3,7
6	Рыба (зубатка)	100	98,6±2,1	98,6±2,1
7	Рыба (форель)	100	104,2±3,9	104,2±3,9
8	Молоко стерилизованное, 3,2 %	50	48,7±1,2	97,4±2,4
9	Молоко стерилизованное, 3,2 %	10	8,4±1,1	84,0±10,1
10	Ряженка, 3,4 %	3,0	3,2±0,2	106,7±6,8
11	Почки	300	317±5,2	105,7±1,8
12	Печень	200	204,5±4,1	102,3±2,1

На территории стран таможенного союза используются в основном два иммуноферментных набора ELISA-Colistin для определения остаточных количеств Кл в продовольственном сырье и продуктах питания животного происхождения: от фирм PerkinElmer (США) и EuroProxima (Нидерланды). В обоих наборах применяются токсичные органические растворители метанол или ацетонитрил, конъюгат поставляется в виде концентрата, который необходимо перед анализом разводить, для экстрагирующих растворов и растворов для разведения экстрактов также требуется разбавление перед анализом. В процессе эксплуатации обоих типов наборов требуется проведение этапа нейтрализации кислого экстракта внесением 1 М раствора едкого натра для каждой пробы отдельно. В наборе EuroProxima градуировочные пробы поставляются в виде лиофилизованной градуировочной пробы с максимальной концентрацией Кл, из которой последовательным разведением необходимо приготовить остальные градуировочные растворы.

Закключение. Разработан набор реагентов ИФА-Колистин, в котором все компоненты набора, за исключением концентрированного моющего буфера, поставляются в готовом для работы виде и отсутствуют токсичные органические растворители. Данный набор имеет высокие аналитические параметры (К.В.<15%, извлечение Кл 100±15%) определения остаточных количеств Кл в продуктах питания и продовольственном сырье животного происхождения. Время проведения анализа, включая пробоподготовку, не превышает 130 мин. Минимальная достоверно определяемая концентрация Кл в жидких молочных продуктах равна 3,0 мкг/кг, для свинины, говядины, птицы, рыбы, субпродуктов, и меда эта величина составляет 10,0 мкг/кг. Таким образом, набор ИФА-Колистин имеет те же технико-аналитические характеристики, что и лучшие зарубежные аналоги, а по своим эксплуатационным качествам и потребительским свойствам превосходит импортные образцы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Постановление Совета министров Республики Беларусь № 962 от 15 декабря 2017 г. «Доктрина национальной продовольственной безопасности Республики Беларусь до 2030 года».



2. A new antibiotic 'colistin' produced by spore-forming soil bacteria / Koyama Y. [et al.] // J. Antibiot (Tokyo). – 1950. – Vol. 3. – P. 457-458.
3. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 г. №28 «О максимально допустимых уровнях остатков ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сырье, и методиках их определения».
4. Vashist S.K., Luong J.H.T. Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays / Handbook of immunoassay technologies / Eds. S.K. Vashist, J.H.T. Luong. – Academic Press, Elsevier, 2018. – P. 81-95.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIBIOTIC COLISTIN IN PRODUCTS OF ANIMAL ORIGIN BY ENZYME IMMUNOASSAY

Dubovskaya L.V., Shyrochyna I.V., Harbachova I.V., Sviridov O.V.

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,

Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, Dubovskaya@iboch.by

A new domestic kit has been developed for the quantitative determination of the residual content of colistin in food and food raw materials of animal origin by direct competitive enzyme immunoassay (ELISA-Colistin). The kit is characterized by high technical and analytical parameters (C.V.<15%, colistin extraction 100±15%) and consumer characteristics. It is environmentally friendly, since its applying does not require the use of toxic organic solvents (methanol or acetonitrile), generally used in imported commercial kits for the determination of colistin.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПАРАЦЕТАМОЛА И 4-КАПРИЛАМИДОФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА НОЦИЦЕПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АРТРИТОМ

Жаворонок И.П.¹, Антипова О.А.¹, Михальчук А.Л.², Лисовская М.В.²

¹*Институт физиологии НАН Беларуси, Республика Беларусь, 220072 г. Минск, ул. Академическая, д. 28, biblio@fizio.bas-net.by*

²*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, lipmal@iboch.by*

Введение. Производное пара-аминофенола – парацетамол (лат. Paracetamol) или ацетаминофен – лекарственное средство, оказывающее жаропонижающее (антипиретическое) и болеутоляющее действие за счет ингибирования активности фермента циклооксигеназы (ЦОГ1 и ЦОГ2), ответственной за синтез противовоспалительных медиаторов простагландинов [1]. Однако, не смотря на широкое применение этого ЛС, известно, что оно способно оказывать гепато- и нефротоксическое действие вследствие образования токсичного метаболита N-ацетил-пара-бензохинонимина. Во избежание последнего структуру парацетамола или его химических предшественников пытаются модифицировать путем введения остатков жирных кислот и аминокислот [1]. Предполагается, что такая модификация структуры может усилить не только антипиретические и анальгетические свойства полученных соединений, но и повысить их противовоспалительный потенциал [1]. Поэтому получение новых производных ПАБК как по аминной, так и карбоксильной группам с введением в структуру фрагментов различных фармакофорных группировок является актуальным и может привести к получению соединений с более высокой противовоспалительной активностью.

Целью работы явилось изучение проекторных свойств и побочных эффектов нового производного парацетамола – 4-каприламидофеноксиуксусной кислоты.



Методы. Исследование проводили на крысах-самцах Wistar, одного возраста и массой 200-250 г. Все работы с экспериментальными животными выполнены с соблюдением законодательства, принципов биоэтики и в соответствии с международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных. Количество и численный состав групп являются адекватными и соответствуют государственным и международным стандартам качества планирования и проведения исследований на животных [2].

Исследуемые вещества: синтез и характеристика с использованием физико-химических методов (спектроскопия ядерного магнитного резонанса, инфракрасная спектроскопия, масс-спектрометрия) N-(4-гидроксифенил)-ацетамида (парацетамола) и 4-каприламидофеноксисукусной кислоты (4-КАФУК) осуществляли сотрудники ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Экспериментальный артрит моделировали путем введения в полость голенопредплюсневой сустава зимозана из *Saccharomyces cerevisiae* (Зимозан, Z4250, Sigma-Aldrich, Switzerland) в дозе 4 мг/животное, растворенного в 50 мкл апиогенного физиологического раствора [3].

Оценку порога ноцицептивной реакции (ПНР) у экспериментальных животных проводили с использованием теста «Рандалла-Селитто» («Давление на лапу») – измерение силы надавливания (в граммах) пластикового остроконечного конуса на стопу экспериментального животного, в результате чего отмечали специфическую болевую реакцию (отдергивание лапы животным либо вокализацию) [4]. Тест проводили поочередно на обеих задних лапах для каждого животного с использованием аппарата для измерения силы надавливания на лапу фирмы PanLab (Испания). Измерение для каждой задней конечности проводили трехкратно с интервалом 5-7 мин.

Оценку латентного периода ноцицептивной реакции (ЛПНР) у крыс проводили с использованием теста «Hot plate» («Горячая пластина»), который служит для оценки болевого рефлекса при контакте подушечек лап крысы с горячей поверхностью, основанный на измерении времени от момента помещения животного на горячую пластинку (50°C) до момента ноцицептивной реакции (облизывание задней лапы, вокализация, выпрыгивание из камеры) [5]. Измерение проводили трехкратно с интервалом 15-20 мин.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программных пакетов STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США) и Microsoft Excel (Microsoft Corp., США).

Результаты и обсуждение. Мониторинг состояния животных с экспериментальным артритом проводили ежедневно, при этом оценивали величину отека, активность и подвижность животных, массу тела и болевую чувствительность. В течение всего периода наблюдений после инъекции зимозана отмечали увеличение размеров сустава из-за отека в среднем на 35-50% как по сравнению с начальными значениями, так и по сравнению со здоровой лапой ($p < 0,001$). Отмечали развитие механической и термической гипералгезии (снижение значений ПНР и ЛПНР в среднем на 35-39%). Острая фаза продолжалась в течение первых пяти суток после инъекции и характеризовалась сильным отеком и гиперемией, как голеностопного сустава, так и стопы в целом, а также наиболее низкими значениями ПНР и ЛПНР. Наличие артрита в указанном суставе также было охарактеризовано гистологически.

Применение парацетамола интрагастрально на 7-е сутки у крыс с зимзан-индуцированным артритом в дозе 80 мг/кг оказывало анальгезирующее действие, которое выражалось в достоверном увеличении средних значений ПНР на ипсилатеральной конечности с $80,9 \pm 2,1$ г до $104,0 \pm 1,3$ г, что на 28,6% выше соответствующих значений до введения исследуемого вещества. Значения ПНР на контрлатеральной конечности увеличились на 8,6 % (с $117,7 \pm 1,3$ г до $127,8 \pm 1,4$ г).

Интрагастральное введение 4-каприламидофеноксисукусной кислоты (4-КАФУК) в дозе 150 мг/кг крысам с зимзан-индуцированным артритом в аналогичный временной период, также оказывало схожее с парацетамолом обезболивающее действие, которое определяли по статистически значимому увеличению средних значений ПНР на ипсилатеральной лапе на



21,3 % по сравнению со значениями до введения (с $85,9 \pm 2,8$ г до $104,2 \pm 1,3$ г). Значения ПНР на здоровой лапе увеличились на 3,8% (с $130,7 \pm 1,5$ г до $135,6 \pm 1,7$ г).

Однократное интрагастральное введение парацетамола в соответствующей дозе эффективно подавляло развитие термической гипералгезии у крыс с зимзан-индуцированным артритом, отмечали увеличение ЛПНР с исходных значений $14,8 \pm 0,5$ с до $22,7 \pm 1,0$ с через 1 час после введения препарата (увеличение на 53,4%).

Применение 4-КАФУК в эквимольной дозе у крыс с зимзан-индуцированным артритом оказывала слабовыраженное анальгезирующее действие в ответ на термический стимул, зафиксировали увеличение значений ЛПНР на 8,4% по сравнению со значениями до введения (с $13,1 \pm 0,7$ с до $14,2 \pm 0,6$ с).

Заключение. Таким образом, установлено, что у экспериментальных животных с зимзан-индуцированным артритом, применение как парацетамола, так и 4-каприламидофеноксисукусной кислоты, оказывали схожее по выраженности антиноцицептивное действие, о чем свидетельствуют достоверные изменения значений порога и латентного периода ноцицептивных реакций. При этом, применение парацетамола оказалось более эффективным по сравнению с 4-КАФУК в отношении купирования гипералгезической реакции на термический стимул.

Результаты экспериментального исследования получены при работе в рамках проекта БРФФИ М22-039 от 04.05.2022 «Сравнительная оценка влияния новых модификаций химической структуры производных пара-аминофенола и пара-аминобензойной кислоты на воспалительный процесс».

ЛИТЕРАТУРА

1. Paracetamol analogues conjugated by FAAN induce TRPV1-mediated antinociception without causing acute liver toxicity / J.L. Å.Nilsson [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry – 2021. – Vol. 213. – P. 113042-113054.
2. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов [и др.] // М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с.
4. Randall-Selitto Test: a New Approach for the Detection of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury / E. Santos- Nogueira [et al.] // J. Neurotrauma. – 2012. – Vol. 29, N 5. – P. 898-904.
5. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice / L. Menendez [et al.] // J. Neurosci. Meth. – 2002. – Vol. 113(1). – P. 91-97.

ВЛИЯНИЕ ГЕЛЕВОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ЭКСТРАКТОВ БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО (*HELICHRYSUM ARENARIUM* L.) И ВОРОБЕЙНИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*LITHOSPERMUM OFFICINALE* L.) НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАН КОЖИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Жаворонок И.П.¹, Феськова Е.В.², Адамцевич Н.Ю.², Маньковская С.В.¹

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220072,
ул. Академическая, 28, biblio@fizio.bas-net.by

²Белорусский государственный технологический университет, Республика Беларусь,
г. Минск, 220006, ул. Свердлова, 13а

Введение. Репаративные процессы представляют собой сложные последовательные комплексы реакций, развивающиеся в организме в ответ на повреждение тканей и направленные на их восстановление [1]. В настоящее время широко изучаются вопросы применения новых эффективных и безопасных лекарственных средств в лечении ран различного генеза [1,2]. К веществам, применение которых способствует эффективной репарации ран кожи, в настоящее время относят биофлавоноиды – биологически активные



вещества растительного происхождения, которые обладают широким спектром положительных терапевтических свойств, в том числе капилляропротекторными, антиоксидантными, болеутоляющими, репаративными и др. Именно с антиоксидантной активностью данных веществ исследователи связывают способность биофлавоноидов ускорять заживление ран, посредством удаления свободных радикалов кислорода и увеличения синтеза коллоидов в местах повреждения [3].

Целью работы явилось изучение влияния гелевых субстанций, включающих в свой состав экстракты цветков бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного, содержащих комплекс флавоноидов, на процесс заживления кожных ран в эксперименте.

Методы. В ходе экспериментов ранозаживляющее действие оценивали после ежедневных аппликаций на кожные раны гелевых субстанций, содержащих в качестве действующих веществ комплекс флавоноидов из экстрактов цветков бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного в соотношении 1:1 в количестве 2% и 4% от массы геля. Экстракцию биофлавоноидов и получение исследуемых гелевых субстанций осуществляли сотрудники Белорусского государственного технологического университета и Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Исследование проводили на крысах-самцах Wistar, одного возраста и массой 200-250 г. Все работы с экспериментальными животными выполнены с соблюдением законодательства, принципов биоэтики и в соответствии с международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных. Количество и численный состав групп являются адекватными и соответствуют государственным и международным стандартам качества планирования и проведения исследований на животных [4,5].

Ранозаживляющие свойства указанных субстанций изучали на моделях кожных ран: полнослойной линейной раны и лоскутной раны кожи [2,4]. Моделирование кожных ран у лабораторных животных проводили под общим наркозом (тиопентал натрия, 20 мг/кг, внутривенно). В область будущей раны для обезболивания вводили внутримышечно 100 мкл 5%-ного раствора лидокаина гидрохлорида (ОАО «БЗМП»). Для предотвращения пересыхания глазного яблока на слизистую глаз наносили 0,5 мг карбомера «Офтагель» (Santen OY). После исчезновения реакций на болевой (пощипывание лапы пинцетом) и звуковой (хлопок) стимулы на дорсальной поверхности животных выстригали шерсть, а затем вдоль позвоночника выбривали полосу шириной 20 мм и длиной 30 мм, выбритый участок обрабатывали 5%-ным раствором йода (ОАО «БЗМП»). Моделирование линейной раны проводили путем нанесения разреза длиной 25 мм до фасции с наложением лигатуры (нить «Сургикрол», ООО «Футберг») посередине разреза для обеспечения регенерации раны от краев к центру. Моделирование лоскутной раны проводили путем вырезания лоскута кожи (с удалением подкожной клетчатки) посередине выбритого участка. Для обозначения места и формы раны использовали специальный трафарет (пластинка овальной формы площадью $\approx 2 \text{ см}^2$). Анатомическим пинцетом оттягивали кожную складку и ножницами срезали выделенный по трафарету лоскут кожи. Прооперированных крыс помещали в теплое место для выхода из наркоза. После операции животных содержали в отдельных клетках на обычном рационе со свободным доступом к воде.

Раны каждого животного фотографировали с последующей обработкой полученных изображений в программе ImageJ. Исследуемые образцы геля наносили на поврежденные участки кожи крыс ежедневно, начиная со следующего дня после формирования ран и до полного заживления повреждения. Ранозаживляющее действие оценивали по характеру клинического течения процесса заживления (наличие нагноения, продолжительность полного отторжения струпа, наличие или отсутствие вторичного инфицирования, продолжительность и динамика полного срастания краев раны). Значимость отличий оценивали с помощью непарного двухвыборочного теста Стьюдента. Вывод о статистической значимости делали при $p < 0,05$.



Результаты и обсуждение.

Полнослойные линейные раны

Процессы заживления полнослойных линейных ран кожи у животных контрольной группы происходил от краев раны к центру смешанным натяжением – как первичным, так и вторичным. В 1-е–3-и сутки после нанесения линейной раны у всех животных отмечались гиперемия, болезненность, локальное повышение температуры (фаза воспаления). На 4-7-е сутки отечность спадала, при пальпации рана была безболезненная, образовавшийся струп отходил по краям (фаза регенерации). На 12-14-е сутки струп отпадал и образовывался рубец (фаза рубцевания). У части животных раневые поверхности не прилегали друг к другу, возникала грануляционная ткань, которая в ходе заживления превращалась в рубцовую ткань (вторичное натяжение). Длительность заживления экспериментальных ран в контрольной группе составила $12,33 \pm 0,62$ сутки. У животных в экспериментальных группах, где применялись гелевые субстанции, содержащие комплекс флавоноидов в количестве 2 и 4%, фаза воспаления наблюдалась только в течение первых суток с момента наложения на рану исследуемых субстанций. Заживление протекало с образованием струпа на 4-5-е сутки (фаза регенерации) и последующим его отхождением на 6-7-е сутки (фаза рубцевания). На месте раны образовывалась новая ткань без выраженного рубцевания. Следовательно, у экспериментальных животных накожные аппликации гелевой субстанции, содержащей 2% и 4% растительных экстрактов, способствовали достоверному сокращению продолжительности заживления линейных ран по сравнению с таковой у животных контрольной группы (без лечения): при применении геля 2% – в среднем на 3,67 сут (30,82%; $p = 0,00017$); при применении геля 4% – на 3,79 сут (30,33%; $p = 0,00012$).

Лоскутные раны

Ранозаживление в группе контроля происходило от краев раны к центру смешанным натяжением – как первичным, так и вторичным. В 1-3 сутки после нанесения лоскутной раны у всех животных отмечали фазу воспаления, которая характеризовалась наличием в области травмы гиперемии, болезненности и локального повышения температуры. На 4-7-е сутки отмечали фазу регенерации с образованием на поверхности раны струпа. На 8-10-е сутки регистрировали фазу рубцевания. У некоторых животных в месте повреждения возникала грануляционная ткань, которая в ходе заживления превращалась в рубцовую ткань (вторичное натяжение). Длительность заживления экспериментальных ран в группе контроля составила $18,00 \pm 0,60$ сутки.

У животных в экспериментальных группах, где применяли исследуемые субстанции, содержащие флавоноиды, длительность заживления экспериментальных ран в соответствующих группах составила: гель 2% – $13,50 \pm 0,22$ сутки; гель 4% – $13,67 \pm 0,21$ сутки. Заживление происходило с образованием струпа на 4-5 сутки, с последующим его отхождением на 9-е сутки. На месте образовывалась новая кожа без образования выраженной рубцовой ткани. Результаты эксперимента свидетельствуют, что у экспериментальных животных накожные аппликации геля 2% и геля 4% приводили к достоверному сокращению времени заживления лоскутных ран (гель 2% – в среднем на 4,50 сутки (25,00%; $p = 0,0001$); гель 4% – на 4,33 сутки (24,10%; $p = 0,0001$)) по сравнению с нелечеными животными контрольной группы.

Заключение. В результате проведенного экспериментального исследования было установлено, что накожные аппликации геля, содержащего 2% и 4% растительных экстрактов, оказывали выраженное ранозаживляющее действие в процессе регенерации экспериментальных полнослойных линейных ран и лоскутных ран. Применение исследуемых субстанций способствовало ингибированию грубого рубцевания новообразованных тканей, способствуя формированию структурно-функционального регенерата, а также не вызывало воспалительных и иных альтерирующих процессов в кожных покровах, граничащих с зоной формирования лоскутных ран. На основании полученных результатов можно сделать вывод о



том, что содержание растительных экстрактов в исследуемом геле (2% либо 4%) незначительно влияет на его ранозаживляющую активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биология заживления острой и хронической раны / Абаев Ю.К. // Медицинские новости. – 2003. – №6. – С. 3-10.
2. Моделирование заживления ран кожи / А.Ю. Цибульский [и др.]; под ред. Ю. А. Золотова. – 2-е изд., 2012. – 250 с.
3. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский [и др.]; под ред. Е. И. Маевского. – Пушино : Тульский государственный университет, 2013. – 310 с.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов [и др.] // М.: Гриф и К – 2012. – 944 с.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, АНАЛОГОВ НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ, С ВАЗОПРЕССИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ЧЕЛОВЕКА

Жилко М.О., Бородина К.В., Мартинович В.П., Саванец О.Н., Кравченко Е.В.,
Голубович В.П.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, info@iboch.by*

Цели и задачи исследования. Для эффективной разработки препаратов на основе аргинин-вазопрессина (АВП), обладающих ноотропной и антидепрессивной активностью, необходимо изучить принципы взаимодействия молекулы вазопрессина с ее рецепторами. Данная работа была выполнена с целью проверки модели взаимодействия синтетических пептидных аналогов фрагмента АВП(6-9) с рецепторами вазопрессина человека V1a, V1b и V2, которая была разработана в работах [1] и [2]. Проверке подвергались семь тетрапептидов: N-Ac-D-Met-Pro-Arg-Gly-NH₂ (пептид №1), N-Ac-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH₂ (пептид №2), N-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH₂ (пептид №3), N-Ac-Met-Pro-Arg-Gly-NH₂ (пептид №4), N-Ac-Phe-Pro-Arg-Gly-NH₂ (пептид №5), N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (пептид №6), N-Ac-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH₂ (пептид №7). Проведение исследования включало в себя несколько этапов: проведение молекулярного моделирования взаимодействия синтетических тетрапептидов с вазопрессиновыми рецепторами человека и сравнение полученных результатов с экспериментальными данными.

Методы исследования. Для проведения молекулярного моделирования выбрана программа для протеин-пептидного докинга DINC. Перед этим в базах данных были обнаружены или созданы *de novo* структурные модели АВП, синтетических пептидов и вазопрессиновых рецепторов.

Для молекул АВП и рецептора V2 структурные модели были взяты из базы данных RSCB PDB (PDB ID: 7DW9; модели были получены методом электронной микроскопии с разрешением 2,60 Å). Для молекул V1aR и V1bR структурные модели были взяты из базы данных SWISS-MODEL Repository (UniProtKB AC: P37288, название: V1AR_HUMAN и UniProtKB AC: P47901, название: V1BR_HUMAN). Модели для молекул V1aR и V1bR были построены автоматически на основе структурной модели рецептора окситоцина – PDB ID: 7RYC – полученной методом электронной микроскопии с разрешением 2,90 Å; средняя достоверность моделей – 0,64 ± 0,05. Структурные модели синтетических пептидов были нарисованы в программе ChemSketch 2.0, а затем минимизированы в программе Chem3D 19.1.



Полученные структурные модели молекул АВП и белков-рецепторов были затем модифицированы в программах Chem3D 19.1 и UCSF Chimera 1.16. В обеих программах структурные модели были протонированы, а затем минимизированы: в программе Chem3D 19.1 использовались инструменты Rectify и Perform MMFF94 Minimization (применённые параметры: максимальное число итераций – 5000, минимальный среднеквадратический градиент – 0,100). В программе UCSF Chimera 1.16 использовались инструменты AddH (метод – «только стерически») и Minimize Structure (применённые параметры: число шагов в методе перевала – 100, размер шагов в методе перевала – 0,02 Å, число шагов в методе сопряженных градиентов – 10, размер шагов в методе сопряженных градиентов – 0,02 Å, интервал обновления – 10; все атомы, кроме водорода, фиксировались).

Затем, используя модифицированные структурные модели рецепторов, в программе DINC было проведено две группы экспериментов – первая с рецепторами, полученными в программе Chem3D 19.1, а вторая – в программе UCSF Chimera 1.16.

Результаты. Результатом проведения молекулярного докинга АВП и синтетических пептидов с вазопрессиновыми рецепторами в программе DINC стало получение абсолютных значений их энергий взаимодействия. Полученные значения затем были выравнены относительно контроля – значения энергии взаимодействия АВП с вазопрессиновыми рецепторами – значения которых было принято за 0 ккал/моль (рис.).

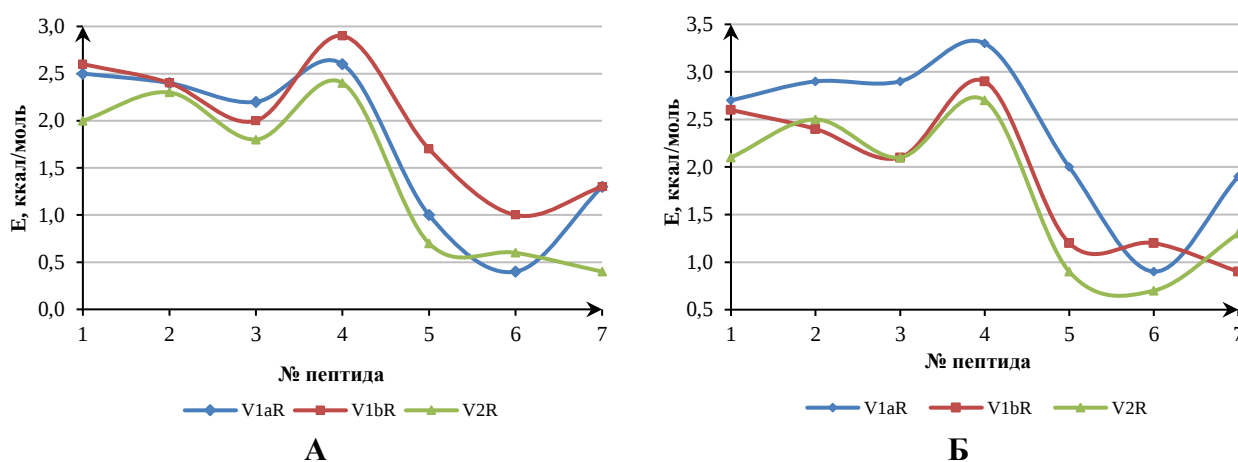


Рисунок. Результаты молекулярного докинга синтетических тетрапептидов с рецепторами нейрогипофизарных гормонов, модели которых были модифицированы: **А** – в программе Chem3D 19.1; **Б** – UCSF Chimera 1.16

При анализе выравненных данных, было обнаружено, что наименьшей разницей в энергиях взаимодействия с контролем обладали пептиды №5, №6 и №7, а наибольшей – пептид №4.

Стоит обратить внимание, что в обеих группах экспериментов у рецептора V1a наблюдается некоторый уровень селективности по отношению к пептиду №6 (рис 1). Для двух остальных рецепторов селективность к определённому пептиду выражена слабее – для каждого из них лишь в одной из групп экспериментов можно говорить о меньшей специфичности к одному из пептидов. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что пептид №6 является селективным агонистом или антагонистом рецептора V1a.

Общие картины распределения энергий взаимодействий у обеих групп экспериментов крайне схожи между собой (рис. 1): близкими значениями энергии взаимодействия (разница в пределах 0,5 ккал/моль) обладают пептиды №1–3. Для пептида №4 происходит увеличение разницы на 0,4–0,9 ккал/моль по сравнению с пептидами №1–3, а для пептидов №5–7 – резкое уменьшение в разнице на 1,2–1,8 ккал/моль по сравнению с пептидом №4.



Несмотря на общее сходство результатов двух групп экспериментов, следует отметить, что комплексы рецепторов, модифицированные в программе Chem3D 19.1, обладают меньшей разницей в абсолютных энергиях взаимодействия по сравнению с комплексами рецепторов, модифицированных в программе UCSF Chimera 1.16. Также, для каждого рецептора обнаруживается отличие в относительном положении на графике как минимум у одного пептида. Если для V1aR таким пептидом является пептид №1, который не показывает наилучших значений в энергии взаимодействия, то для V1bR и V2R такое отличие обнаруживается у одного из трёх лучших тетрапептидов.

При анализе данных, полученных в экспериментах по изучению антидепрессивного эффекта синтетических тетрапептидов при их однократном интраназальном введении крысам-самцам Wistar, было обнаружено, что пептиды №2 и №3 не обладают антидепрессивным эффектом. Пептиды №1, №5 и №6, напротив, проявляют антидепрессивной активностью, хотя и имеют различные механизмы действия: №5 является катехоламинергическим, а пептид №6 – серотонинергическим антидепрессантом. Для пептидов №4 и №7 эксперимент по изучению антидепрессивной активности ещё не проводился.

Результаты, полученные для пептида №1, позволяют сделать вывод, что он проявляет свой антидепрессивный эффект, не взаимодействуя с вазопрессиновыми рецепторами. Этот вывод основывается на следующем противоречии: исходя из экспериментов на модельных животных, можно говорить о наличии у пептида №1 антидепрессивной активности, но результаты исследования *in silico* позволяют утверждать об отсутствии взаимодействия между этим пептидом и вазопрессиновыми рецепторами. Следовательно, проявлять антидепрессивный эффект пептид №1 может активируя как агонист и (или) репрессируя как антагонист другой рецептор или группу рецепторов в организме модельного животного.

Существенная разница в энергии взаимодействия пептида №2 и №3 с контролем, во-первых, коррелирует с экспериментальным выводом об отсутствии у них антидепрессивной активности. Во-вторых, это показывает, что наличие отрицательно заряженной боковой группы в структуре пептида уменьшает его сродство к рецептору по сравнению с пептидом, имеющим в своей структуре ароматическое кольцо (пр., пептиды №5–7). Из этого следует, что остаток серина в этих пептидах не образует водородные и (или) ионные связи с рецептором. Возможно, что увеличение или уменьшение длины боковой группы при сохранении заряда сможет позволить водородной связи образоваться и, тем самым, увеличит стабильность комплекса.

Отсутствие экспериментальных данных для пептида №4 не позволяет сделать конкретных выводов о наличии антидепрессорного эффекта или о механизме его действия, но, поскольку структурно этот пептид крайне схож с пептидом №1, можно предполагать сходство между их свойствами. Во-первых, можно предположить наличие у пептида №4 антидепрессивной активности в экспериментах с модельным организмом, и, во-вторых, отсутствие или низкий уровень взаимодействия с вазопрессиновыми рецепторами *in vitro* и *in vivo*.

Для пептидов №5 и №6 обнаруживается корреляция между результатами экспериментов, проведенных на модельных животных и проведенных *in silico*. Эти пептиды, обладая низкой разницей в энергии взаимодействия с АВП, также обладают заметной антидепрессивной активностью. Исходя из этих данных, можно сделать вывод, что наличие ароматического кольца в аналоге фрагмента АВП (6-9) повышает его сродство к рецептору и уменьшает их энергию взаимодействия.

Несмотря на то, что эксперимент по изучению антидепрессивного эффекта пептида №7 ещё не был проведён, можно сделать предположение, исходя из результатов молекулярного докинга, что пептид №7 будет, как и пептиды №5 и №6, обладать антидепрессивным эффектом, но менее выраженным. Это будет происходить потому, что пептид №7 имеет в своей структуре, как ароматическое кольцо, так и положительно заряженную группу, которая негативно влияет на значение энергии взаимодействия с рецептором.



Заключение. При проведении сравнения результатов молекулярного моделирования синтетических тетрапептидов с вазопрессиновыми рецепторами с данными экспериментов на модельных животных было обнаружено, что пептиды, обладающие ароматическим кольцом, обладают большим сродством к рецепторам и проявляют антидепрессивную активность (пептиды №5 и №6). Пептиды, обладающие отрицательно заряженными боковыми группами, при этом, не обладают большим сродством к рецепторам и не проявляют антидепрессивный эффект (пептиды №2 и №3). Исходя из этого, делается вывод, что дальнейший поиск потенциальных антидепрессивных препаратов необходимо вести среди аналогов АВП (6-9), обладающего незаряженным ароматическим кольцом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Синтез и исследование антидепрессивных свойств новых аналогов аргинин-вазопрессина / К.В. Бородин [и др.] // Биоорганическая химия. – 2022. – Т. 48, № 3. – С. 357-370.
2. Отставленные эффекты хронического неонатального введения АВП(6-9) и его аналога – АС-d-MPRG на поведение крыс разных возрастных групп / О.Г. Воскресенская, А.А. Стаханова, А.А. Каменский // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова с международным участием, Воронеж, 18-22 сентября 2017 года. – Воронеж: Издательство Истоки, 2017. – С. 1235-1237.

ЭКСТРАКЦИОННАЯ ПРОБОПОДГОТОВКА ПРИ ГХ-МС/МС ОПРЕДЕЛЕНИИ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ

Заяц М.Ф.¹, Лещев С.М.¹, Походня Ю.Г.², Агабалаев А.А.³

¹Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь, mikhail_zayats@tut.by, leshev.sergey54@gmail.com

²Национальная антидопинговая лаборатория, агрогородок Лесной, 31, 223040, Минский р-н, Беларусь, director@antidoping.by, pavel11sg@gmail.com

³РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», Лаборатория фармакопейного и фармацевтического анализа, пр-т Дзержинского, 83, корпус 15, 220045, г. Минск, Беларусь, alexandrmilbox@inbox.ru

Введение. В последние годы значительно возросло использование биологически активных добавок к пище и специализированного спортивного питания (далее БАД) в процессе тренировки и подготовки. Было обнаружено, что многие добавки содержат не указанные на этикетках запрещенные вещества, прежде всего анаболические стероиды (далее АС), вызывающие положительный результат при тестировании спортсмена на применение допинга [1].

В связи с этим, очевидна необходимость контроля БАДов, поступающих на рынок, для обеспечения спортсменов качественными добавками, не содержащими веществ, запрещенных Всемирным антидопинговым агентством ВАДА [2].

В настоящее время наиболее распространенным методом скрининга при допинг-контроле является газовая хроматография в сочетании с детектированием на тройном квадрупольном масс-анализаторе (ГХ-МС/МС).

В большинстве случаев процедура анализа БАДа включает экстракцию, очистку экстрактов, дериватизацию и последующее определение ТМС производных АС при помощи ГХ-МС/МС [3].

В то же время разработка универсальной методики для обнаружения в составе БАД запрещенных стероидов наталкивается на определенные трудности из-за различия в составе встречающихся форм БАДов, таких как экстракты, сухие и жидкие концентраты, капсулы, таблетки, порошки и т.д. Матричные компоненты в них представлены как гидрофобными



веществами (жиры, липиды и др.), так и гидрофильными (сахариды, белки и т.д.), попадающими в хроматографируемый раствор и затрудняющими определение АС.

Описанные в литературе методики пробоподготовки БАДов трудоемки и не позволяют получать достоверные результаты примерно в 11-30% случаев из-за сильного влияния матрицы [3], отсутствия на хроматограммах пика, соответствующего внутреннему стандарту, невозможности полного выпаривания некоторых экстрактов или плохой дериватизации аналитов. На данный момент матричные эффекты невозможно предсказать на основе состава добавки, указанного на этикетке.

Более того, все используемые в настоящее время методики являются эмпирическими и не имеют научного обоснования в связи с отсутствием данных по экстракции АС. Определение констант распределения АС в различных экстракционных системах позволит предложить оптимизированный, более эффективный вариант пробоподготовки, что позволит сократить трудозатраты и расход материалов [4].

Цель работы – установить закономерности экстракции ряда анаболических стероидов (1,4-андростадиен-3,17-диона; 17 α -метилтестостерона; 19-норэтиохоланолон; 4-гидрокситестостерона; 4-андростен-3,17-диона; 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола; дегидроэпиандростерона; калустерона; клостебола; метандиенона; метилдиенолона; нандролон; тестостерона; эпитестостерона; тиболон; 19-норандростендион; 1-метил-5 α -андростан-3 α -ол-17-он) водно-ацетонитрильными смесями из гексановых растворов и на основании полученных данных разработать усовершенствованную методику пробоподготовки БАДов для определения в них анаболических стероидов методом ГХ-МС/МС.

Методы исследования. ГХ-МС/МС-анализ проводили на газовом хроматографе Agilent 7890 с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» Agilent 7000 (Agilent Technologies, США). Разделение веществ осуществляли на капиллярной колонке длиной 25 м, внутренним диаметром 0,25 мм с нанесенной неподвижной фазой VF-1-MS толщиной 0,25 мкм (Agilent, США).

В испаритель вводили 1 мкл образца в режиме без деления потока. Температуру испарителя поддерживали постоянной на уровне 280°C

Поток газа-носителя поддерживали постоянным (1,5 мл/мин). Вещества разделяли в режиме градиентного поднятия температуры термостата колонки: 0 мин 140°C, 16,7 мин 290°C, 20,7 мин 310°C.

Качественный и количественный анализ проводился с использованием внутреннего стандарта – 1-метил-5 α -андростан-3 α -ол-17-он.

В данной работе разрабатывали экстракционную методику пробоподготовки. Для определения оптимальных условий проведения экстракции наиболее целесообразным представляется подход, заключающийся в первоначальном нахождении констант распределения аналитов и последующем их использовании для выбора условий пробоподготовки [4].

Перед хроматографическим определением концентраций АС в гексановых растворах их подвергали дериватизации с получением триметилсилильных производных. Для дериватизации использовали раствор следующего состава: МСТФА – аммония иодид – дитиотреитол = 2000 – 4 – 3, мкл/мг/мкл.

Результаты и их обсуждение. В таблице приведены полученные значения логарифмов констант распределения некоторых из 16 исследованных анаболических стероидов в экстракционных системах гексан – водно-ацетонитрильные смеси.



Таблица. Логарифмы констант распределения анализируемых соединений в экстракционных системах гексан – водно-ацетонитрильные смеси; $n=3$, ОСКО (P) $\leq 15\%$

Полярная фаза	Анаболический стероид							
	19-Норэти-холанолон	Нан-дролон	Тиболон	Метан-диенон	Метил-диенолон	Калусте-рон	Клосте-бол	Тестос-терон
Вода	0,66	0,18	1,04	0,20	0,15	0,80	0,74	0,43
20% AcN	0,28	-0,54	0,69	-0,33	-0,39	0,52	0,28	-0,22
30% AcN	-0,12	-0,89	0,15	-0,74	-0,70	0,04	-0,22	-0,59
40% AcN	-0,52	-1,11	-0,55	-1,07	-1,00	-0,28	-0,64	-0,82
50% AcN	-0,82	-1,48	-0,92	-1,46	-1,39	-0,72	-1,03	-1,14
60% AcN	-1,13	-1,80	-1,24	-1,74	-1,64	-1,11	-1,49	-1,44
70% AcN	-1,26	-1,89	-1,38	-1,82	-1,74	-1,36	-1,68	-1,60
80% AcN	-1,37	-2,01	-1,55	-1,92	-1,85	-1,43	-1,77	-1,77
90% AcN	-1,57	-2,09	-2,07	-2,17	-2,05	-1,66	-2,00	-1,80
95% AcN	-1,48	-1,96	-1,80	-1,92	-1,89	-1,54	-1,96	-1,82
100% AcN	-1,18	-1,64	-1,59	-1,51	-1,46	-1,24	-1,66	-1,48

Из таблицы видно, что все изученных стероиды являются умеренно гидрофобными веществами, и величины логарифмов их констант распределения $\lg P$ в системе гексан – вода больше нуля и имеют максимальные значения.

Переход от системы гексан–вода к системе гексан–ацетонитрил приводит к падению величин $\lg P$ АС на 1,6-2,6 единиц.

Следует отметить, что в системах гексан – водно-ацетонитрильные смеси величины $\lg P$ гидрофобных АС сильно уменьшаются с ростом концентрации органического компонента в полярной фазе от 0 до 80% (об.). При этом величины логарифмов констант распределения всех рассмотренных в данной работе АС меньше 0 в системах гексан – водно-ацетонитрильные смеси с объемным содержанием органического растворителя более 40%.

Что касается области концентраций органического растворителя в водно-органических смесях от 80 до 100% (об.), то из данных, приведенных в табл., видно, что для изученных соединений наблюдаются отчетливо выраженные минимумы констант распределения при концентрации ацетонитрила 90-95% (об.).

Данное явление характерно также для органических веществ небольшой молекулярной массы, в структуру молекул которых, наряду с углеводородными заместителями, входят сильно полярные функциональные группы [4].

Полученные данные показывают, что для извлечения большинства исследуемых АС из гексановых растворов наиболее эффективными и одновременно селективными экстрагентами являются водно-ацетонитрильные смеси, содержащие от 10 до 20 объемных % воды.

На основании рассчитанных констант распределения была разработана **экстракционная методика пробоподготовки** для определения АС в БАДах и специализированном спортивном питании. Данная методика включает в себя гомогенизацию образца БАДа в воде и извлечении АС, содержащихся в образце, гексаном. При этом экстрагируются АС и гидрофобные компоненты матрицы, а гидрофильные примеси отделяются. Затем из гексанового раствора АС экстрагируют 90% водным раствором ацетонитрила, сильно гидрофобные компоненты матрицы отделяются. Степень извлечения АС из гексанового раствора в соответствии с величинами констант распределения при этом составляет 93,7-98,3%. В результате остается очищенный водно-ацетонитрильный экстракт, который после удаления воды и ацетонитрила силилируют и хроматографируют.

Предложенная методика была апробирована на образцах БАД, содержащих изученные АС, и позволила однозначно идентифицировать искомые анаболический стероиды.



Предложенная методика характеризуется стандартным отклонением 10-15% и пределом обнаружения порядка 10 мкг/кг БАД, что позволяет надежно определять в них примеси запрещенных анаболических стероидов.

Закключение. Таким образом, на основании экспериментально определенных констант распределения АС между гексаном и водно-ацетонитрильными смесями была разработана оптимизированная методика пробоподготовки, основанная на экстракционном извлечении анаболических стероидов из водной суспензии анализируемого образца БАД гексаном с последующей их реэкстракцией 90% (об.) водным раствором ацетонитрила. Апробация разработанной методики показала возможность ее применения для контроля БАД на содержание запрещенных анаболических стероидов. Предложенная методика характеризуется стандартным отклонением 10-15% и пределом обнаружения порядка 10 мкг/кг БАД, что позволяет надежно определять в них примеси запрещенных анаболических стероидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nutritional supplements and doping / A. Pipe, C. Ayotte // Clin. J. Sport Med. – 2012. – Vol. 12(4). – P. 245-249.
2. Dietary supplements for athletes: Emerging trends and recurring themes / R.J. Maughan, P.L. Greenhaff, P. Hespel // J. Sports Sci. – 2011. – Vol. 29(1). – P. 57-66.
3. Analytical strategies for the detection of nonlabelled anabolic androgenic steroids in nutritional supplements / M.K. Parr [et al.] // Food Addit. Contam. – 2004. – Vol. 21(7). – P. 632-640.
4. Заяц М.Ф. Новые подходы в применении экстракции при определении микроколичеств пестицидов в сельскохозяйственной продукции и объектах окружающей среды хроматографическими методами / М.Ф. Заяц. – Минск : БГУ, 2019. – 355 с.

EXTRACTION SAMPLE PREPARATION FOR THE GC-MS/MS DETERMINATION OF ANABOLIC STEROIDS IN BIOLOGICALLY ACTIVE SUPPLEMENTS

Zayats M.F.¹, Leshchev S.M.¹, Pakhadnia Yu.G.², Ahabalayeu A.A.³, Yurchenko R.A.¹

¹Belarusian State University, 4, Nezavisimosti Avenue, Minsk, 220030, Belarus,
mikhail_zayats@tut.by, leschev.sergey54@gmail.com, yurchenko@aipsin.com

²National Anti-Doping Laboratory, 223040, Belarus, Minsk region, ag. Lesnoy, 31,
director@antidoping.by, pavel11sg@gmail.com

³RUE «Center for Examinations and Tests in Health Service», Laboratory of Pharmacopoeial and Pharmaceutical Analysis, 83 block 15, 7th floor, Dzerzhinsky Avenue, Minsk, 220045 Belarus,
alexandrmailbox@inbox.ru

The extraction of anabolic steroids (1,4-androstadiene-3,17-dione; 17 α -methyltestosterone; 19-norethiocholanolone; 4-hydroxytestosterone; 4-androstene-3,17-dione; 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol; dehydroepiandrosterone; calusterone; clostebol; methandienone; methyldienolone; nandrolone; testosterone; epitestosterone; tibolone; 19-norandrostenedione; 1-methylene-5 α -androstan-3 α -ol-17-one) by aqueous-organic mixtures from hexane solutions was studied at 20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C. It was found that the most effective and selective extractants of anabolic steroids (AS) from hydrocarbon solutions are water-acetonitrile mixtures containing from 10 to 20% by volume of water. The calculated partition ratios of AS were used for the development of the sample preparation technique for the GC-MS/MS determination AS in biologically active dietary supplements (BADS) and specialized sports nutrition. The proposed method is characterized by a standard deviation of 10-15% and a detection limit about 10 μ g/kg of BADS, which makes it possible to reliably determine impurities of prohibited anabolic steroids in them.



МЕТОДИКА ЭКСТРАКЦИОННОЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ В ПРОЦЕССЕ ГХ-МС/МС ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В МОЧЕ СПОРТСМЕНОВ

Заяц М.Ф.¹, Лещев С.М.¹, Походня Ю.Г.², Агабалаев А.А.³, Юрченко Р.А.¹.

¹Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Беларусь, mikhail_zayats@tut.by, leshev.sergey54@gmail.com, yurchenko@aipsin.com

²Национальная антидопинговая лаборатория, агрогородок Лесной, 31, 223040, Минский р-н, Беларусь, director@antidoping.by, pavel11sg@gmail.com

³РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», Лаборатория фармакопейного и фармацевтического анализа, пр-т Дзержинского, 83, корпус 15, 220045, Минск, Беларусь, alexandrmailbox@inbox.ru

Повышение спортивных результатов спортсменов за счет введения запрещенных препаратов является глобальной проблемой современного мира [1].

Из всех классов соединений, запрещённых к применению, анаболические андрогенные стероиды (далее ААС) занимают первое место по частоте употребления спортсменами [1,2].

В настоящее время в анализе ААС широко используется хроматомасс-спектрометрия, в том числе метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» (ГХ-МС-МС) [2]. Стоит отметить, что, несмотря на высокую чувствительность и селективность методов, применяемых для определения ААС в пробах спортсменов, результаты анализа во многом зависят от эффективности предварительной пробоподготовки [2].

При допинг-контроле определяют не только исходные анаболические агенты, входящие в состав препаратов в качестве действующего вещества, но и их метаболиты [2,3]. Основным объектом исследования антидопинговых лабораторий является моча.

Выведение большинства ААС и их метаболитов с мочой происходит после конъюгирования стероида с глюкуроновой кислотой или сульфатом с образованием нелетучих полярных соединений. При ГХ-МС определении анаболических стероидов конъюгаты стероидов требуется гидролизовать перед анализом [2], для чего широко используется фермент глюконидаза из *E. Coli*.

Присутствие гидроксильных и кетогрупп в ААС и их метаболитах приводит к трудностям при их ГХ-МС определении, что связано главным образом с их недостаточным хроматографическим разрешением и термодеструкцией ААС в инжекторе. Поэтому ААС перед ГХ-МС анализом обычно дериватизируют реакцией с MSTFA (N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид) и другими агентами [2].

Гидроксильные функциональные группы количественно реагируют с MSTFA, образуя стабильные триметилсилильные (ТМС) эфиры.

Для образования ТМС-производных анаболических стероидов с кетогруппами посредством реакции с их енольными формами применяют триметилсилилиодид (ТМСИ) в качестве катализатора. При этом использование иодида аммония NH_4I одновременно с MSTFA позволяет получать ТМСИ непосредственно в реакционной смеси. Для повышения выхода реакции также рекомендуется добавлять восстановитель, такой как дитиотреитол, что сводит к минимуму образование йода [3].

Одним из важных этапов пробоподготовки наряду с гидролизом конъюгатов и дериватизацией является жидко-жидкостная экстракция анализируемых соединений из мочи (основной тип матрицы, используемой для анализа) [2,3].

Моча представляет собой достаточно сложную по составу матрицу, в которой могут присутствовать низкомолекулярные продукты метаболизма аминокислот и сахаров (амины, мочевины, карбоновые кислоты, соли карбоновых кислот и др.), небольшие количества пептидов, стероидов, пигмента уробилина, окрашивающего мочу в желтый цвет.



Жидкостную экстракцию используют для удаления мешающих компонентов матрицы и перевода определяемых веществ в неводную среду, в которой возможна реакция получения триметилсилильных (ТМС) производных данных веществ [2,3].

При этом экстракция ААС в настоящее время недостаточно хорошо изучена, и выбор экстракционной системы для пробоподготовки часто осуществляется эмпирически.

Цель данной работы – определить константы распределения ряда ААС (тестостерона; эпитестостерона; эпиметендиола; 17 α -метилтестостерона; 19-норэтиохоланолона; 18-норметенола; 19-норандростерона; 3 α -гидрокси-2 α -метил-5 α -андростан-17-она; 9 α -фтор-17,17-диметил-18-норандроста-4,13-диен-11 β -ол-3-она; 1 α -метил-5 α -андростан-3 α -ол-17-она; 1 α -метил-5 α -андростан-3 α ,17 β -диола; эпиоксандролона; метастерона; оксандролона; форместана; 16 β -гидроксифуразабола) в системах гексан – вода и водно-солевые растворы, диэтиловый эфир – вода, хлористый метилен – вода, и на основе полученных данных разработать методику экстракционной пробоподготовки для ГХ-МС/МС определения анаболических стероидов в моче спортсменов при проведении допинг-анализа.

Методы исследования. ГХ-МС/МС-анализ проводили на газовом хроматографе Agilent 7890 с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» Agilent 7000 (Agilent Technologies, США). Разделение веществ осуществляли на капиллярной колонке длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм с нанесенной неподвижной фазой VF-1-MS толщиной 0,25 мкм (Agilent, США).

В испаритель вводили 1 мкл образца в режиме без деления потока. Температуру испарителя поддерживали постоянной на уровне 280°C.

Поток газа-носителя поддерживали постоянным (1,2 мл/мин). Вещества разделяли в режиме градиентного поднятия температуры термостата колонки: 0 мин 140°C, 16,7 мин 290°C, 20,7 мин 310°C.

Качественный и количественный анализ проводился с использованием внутреннего стандарта – метилтестостерона (MTSN).

В данной работе разрабатывали экстракционную методику пробоподготовки. Для определения оптимальных условий проведения экстракции наиболее целесообразным представляется подход, заключающийся в первоначальном нахождении констант распределения аналитов и последующем их использовании для выбора условий пробоподготовки [4].

Перед хроматографическим определением концентраций АС в гексановых растворах их подвергали дериватизации с получением триметилсилильных производных. Для дериватизации использовали раствор следующего состава: МСТФА – аммония иодид – дитиотреитол = 2000 – 4 – 3, мкл/мг/мкл.

Результаты и их обсуждение. В таблице приведены полученные значения констант распределения некоторых наиболее гидрофильных из 16 исследованных анаболических стероидов в изученных экстракционных системах, а также рассчитанные по константам распределения степени извлечения АС органическим растворителем из водной фазы при однократной экстракции и равном соотношении объемов фаз.

Найдено, что практически все изученные стероиды являются умеренно гидрофобными веществами, и величины их констант распределения в системе гексан – вода больше единицы и составляют от 3 до 50, а в случае 18-норметенола константа больше 200. Гидрофобность АС связана с наличием в структуре их молекул гидрофобного циклопентанпергидрофенантренового фрагмента и углеводородных радикалов.

Благодаря гидрофобности извлечение АС из воды и водных образцов, к которым относятся биологические жидкости, представляется довольно простой задачей. Рассчитанные по константам распределения степени извлечения АС гексаном из воды при однократной экстракции и равном соотношении объемов фаз превышают 77% (для тестостерона) и составляют в среднем 90%. Исключением является оксандролон, для которого $P = 0,96$, а $R = 49\%$.



Таблица. Константы распределения (P) некоторых АС в изученных экстракционных системах и степени извлечения (R) АС органическим растворителем из водной фазы при однократной экстракции и равном соотношении объемов фаз; $n=3$, ОСКО (P) $\leq 15\%$

Соединение	Экстракционная система									
	Гексан – вода		Гексан – 0,5 М Na ₂ SO ₄		Гексан – 1 М Na ₂ SO ₄		Et ₂ O – вода		CH ₂ Cl ₂ – вода	
	P	R , %	P	R , %	P	R , %	P	R , %	P	R , %
эпитестостерон	5,1	84	–	–	–	–	–	–	–	–
тестостерон	3,3	77	24	96	>120	>99	33	97	42	98
эпиоксандролон	4,5	82	–	–	–	–	–	–	–	–
оксандролон	0,96	49	7	88	47	98	12,1	92	23	96

Для повышения полноты экстракционного извлечения из воды оксандролон, наименее гидрофобного из изученных АС, целесообразно повысить его константу распределения, что легко достигается применением эффекта высаливания или использованием более активных растворителей. Показано, что уже при относительно невысокой концентрации сульфата натрия, 0,5 – 1,0 моль/л, благодаря значительному росту констант распределения АС, обеспечивается высокая степень извлечения данных веществ гексаном ($R>85\%$).

Замена гексана на более активные растворители – диэтиловый эфир и хлористый метилен также позволяет значительно повысить константы распределения АС, а, следовательно, и степени их извлечения из водных растворов.

На основании полученных констант распределения была разработана экстракционная методика пробоподготовки для определения АС и их метаболитов в моче спортсменов.

Данная методика включает в себя отбор аликвоты мочи, добавление фосфатного буферного раствора с рН $6,5 \pm 0,1$, гидролиз метаболитов при действии β -глюкуронидазы из *E. Coli* и извлечения аналитов гексаном с использованием высаливания сульфатом аммония натрия. В случае менее гидрофобных АС, таких как оксандролон, для повышения степени извлечения можно использовать более активные органические экстрагенты – хлористый метилен или диэтиловый эфир. При этом экстрагируются АС и гидрофобные компоненты матрицы, а гидрофильные примеси отделяются. Степень извлечения АС из водного раствора в соответствии с величинами констант распределения в данных условиях превышает 95%. Органический экстракт выпаривают досуха в токе азота, силилируют и хроматографируют.

Следует отметить, что использование гексана и высаливания является предпочтительным по сравнению с экстракцией целевых компонентов эфиром и хлористым метиленом без применения высаливания. Это обусловлено наибольшей селективностью гексана и минимальной экстракцией матричных компонентов мочи, которые могут отрицательно влиять на получаемые результаты [4].

Предложенная методика была апробирована на образцах мочи, содержащих изученные АС и их метаболиты, и позволила однозначно идентифицировать искомые аналиты. Методика характеризуется стандартным отклонением 10-15% и пределом обнаружения АС и их метаболитов порядка 10 нг/мл мочи.

Таким образом, на основании экспериментально определенных констант распределения АС и их метаболитов между органическими растворителями и водно-солевыми растворами была разработана усовершенствованная методика пробоподготовки для их определения в моче спортсменов методом ГХ-МС. Методика характеризуется относительным стандартным отклонением 10-15% и пределом обнаружения АС и их метаболитов порядка 10 нг/мл мочи.



ЛИТЕРАТУРА

1. Фармакология спорта / Горчакова Н.А., Гудивок Я.С., Гунина Л.М. [и др.]; под общ. ред. С.А. Олейника, Л.М. Гуниной, Р.Д. Сейфуллы. – К.: Олимп. л-ра, 2010. – 640 с.
2. Kicman A.T., Gower D.B. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives // *Ann. Clin. Biochem.* – 2003. – Vol. 40. – P. 321-356.
3. Segura J. Derivatization procedures for gas chromatographic–mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents / J. Segura, R. Ventura, C. Jurabo // *J. Chromatogr. B.* – 1998. – Vol. 713(1). – P. 61-90.
4. Заяц М.Ф. Новые подходы в применении экстракции при определении микроколичеств пестицидов в сельскохозяйственной продукции и объектах окружающей среды хроматографическими методами / М.Ф. Заяц. – Минск : БГУ, 2019. – 355 с.

METHOD OF EXTRACTION SAMPLE PREPARATION IN THE PROCESS OF GC-MS/MS DETERMINATION OF ANABOLIC STEROIDS AND THEIR METABOLITES IN THE URINE OF ATHLETES

Zayats M.F.¹, Leshchev S.M.¹, Pakhadnia Yu.G.², Ahabalayeu A.A.³, Yurchenko R.A.¹

¹Belarusian State University, 4, Nezavisimosti Avenue, Minsk, 220030 Belarus,
mikhail_zayats@tut.by, leschev.sergey54@gmail.com, yurchenko@aipsin.com

²National Anti-Doping Laboratory, 223040 Belarus, Minsk region, ag. Lesnoy, 31,
director@antidoping.by, pavel11sg@gmail.com

³RUE «Center for Examinations and Tests in Health Service», Laboratory of Pharmacopoeial and Pharmaceutical Analysis, 83 block 15, 7th floor, Dzerzhinsky Avenue, Minsk, 220045 Belarus,
alexandrmailbox@inbox.ru

The extraction of anabolic steroids (testosterone; epitestosterone; epimethenediol; 17 α -methyltestosterone; 19-norethiocholanolone; 18-normethenol; 19-norandrosterone; 3 α -hydroxy-2 α -methyl-5 α -androstan-17-one; 9 α -fluoro-17,17-dimethyl-18-norandrost-4,13-dien-11 β -ol-3-one; 1 α -methyl-5 α -androstan-3 α -ol-17-one; 1 α -methyl-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol; epioxandrolone; methasterone; oxandrolone; formestane; 16 β -hydroxyfurazabol) with organic solvents from water and aqueous salt solutions was studied at 20 $\pm$ 1 ° C. It was found that anabolic steroids (AS) are most selectively extracted from aqueous and aqueous salt solutions by hexane, which extracts the majority of AS. To increase the recovery of AS the salting out with sodium sulfate and more active organic extractants, such as methylene chloride or diethyl ether, can be used. The calculated partition ratios of AS were used for the development of the sample preparation technique for the GC-MS/MS determination of AS and their metabolites in the urine of athletes. The proposed technique is characterized by a standard deviation of 10-15% and a detection limit of about 10 ng/ml of AS and their metabolites in urine.

Keywords: anabolic steroids, metabolites, urine, extraction, partition ratios, gas chromatography-mass spectrometry.



ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ПРИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ОБЪЕКТАХ СЛОЖНОГО МАТРИЧНОГО СОСТАВА

Заяц М.Ф.¹, Лещев С.М.¹, Юрченко Р.А.¹, Михнюк О.Н.²

¹Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Беларусь, mikhail_zayats@tut.by, leshev.sergey54@gmail.com, yurchenko@aipsin.com

²Государственный институт повышения квалификации и переподготовки кадров таможенных органов, ул. Могилевская, 45/4, 220007, Минск, Беларусь, mikhniuk.volha@yahoo.com

Введение. Разработка хроматографических методик определения следовых количеств органических веществ в сложных по составу матрицах в настоящее время является одним из ключевых направлений развития современной аналитической химии. Она востребована в экологическом мониторинге, оценке безопасности и качества пищевой продукции, биологических, медицинских, криминалистических исследованиях и др. При этом разработке методик пробоподготовки, включая очистку экстрактов от матричных компонентов, уделяется недостаточное внимание.

Следует отметить, что при определении следовых количеств органических веществ в сложных по составу объектах нередко наблюдается резкое искажение получаемых результатов вплоть до появления ложноотрицательных и даже ложноположительных результатов. Причиной тому является непредсказуемое влияние матрицы на аналитические сигналы микрокомпонентов. Кроме того, введение пробы в хроматограф без отделения аналита от матрицы ведет также к загрязнению, снижению срока службы и даже порче хроматографического оборудования [1].

Поэтому другим важным направлением решения проблемы следового анализа является разработка простых и эффективных способов пробоподготовки объектов сложного состава. Они заключаются в селективном извлечении и концентрировании аналитов, а также наиболее полном разделении целевых и матричных компонентов. Очевидно, что получение экстрактов, свободных от матричных компонентов, во многих случаях позволит повысить достоверность и точность получаемых результатов, а также использовать менее дорогостоящее и более простое и распространенное хроматографическое оборудование для определения целевых компонентов.

При пробоподготовке объектов сложного матричного состава, каковыми являются сельскохозяйственная и пищевая продукция и объекты окружающей среды, широкое распространение получил метод жидкостной экстракции. В то же время жидкостная экстракция часто применяется недостаточно эффективно из-за эмпирического подхода в выборе экстрагента и условий экстракции. Следствием этого является невысокая эффективность и многостадийность большинства описанных в литературе методик пробоподготовки, их длительность и высокая стоимость.

Поэтому очевидна актуальность разработки усовершенствованного подхода к решению проблемы пробоподготовки объектов сложного матричного состава, основанного на систематическом исследовании экстракции содержащихся в них соединений. Сущность подхода заключается в изучении влияния молекулярной структуры определяемых веществ и природы и состава фаз экстракционных систем на константы P и коэффициенты D распределения веществ с последующим использованием указанных параметров для разработки простых, эффективных и надежных методик экстракционного выделения и концентрирования аналитов с дальнейшим их хроматографическим определением [1].

Цель исследования – разработать усовершенствованный подход к созданию экспрессных и эффективных методик экстракционной пробоподготовки при хроматографическом определении следовых количеств органических веществ в объектах сложного матричного состава.

Методы исследования: методы газовой хроматографии с катарометрическим, пламенно-ионизационным, импульсным пламенным фотометрическим, электронно-захватным,



одно- и трехкврупольным масс-спектрометрическим детектированием, высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным, одно- и трехкврупольным масс-спектрометрическим детектированием, ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения типа «квруполь – орбитальная ловушка», методы титрования и гравиметрии.

Результаты и их обсуждение. Рассмотрены закономерности жидкостной экстракции органических соединений, способы описания и прогнозирования экстракционных равновесий. Рассмотрены основные и проблемы пробоподготовки при анализе объектов сложного состава и описаны способы их решения, основанные на применении жидкостной экстракции.

Изложены основные подходы к применению экстракции как при разделении органических веществ, так и при определении ряда токсикантов растительного и синтетического происхождения во множестве объектов сложного матричного состава. На основании полученных авторами банка данных по экстракции многих сотен модельных веществ и органических токсикантов во множестве экстракционных систем и метода групповых инкрементов сформулированы подходы к выбору оптимальных условий экстракционного разделения аналитов и матричных компонентов, а также концентрирования аналитов.

Простота выбора оптимальной экстракционной системы и высокая эффективность экстракционного разделения аналитов и матричных компонентов, а также концентрирования аналитов легла в основу ряда экстракционно-хроматографических методик определения следовых количеств органических веществ различных классов в ряде объектов.

Разработаны и апробированы следующие группы методик:

- ✓ Определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в грудном женском молоке и жировых матрицах [2];
- ✓ Определение характеристических компонентов алкогольной продукции с целью установления факта ее фальсификации [3];
- ✓ Определение пестицидов различных классов в сельскохозяйственной продукции и объектах окружающей среды [1];
- ✓ Определение наркотических и психотропных веществ и ядов растительного, грибного и синтетического происхождения в различных объектах [4,5];
- ✓ Определение компонентов продуктов пиролиза резинотехнических изделий и др.

Сущность методик может быть проиллюстрирована рисунком, на котором приводятся хроматограммы растворов наркотических и психотропных веществ, полученных с использованием широко применяемого в таможенной практике малоселективного скринингового метанольного метода и растворов, полученных путем предварительной ступенчатой экстракционной очистки аналитов от гидрофобных и гидрофильных примесей.

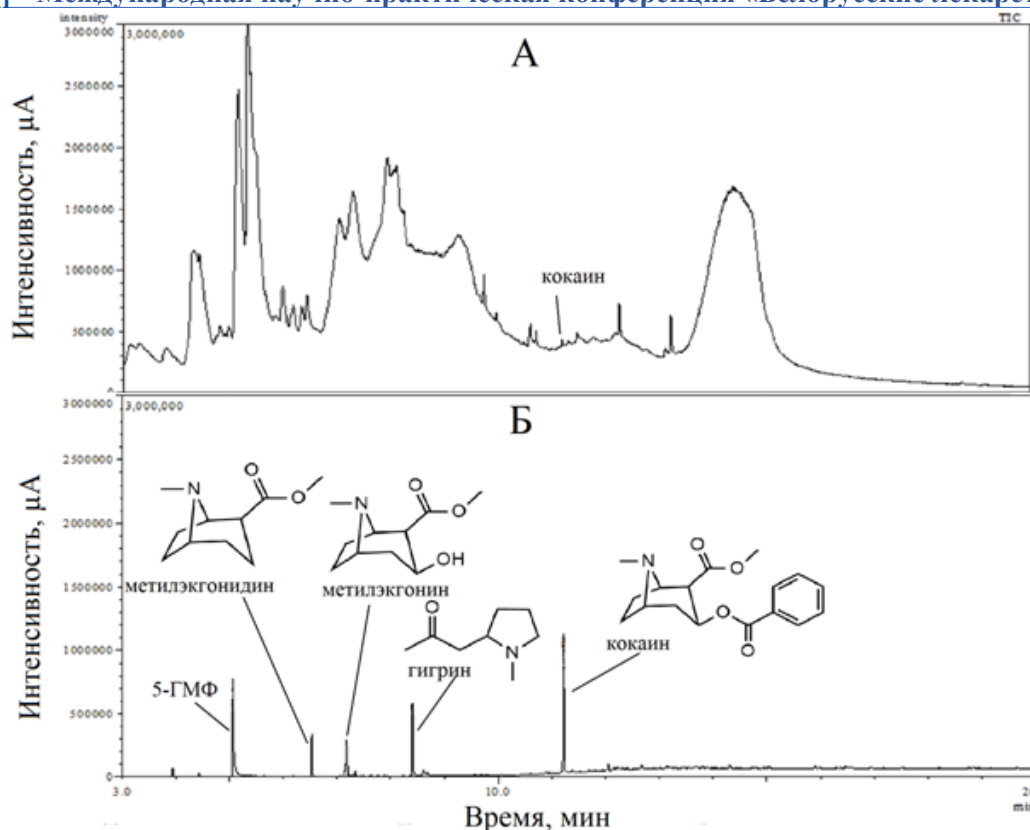


Рисунок. Хроматограммы экстракта карамельного леденца, содержащего экстракт коки: **А** – после экстракции метанолом; **Б** – после применения метода экстракционной очистки

Из рисунка следует, что применение экстракционной пробоподготовки способствует как радикальному снижению предела обнаружения аналитов, так и значительному повышению достоверности их определения.

Закключение. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют об эффективности описанных подходов к разработке усовершенствованных экстракционных методик пробоподготовки, которые в свою очередь позволяют значительно расширить возможности и улучшить аналитические характеристики хроматографических методов при определении микроколичеств органических веществ в различных объектах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новые подходы в применении экстракции при определении микроколичеств пестицидов в сельскохозяйственной продукции и объектах окружающей среды хроматографическими методами / М.Ф. Заяц. – Минск : БГУ, 2019. – 355 с.
2. Экстракция полихлорированных бифенилов и хлорорганических пестицидов полярными органическими растворителями / Лещёв С.М., Буневич Н.В., Шуляковская О.В. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2012. – № 1. – С. 47-52
3. Разработка и применение экстракционной пробоподготовки при хромато-масс-спектрометрическом исследовании коньячной продукции / С.М. Лещев, М.Ф. Заяц, Р.А. Юрченко, В.А. Винарский // Журн. аналит. химии. – 2008. – Т. 63, №7. – С. 690-697.
4. Экстракция анаболических стероидов водно-органическими смесями из гексановых растворов. Журнал Белорусского государственного университета / Лещёв С.М. [и др.] // Химия. – 2022. – № 1. – С.31-42.
5. Экстракционно-хроматографическое определение наркотических средств и психотропных веществ в объектах сложного матричного состава / О.Н. Михнюк, С.М. Лещев // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 4. – С. 422-430.



THE USE OF LIQUID EXTRACTION IN CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF TRACE AMOUNTS OF ORGANIC SUBSTANCES IN OBJECTS OF COMPLEX MATRIX COMPOSITION

Zayats M.F.¹, Leshchev S.M.¹, Yurchenko R.A.¹, Mikhniuk O.N.²

¹Belarusian State University, 4, Nezavisimosti Avenue, Minsk, 220030 Belarus, mikhail_zayats@tut.by, leshev.sergey54@gmail.com, yurchenko@aipsin.com

²State Institution of Advanced Training and Retraining of the Customs of the Republic of Belarus, 45/4, Mogilevskaya Str., 220007, Minsk, Belarus, mikhniuk.volha@yahoo.com

Regularities of liquid extraction of organic compounds, methods of description and prediction of extraction equilibria are considered. The main problems of sample preparation in the analysis of objects of complex composition are considered and methods for their solution based on the use of liquid extraction are described. The main approaches to the use of extraction both in the separation of organic substances and in the determination of a number of toxicants of plant and synthetic origin in a variety of objects of complex matrix composition are outlined. Based on the data bank on the extraction of many hundreds of model substances and organic toxicants in a variety of extraction systems and the method of group increments, the approaches for choosing the optimal conditions for the extraction separation of analytes and matrix components, as well as for the concentration of analytes were formulated. The simplicity of choosing the optimal extraction system and the high efficiency of the separation of analytes and matrix components, as well as the preconcentration of analytes by liquid extraction, formed the basis of a number of extraction-chromatographic methods for determining trace amounts of organic substances of various classes in a number of objects. The following groups of methods for the chromatographic determination of organic substances have been developed and tested: organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human breast milk and fat matrices; characteristic and foreign components of alcoholic products to establish the fact of its falsification; pesticides of various classes in agricultural products and environmental objects; narcotic and psychotropic substances and poisons of plant, fungal and synthetic origin in various objects, etc.

РАЗРАБОТКА ЭКСТРАКЦИОННОЙ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ ЖХ-МС ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМАНИТИНОВЫХ И ФАЛЛОИДИНОВЫХ ТОКСИНОВ В ГРИБАХ И МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

Заяц М.Ф.¹, Лещев С.М.¹, Походня Ю.Г.², Агабалаев А.А.³, Шагойко П.Г.², Юрченко Р.А.¹

¹Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Беларусь, mikhail_zayats@tut.by, leshev.sergey54@gmail.com, yurchenko@aipsin.com

²Национальная антидопинговая лаборатория, агрогородок Лесной, 31, 223040, Минский р-н, Беларусь, director@antidoping.by, pavel11sg@gmail.com

³РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», Лаборатория фармакопейного и фармацевтического анализа, пр-т Дзержинского, 83, корпус 15, 220045, Минск, Беларусь, alexandrmailbox@inbox.ru

Введение. Дикорастущие грибы широко используются в пищевом рационе населения. Однако существует много несъедобных грибов, которые являются чрезвычайно опасными и могут быть по ошибке приняты за съедобные. Употребление их в пищу приводит к серьезным пищевым отравлениям [1].

Наибольшую сложность представляют интоксикации, вызванные аматоксинами и фаллотоксинами, содержащимися в грибах рода *Amanita*, которые могут приводить к необходимости трансплантации печени или даже к фатальным последствиям. Одним из самых



известных представителей грибов рода *Amanita* является *Amanita phalloides* или бледная поганка [1]. Ограниченные временные рамки при токсических состояниях, вызванных употреблением грибов, осложняют диагностику пациентов, находящихся в зоне риска летальной токсичности. Идентификация отравлений аманитинами осложняется задержкой в проявлении симптомов и трудностями, связанными с идентификацией грибов [1,2].

Известно, что после употребления ядовитого гриба концентрации аматоксинов в моче гораздо выше, чем в сыворотке. Мониторинг концентраций токсина в моче возможен в течение первых 8 часов и последующих 3-4 дней после [2].

Таким образом, актуальным представляется быстрое и надежное выявление токсинов непосредственно в грибах и в биологических жидкостях человека при проведении клинико-лабораторной диагностики для возможности принятия своевременных решений по сохранению здоровья и назначению лечения.

Наибольшее распространение при определении грибных токсинов получил метод жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием ЖХ-МС благодаря высокой селективности чувствительностью и экспрессности метода [1,3,4].

Моча и грибы представляют собой довольно сложные объекты для исследования. Моча содержит множество солей органической и неорганической природы, мочевины, продукты метаболизма и др. Грибы содержат огромное количество веществ самой разной природы и строения: полисахариды, белки, алкалоиды, липиды, полифосфаты и другие органические соединения. Эти матричные соединения не только оказывают заметное мешающее влияние на регистрируемые сигналы аналитов, но и могут осаждаться в капиллярах, колонке, детекторе хроматографа, приводя к загрязнению, повышенному износу и сокращению срока службы дорогостоящих узлов оборудования.

Учитывая актуальность описанных проблем, **целью** данной работы являлась разработка методики экстракционной пробоподготовки для последующего определения аманитиновых и фаллоидиновых токсинов в грибах рода *Amanita*, а также в моче человека с использованием жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Методы исследования. ЖХ-МС анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Surveyor Plus с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» (HPLC-MS) TSQ Quantum Access (Thermo Fisher Scientific, США), а также на ультраэффективном жидкостном хроматографе Dionex Ultimate 3000 с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения типа «квадруполь – орбитальная ловушка» (UPLC-HRMS) Q-Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, США).

Разделение веществ осуществляли на хроматографической колонке длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм с нанесенной неподвижной фазой Hypersyl BDS толщиной 3 мкм (Thermo Fisher Scientific, США) в случае HPLC-MS и на хроматографической колонке длиной 30 мм, внутренним диаметром 2,1 мм с нанесенной неподвижной фазой Kinetex C18 толщиной 1,7 мкм (Phenomenex, США) в случае UPLC-HRMS.

Разделение выполняли в режиме градиентного изменения состава подвижной фазы от 10мМ водного раствора ацетата аммония с 0,1% муравьиной кислотой до 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Стоит отметить, что из-за близких времен удерживания и малого различия m/z ионов-прекурсоров и ионов-продуктов дочерних ионов раздельное определение α - и β -аманитина достигалось только в случае их определения методом UPLC-HRMS.

В качестве внутреннего стандарта использовали азитромицин.

В данной работе разрабатывались методики пробоподготовки, основанные на жидкостной экстракции, одном из наиболее простых, эффективных и недорогих методов. Для определения оптимальных условий проведения экстракционной пробоподготовки свою целесообразность продемонстрировал подход, заключающийся в первоначальном нахождении констант



распределения аналитов и последующем их использовании для выбора наиболее эффективной экстракционной системы [5].

Результаты и их обсуждение. В табл. приведены полученные значения логарифмов констант распределения 4 исследованных токсинов грибов в экстракционных системах бутанол – вода и водные растворы сульфата аммония и гидрофосфата калия.

Таблица. Логарифмы констант распределения α -аманитина, β -аманитина, фаллоидина и фаллоцидина в исследованных экстракционных системах, $n = 3$, ОСКО (P) $\leq 25\%$

	Полярная фаза	lgP			
		α -аманитин	β -аманитин	фаллоидин	фаллоцидин
	Вода	-0,3	-0,7	0,1	-0,9
$C_{(NH_4)_2SO_4}$	1 М	0,3	0,3	0,7	0,5
	2 М	1,4	1,5	1,6	1,4
	3 М	1,9	2,0	2,1	2,0
	4 М	2,4	2,5	2,4	2,4
$C_{K_2HPO_4}$	1 М	0,8	0,8	1,4	0,9
	2 М	2,0	1,9	1,6	1,5
	3 М	2,6	2,4	1,6	1,7
	4 М	2,3	2,3	1,8	1,8

Из таблицы видно, что высокая гидрофильность изученных токсинов препятствует эффективному их извлечению из водных растворов даже экстракцией таким активным экстрагентом как бутанол. Добавка сульфата аммония и гидрофосфата калия к воде приводит к заметному росту констант распределения изученных токсинов – на 2–3 логарифмические единицы и более. При этом логарифмы констант распределения становятся существенно больше единицы, что позволяет их количественно ($>95\%$) извлекать путем однократной экстракции с возможностью одновременного концентрирования (при $lgP > 1,3$).

Замена бутанола на изопропанол несколько увеличивает константы распределения токсинов, однако использовать этот экстрагент неудобно, поскольку при низкой концентрации соли в водной фазе существенно изменяются соотношения объемов экстракционных фаз – вплоть до 1,5-2 раз и более.

Стоит отметить, что в слабощелочной среде водных растворов гидрофосфата калия может происходить диссоциация карбоксильных группы, входящих в структуры молекул β -аманитина и фаллоцидина, что будет препятствовать их извлечению из водных растворов. В то же время при малых концентрациях соли благодаря достаточно высокой растворимости 1-бутанола в водном растворе диссоциации карбоксильных групп подавляется.

На основании полученных констант распределения были разработаны экстракционные методики пробоподготовки для определения токсинов в моче человека и грибах.

Пробоподготовка мочи заключается в экстракции токсинов бутанолом с использованием высаливания сульфатом аммония, упаривании органического экстракта, перерастворении в подвижной фазе и фильтровании. Использование разработанной методики позволяет определять концентрации токсинов методом UPLC-HRMS на уровне до 1 нг/мл (рисунок).

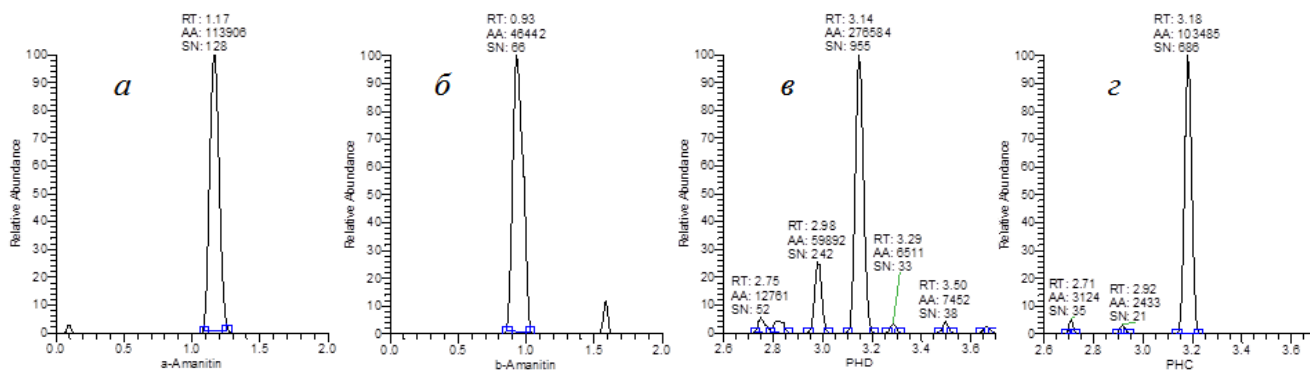


Рисунок. Хроматограммы образца мочи с содержанием α-аманитина (а), β-аманитина (б), фаллоидина (в) и фаллоцидина (з) 1 нг/мл, подготовленного по разработанной методике

Пробоподготовка грибов заключается в их высушивании до постоянной массы при 50°C, замораживании жидким азотом, измельчении, экстракции токсинов одним из трех найденных подходящими для этих целей экстрагентов (смесь H₂O – AcN = 1 – 7, об.; 0,01М раствор HCl), центрифугировании, упаривании органического экстракта (при экстракции смесью H₂O – AcN), очистки экстрактов распределением в системе гексан – вода, экстракции токсинов бутанолом с использованием высаливания сульфатом аммония, упаривании органического экстракта, перерастворении в подвижной фазе и фильтровании. Использование разработанной методики позволяет определять концентрации токсинов методом UPLC-HRMS на уровне до 600 нг/г сухих грибов.

ОСКО определения токсинов составляет порядка 25%.

Закключение. Таким образом, на основании экспериментально определенных констант распределения грибных токсинов в системах «водные растворы сульфата аммония и гидрофосфата калия – 1-бутанол и 2-пропанол» были разработаны методики экстракционной пробоподготовки для последующего определения аманитиновых (α-аманитина, β-аманитина) и фаллоидиновых (фаллоидина и фаллоцидина) токсинов в грибах и моче человека методом ЖХ-МС. Методики позволяет определять токсины с ПКО = 1 нг/мл в моче и 600 нг/г в сухих грибах, ОСКО=25%.

ЛИТЕРАТУРА

- Human Poisoning from Poisonous Higher Fungi: Focus on Analytical Toxicology and Case Reports in Forensic Toxicology / Flament E. [et al.] // Pharmaceuticals. – 2020. – Vol. 13(12). – P. 454.
- Jack H. Wong, T.B. NG. Handbook of Biologically Active Peptides, Toxins from Basidiomycete Fungi (Mushroom): Amatoxins, Phallotoxins, and Virotoxins, Chapter 20, ELSEVIER, 2006. – P. 131-135.
- A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry / Naoki Yoshioka [et al.] // Forensic Toxicol. – 2014. – Vol. 32. – P. 89-96.
- A simple and high-throughput analysis of amatoxins and phallotoxins in human plasma, serum and urine using UPLC-MS/MS combined with PRiME HLB μElution platform / Zhang S. [et al.] // Toxins (Basel). – 2016. – Vol. 8(5). – Art. 128.
- Заяц М.Ф. Новые подходы в применении экстракции при определении микроколичеств пестицидов в сельскохозяйственной продукции и объектах окружающей среды хроматографическими методами / М.Ф. Заяц. – Минск: БГУ, 2019. – 355 с.



DEVELOPMENT OF THE EXTRACTION TECHNIQUE OF SAMPLE PREPARATION FOR LC-MS DETERMINATION OF AMANITIN AND PHALLOIDIN TOXINS IN FUNGI AND HUMAN URINE

Zayats M.F.¹, Leshchev S.M.¹, Pakhadnia Yu.G.², Ahabalaye A.A.³, Shahoika P.G.², Yurchenko R.A.¹

¹Belarusian State University, 4, Nezavisimosti Avenue, Minsk, 220030 Belarus, mikhail_zayats@tut.by, leshev.sergey54@gmail.com, yurchenko@aipsin.com

²National Anti-Doping Laboratory, 223040 Belarus, Minsk region, ag. Lesnoy, 31, director@antidoping.by, pavel11sg@gmail.com

³RUE «Center for Examinations and Tests in Health Service», Laboratory of Pharmacopoeial and Pharmaceutical Analysis, 83 block 15, 7th floor, Dzerzhinsky Avenue, Minsk, 220045 Belarus, alexandrmailbox@inbox.ru

At 20±1°C, the extraction of amanitin (α -amanitin, β -amanitin) and phalloidin (phalloidin and phalloctidin) toxins with butanol from water and with butanol and isopropanol from aqueous solutions of ammonium sulfate and potassium hydrogen phosphate was studied. On the basis of the obtained experimental data, the distribution constants of toxins were calculated, which were used to develop a technique for extraction sample preparation in the process of determining toxins in fungal material and human urine. It has been shown that for the extraction of amanitin and phalloidin toxins from various objects with a high water content, it is advisable to use extraction with butanol using salting out with ammonium sulfate up to saturated solutions.

Extraction techniques have been developed for sample preparation of fungal material and human urine for the subsequent determination of toxins in them by liquid chromatography with mass spectrometric detectors such as "triple quadrupole" and "quadrupole – orbital trap". The technique for the determination of toxins in urine is characterized by a limit of quantification LOQ of about 1 ng/ml of urine. The technique for the determination of toxins in mushroom material – 600 ng / 1 g of dry mushrooms. The relative standard deviation RSD of the determination of toxins is about 10-15%.

Keywords: α -amanitine, β -amanitine, phalloidin, phalloctidin, death cap, toxins, liquid chromatography, mass-spectrometry, extraction, distribution constants.

ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО СРЕДСТВА

Игнатовец О.С., Леонтьев В.Н., Феськова Е.В., Адамцевич Н.Ю., Страх Я.Л., Чернецкая Ю.Г.
Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»,
220006, Минск, Свердлова, 13а, Ignatovets@belstu.by

Одним из наиболее многочисленных классов биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения являются фенольные соединения, которые обладают широким спектром биологической активности [1]. Принимая во внимание сведения о действии флавоноидов на многочисленные биохимические процессы, их низкой токсичности и учитывая заинтересованность отечественных фармацевтических предприятий в расширении ассортимента фитопрепаратов с различным биологическим действием с высокой конкурентоспособностью, есть основания рассматривать данный класс БАВ в качестве веществ, наиболее перспективных для создания высокоэффективных полифункциональных лекарственных препаратов. Для рынка лекарственных трав и сборов Республики Беларусь характерна стабильность, однако его объем и доля в общем объеме рынка фармпрепаратов на сегодняшний день скромна (около 2%). Ассортимент ранозаживляющих средств представлен в основном синтетическими препаратами. В связи с вышеизложенным, актуальным направлением исследований является поиск лекарственных растений с высоким содержанием



фенольных соединений и флавоноидов для разработки фитопрепаратов с ранозаживляющей активностью. Данную задачу можно решить за счет привлечения растительного сырья из Республики Узбекистан, обладающего высоким содержанием и широким спектром БАВ.

Объектами исследования являлись лекарственные растения, произрастающие в Республике Узбекистан (Ташкентская область, Паркентский район): душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.), шалфей мускатный (*Salvia sclarea* L.), зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.), бессмертник песчаный (*Helichrysum arenarium* L.), череда трехраздельная (*Bidens tripartita* L.), сенна александрийская (*Senna alexandrina* Mill.).

На первом этапе исследований проводили определение содержания фенольных соединений и флавоноидов в экстрактах лекарственных растений. Экстракцию исследуемых видов растительного сырья проводили следующим образом: 1 г навески измельченной массы растения смешивали с 30 мл 50% этилового спирта и экстрагировали при температуре 70°C в течение 30 мин, затем полученные вытяжки фильтровали и определяли содержание фенольных соединений методом Фолина и Чокальтеу в модификации Синглтона и Росси. Содержание флавоноидов в экстрактах оценивали спектрофотометрическим методом по реакции с хлоридом алюминия.

Наибольшее количество фенольных соединений наблюдалось в экстракте травы шалфея мускатного – $34,74 \pm 1,12$ мг-экв галловой к-ты / г а. с. с. и травы зверобоя продырявленного – $28,64 \pm 1,07$ мг-экв галловой к-ты / г а. с. с. Наибольшее содержание флавоноидов выявлено в цветках бессмертника песчаного – $83,75 \pm 1,65$ мг-экв рутина / г а. с. с. Для сравнения, в цветках бессмертника песчаного из коллекции ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», установлено содержание флавоноидов на уровне 61,60 мг / г а. с. с. [2]. Полученные значения свидетельствуют о достаточно высоком содержании БАВ в образцах лекарственных растений Республики Узбекистан по сравнению с белорусскими представителями, что подтверждает перспективность данного типа сырья для разработки фитопрепаратов.

На дальнейшем этапе НИР проводили отбор растений по наличию в составе водно-спиртовых экстрактов кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида и изокверцитрина (ключевых флавоноидов, способствующих регенерации кожных покровов) [3]. С целью первичного качественного обнаружения флавоноидов в растительном материале широко используется метод ТСХ. Это связано с таким неоспоримым его преимуществом, как простота и легкость проведения эксперимента, низкая стоимость оборудования.

Для определения качественного состава флавоноидов методом ТСХ экстракты упаривали на ротаторном испарителе. В качестве подвижной фазы использовали систему растворителей этилацетат : муравьиная кислота : вода (70 : 10 : 20). Растворы экстрактов с концентрацией 5 мг/мл наносили на пластинки в виде пятен диаметром 3–4 мм, которые проявляли в УФ-камере при длине волны 365 нм. Для качественного определения флавоноидов в экстрактах лекарственных растений применяли стандартные растворы кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида (Sigma, Франция) и изокверцитрина (Sigma, Германия). Идентификацию веществ на хроматограммах осуществляли по характерному цвету зон и величинам R_f . При проявлении хроматограмм в УФ свете в образцах наблюдались зоны с желтой и желто-зеленой флуоресценцией, характерной для флаванолов; желто-коричневой – для флавонов, флаванол-3-гликозидов, флаванолов и халконов; голубой и фиолетовой – для фенольных кислот; ксантоны проявляются в виде оранжевых пятен; изофлавоны не проявляются. По совпадению окраски и величины $R_f = 0,59$ со стандартным образцом в экстракте цветков бессмертника песчаного идентифицирован кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид. По величине $R_f = 0,43$ и коричневой окраске в экстракте травы зверобоя продырявленного идентифицирован изокверцитрин – ключевой флавоноид, который способствует регенерации поврежденных кожных покровов. В экстрактах шалфея мускатного, душицы обыкновенной, сенны александрийской и череды трехраздельная изокверцитрин и кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид не обнаружены. Таким образом, с помощью ТСХ в экстракте травы зверобоя продырявленного идентифицирован



изокверцитрин, а в экстракте цветков бессмертника песчаного – кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид.

Для подтверждения полученных результатов на следующем этапе НИР проводили анализ растительных экстрактов методом ВЭЖХ-МС. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил : 0,1%-ный водный раствор муравьиной кислоты в соотношении 25 : 75 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин. Регистрацию хроматографического разделения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200–790 нм и масс-детектора с электроспрей-ионизацией. Регистрацию масс-спектров осуществляли в области отрицательных и положительных ионов. Параметры масс-спектрометрии в области отрицательных ионов: напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 30 В, напряжение на экстракторе – 4 В; в области положительных ионов – напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 40 В, напряжение на экстракторе – 3 В. Температура десольватации – 400°C, температура источника – 130°C, общий расход инертного газа (азота) – 480 л/час. Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения «Mass Lynx». Идентификацию и количественный анализ флавоноидов проводили с применением стандартных образцов. Результаты хроматографического анализа показали наличие в экстрактах зверобоя продырявленного изокверцитрина, гиперозида и хлорогеновой кислоты. В экстракте бессмертника песчаного идентифицирован кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид.

Таким образом, в ходе выполнения научно-исследовательской работы бессмертник песчаный и зверобой продырявленный отобраны для дальнейших исследований в качестве сырья для разработки ранозаживляющего фитопрепарата. Данная работа выполнена в рамках НИР «Разработка ранозаживляющего средства на основе комплекса флавоноидов растений, произрастающих в Республике Узбекистан» при поддержке БРФФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений / В.А. Куркин [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11. – С. 1897-1901.
2. Выделение флавоноидов из цветков бессмертника песчаного /Н.Ю. Адамцевич [и др.] // Веснік ВДУ. – 2021. – № 4. – С. 23-30.
3. Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides [Electronic resource]. – Mode of access: <https://patentimages.storage.googleapis.com/63/59/5e/174d4cea2e89ad/US20120087980A1.pdf>. – Date of access: 21.12.2021.

SEARCH FOR PROMISING SOURCES OF PLANT RAW MATERIALS FOR THE DEVELOPMENT OF A WOUND-HEALING AGENT

Ignatovets O.S., Leontiev V.N., Feskova A., Adamtsevich N.Yu., Strakh Ya.L., Charnetskaya Yu.
Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus, Ignatovets@belstu.by

The content of biologically active substances (phenolic compounds, flavonoids) in medicinal plants growing in the Republic of Uzbekistan was studied. It has been established that the greatest amount of phenolic compounds is contained in the extracts of clary sage (*Salvia sclarea* L.) and Saint-John's wort (*Hypericum perforatum* L.), flavonoids – in the extract of sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* L.).

Plant extracts were screened for the presence of kaempferol-3-β-D-glucopyranoside and isoquercitrin using thin layer chromatography and HPLC-MS,. It has been established that these flavonoids are contained in sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* L.) and Saint-John's wort (*Hypericum perforatum* L.), respectively.

Sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* L.) and Saint-John's wort (*Hypericum perforatum* L.) were selected for further researches as a raw material for the development of a wound-healing phytopreparations.



ОСВОЕНИЕ ВЫПУСКА ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ – ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Казакевич С.А.¹, Гапанович В.Н.², Воробьев П.В.¹, Андреев С.В.², Хмурович Н.В.²,
Островская И.Л.²

¹РУП «Управляющая компания холдинга «Белфармпром», Республика Беларусь, 220005,
г. Минск, просп. Машерова, 10; office@belpharmprom.by

²РУП «Научно-практический центр ЛОТИОС», Республика Беларусь, 220034,
г. Минск, ул. З. Бядули, 10; lotios@yandex.ru

Фармацевтический рынок является стратегически важным сектором экономики страны, основой безопасности в области лекарственного обеспечения здравоохранения.

Выполнение поставленных Главой государства и Правительством Республики Беларусь комплексных задач по сохранению и улучшению здоровья граждан, как важнейшей составляющей национальной безопасности, требует регулирования обращения лекарственных средств с целью исключения критической зависимости лекарственного обеспечения населения от внешней конъюнктуры рынка.

Научное обеспечение развития фармацевтической промышленности в основном осуществляется в рамках государственных, государственных научно-технических программ, инновационных проектов и инициативных разработок.

Цель исследования. Дать оценку выполнения мероприятий, направленных на развитие импортозамещающих и экспортно-ориентированных производств фармацевтической продукции для полного удовлетворения потребностей организаций здравоохранения и населения в эффективных, безопасных и качественных отечественных лекарственных препаратах (ЛП).

Материалы и методы. Объектом исследования является Государственная программа развития фармацевтической промышленности Республики Беларусь на 2016-2020 годы (Государственная программа) [1] и государственная научно-техническая программа «Разработка фармацевтических субстанций, лекарственных средств и нормативно-правового обеспечения фармацевтической отрасли», 2021-2025 годы (ГНТП) [2, 3], которые направлены на решение следующих задач:

- расширение номенклатуры выпускаемых ЛП и фармацевтических субстанций (ФС), интенсификация развития фармацевтической промышленности путем ввода в эксплуатацию новых, а также модернизации и укрепления материально-технической базы существующих производств;

- приведение нормативной правовой базы в области разработки, производства и контроля качества ЛП и ФС, доклинических и клинических испытаний в соответствие с современными мировыми требованиями, включая требования, принятые в Европейском союзе, а также предусмотренные соглашениями Евразийского экономического союза (ЕАЭС).

Результаты. Для решения поставленных задач Государственной программы была определена ее структура и установлены сводные целевые и целевые показатели. В структуру Государственной программы входили две подпрограммы: подпрограмма 1 «Разработка и производство новых лекарственных средств», которая включала два раздела – раздел 1 «Разработка лекарственных средств и фармацевтических субстанций» и раздел 2 «Организация производства отечественных фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм»; подпрограмма 2 «Нормативная правовая база».

Подпрограмма 1 (раздел 1) и подпрограмма 2 являлись научным обеспечением Государственной программы и состояли из комплекса мероприятий, направленных на разработку и освоение выпуска ЛП, ФС, а также совершенствование нормативной правовой базы Республики Беларусь в данной области.



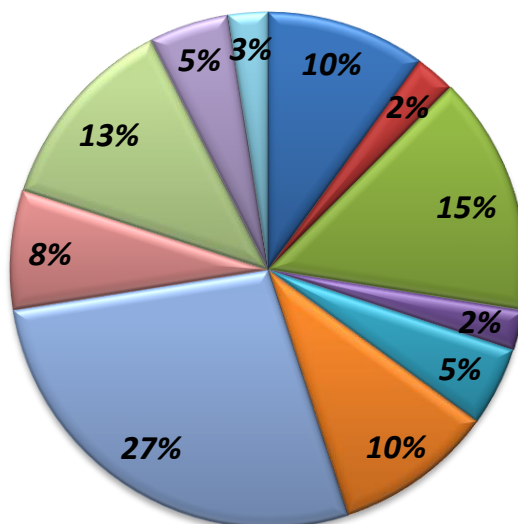
Реализация мероприятий научного обеспечения Государственной программы осуществлялась научными организациями разной ведомственной подчиненности и отраслевой направленности.

Основными исполнителями выступали научные организации Министерства здравоохранения Республики Беларусь (республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр ЛОТИОС», РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий), Министерства образования Республики Беларусь (НИИ ФХП БГУ), Национальной академии наук Беларуси (Институт биоорганической химии - НПЦ «ХимФармСинтез», государственное предприятие «АКАДЕМФАРМ»), имеющие опыт разработки ЛП и ФС. Научное обеспечение развития фармацевтической промышленности и внедрение в производство новых ЛП обеспечивают также фармацевтические предприятия различных форм собственности (ОАО «БЗМП», РУП «Белмедпрепараты», УП «Минскинтеркапс», ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов», СП ООО «Фармлэнд», СОАО «Ферейн», СООО «Лекфарм», СООО «НАТИВИТА», УП «Унитехпром БГУ»), некоторые из которых аккредитованы в Государственном комитете по науке и технологиям Республики Беларусь и Национальной академии наук Беларуси в качестве научных организаций. Предприятия располагают собственным современным производством ЛП по полному технологическому циклу: от контроля поступающего сырья до выпуска готовой продукции в потребительской упаковке. Производственные участки сертифицированы на соответствие требованиям Надлежащей производственной практики (GMP).

За период 2016-2020 гг. в результате реализации комплекса мероприятий подпрограммы 1 «Разработка и производство новых лекарственных средств» зарегистрировано 45 наименований новых видов фармацевтической продукции, из них: 5 ФС и 40 ЛП (52 – с учетом дозировки) разных фармакотерапевтических групп:

Классификация лекарственных средств (АТХ)

- А Пищеварительный тракт и обмен веществ
- В Кровь и кроветворные органы
- С Сердечно-сосудистая система
- D Дерматологические средства
- G Мочеполовая система и половые гормоны
- J антиинфекционные средства для системного применения
- L Противоопухолевые и иммуномодулирующие средства
- M Костномышечная система
- N Нервная система
- P Противопаразитарные средства
- R Дыхательная система



Как видно из диаграммы, зарегистрированные в рамках Государственной программы ЛП охватывают 11 из 14 кодов анатомо-терапевтико-химической классификации (АТХ). Больше всего зарегистрировано противоопухолевых препаратов – 27%, для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы – 15%, для лечения заболеваний нервной системы – 13% и т.д.



В период реализации Государственной программы фармацевтическими предприятиями осуществлена техническая подготовка существующих производств, освоены технологии получения и внедрены в производство 37 наименований ЛП и 6 ФС.

Объем выпущенной фармацевтической продукции в 2016-2020 гг., освоенной в рамках Государственной программы, составил 33,51 млн руб. (16,03 млн долл. США). Объем реализованной продукции – 25,54 млн руб. (12,13 млн долл. США), в том числе:

реализовано в Республике Беларусь (импортозамещение) – 23,95 млн руб. (11,47 млн долл. США);

поставлено на экспорт – 1,59 млн руб. (0,66 млн долл. США).

Страны экспорта – Армения, Венесуэла, Грузия, Ирак, Казахстан, Кыргызстан, Литва, Молдова, Российская Федерация, Узбекистан.

В ходе реализации комплекса мероприятий по подпрограмме 2 Государственной программы разработаны 25 технических кодексов установившейся практики серии «Производство лекарственных средств» (утверждены приказами Министерства здравоохранения

Республики Беларусь); 6 методик выполнения измерений концентраций ФС в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе; 6 гигиенических нормативов предельно допустимых концентраций в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе; 1 инструкция по применению «Расчетно-аналитический метод установления гигиенических нормативов и классов опасности лекарственных средств в атмосферном воздухе» и 13 нормативно-правовых документов для принятия в рамках ЕАЭС.

По сводным целевым показателям зафиксированы следующие результаты: доля отечественных ЛП на внутреннем рынке в стоимостном выражении составила 51,4%; удельный вес экспорта ЛП в общем объеме производства ЛП – 28,6%.

В настоящее время Государственная программа трансформирована в ГНТП [2,3], в рамках которой прогнозируется зарегистрировать и освоить в производстве 16 ЛП и 2 ФС (в 2021 году зарегистрировано 2 ЛП).

Заключение. Государственная программа развития фармацевтической промышленности Республики Беларусь на 2016-2020 годы успешно реализована.

Необходимо отметить, что освоенные за данный период ЛП не имеют аналогов отечественного производства, по составу, спектру фармакологического действия не уступают лучшим зарубежным аналогам из данного класса препаратов. Стоимость ЛП, как правило, ниже закупаемых по импорту.

Таким образом, совместными усилиями Министерства здравоохранения Республики Беларусь, республиканского унитарного предприятия «Управляющая компания холдинга «Белфармпром», научными организациями, фармацевтическими предприятиями в течение последнего десятилетия заложен надежный фундамент для дальнейшего развития отечественной фармацевтической промышленности и выполнения поставленных Главой государства и Правительством Республики Беларусь комплексных задач по сохранению и улучшению здоровья граждан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 28 декабря 2015 г. № 1096 «Об утверждении Государственной программы развития фармацевтической промышленности Республики Беларусь» на 2016-2020 годы» (Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь, 31 декабря 2015 г., № 5/41507).
2. Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 26 марта 2021 г. № 173 «О перечнях государственных и региональных научно-технических программ на 2021-2025 годы» (Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь, 27 апреля 2021 г., № 5/49017).



3. Приказ Государственного Комитета по науке и технологиям Республики Беларусь от 30 июня 2021 г. № 181 «Об утверждении ГНТП «Разработка фармацевтических субстанций, лекарственных средств и нормативно-правового обеспечения фармацевтической отрасли», 2021-2025 годы и составов работ 2021 года по заданиям подпрограмм».

PRODUCTION OF DOMESTIC DRUGS – ENSURING THE DRUG SAFETY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

Kazakevich S.A.¹, Gapanovich V.N.², Vorobyev P.V.¹, Andreyev S.V.², Hmurovich N.V.², Ostrovskaya I.L.²

¹RUE «Management Company of the holding «Belpharmprom», Republic of Belarus, 220005, Minsk, ave. Masheroval, 10, office@belpharmprom.by

²RUE «Scientific and Practical Center LOTIOS», Republic of Belarus, 220034, Minsk, Z. Byaduli str., 10; lotios@yandex.ru

The State program for the development of the pharmaceutical industry of the Republic of Belarus for 2016-2020 has been successfully implemented.

It should be noted that the drugs mastered during this period have no analogues of domestic production, in composition, spectrum of pharmacological action, are not inferior to the best foreign analogues from this class of drugs. The cost of medications, as a rule, is lower than those purchased by import.

Thus, the joint efforts of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, the republican unitary enterprise «Management Company of the holding «Belpharmprom», scientific organizations, pharmaceutical enterprises over the past decade have laid a solid foundation for the further development of the domestic pharmaceutical industry and the fulfillment of the complex tasks set by the Head of State and the Government of the Republic of Belarus to preserve and improve the health of citizens.

БИОЭКВИВАЛЕНТНОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ФЛУТРИКСАН И НЕКСАВАР

Калиниченко Е.Н.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, kalinichenko@iboch.by

Открытое рандомизированное перекрестное с репликативным дизайном (3 периода, 3 последовательности) биоэквивалентное исследование было проведено с целью оценки сравнительной биодоступности сорафенибсодержащих лекарственных средств Флутриксан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 200 мг, производства Института биоорганической химии НАН Беларуси (Республика Беларусь) и Нексавар, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 200 мг, производства Bayer Pharma AG (Германия) в условиях однократного приема дозы натошак у здоровых добровольцев.

Показано, что для сравниваемых лекарственных средств выполняются все критерии, использованные для установления их биоэквивалентности. Отношения геометрических средних исследуемых фармакокинетических параметров $AUC_{0-72, T} / AUC_{0-72, R}$ и $C_{max, T} / C_{max, R}$ и соответствующие 90%-е доверительные интервалы укладываются в допустимые границы интервала приемлемости (80,00–125,00%). Оба лекарственных средства хорошо переносятся и имеют приемлемый профиль безопасности. С учетом этих данных можно заключить, что воспроизведенный лекарственный препарат Флутриксан биоэквивалентен оригинальному лекарственному препарату Нексавар.

BIOEQUIVALENT CLINICAL TRIAL OF DRUGS FLUTRIXAN AND NEXAVAR

Kalinichenko E.N.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus 5/2, kalinichenko@iboch.by*

A replicate designed open-label, randomized, crossover single-dose bioequivalence study using three periods and three sequences was conducted to assess the comparative bioavailability of sorafenib formulations Flutrixan 200 mg tablet, Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus (Belarus), and Nexavar 200 mg tablet, Bayer Pharma AG (Germany), in healthy volunteers under fasting conditions.

It has been shown that all criteria used to assess bioequivalence of compared medicinal products were fulfilled. The Test/Reference geometric mean ratios obtained for the pharmacokinetic parameters $C_{\max}$ and AUC_{0-72} and corresponding 90% confidence intervals were all within the acceptance range of 80.00–125.00%. Both sorafenib formulations were well tolerated and had a favorable safety profile. Therefore, it can be concluded that the generic medicinal product Flutrixan is bioequivalent to the reference medicinal product Nexavar.

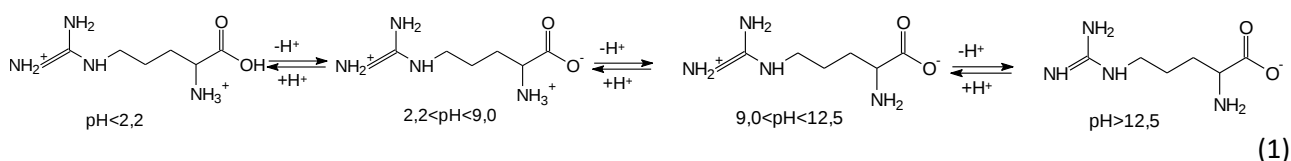
ПРОИЗВОДНЫЕ L-АРГИНИНА С ПОТЕНЦИАЛОМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Каранкевич Е.Г., Маркович М.М., Сивчик В.В., Каминская В.В., Куваева З.И.

*Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220072, ул. Сурганова, 13; extract@ifoch.bas-net.by*

Аминокислота аргинин играет важную биологическую роль во многих физиологических и патофизиологических процессах организма человека. Аргинин обладает доказанным терапевтическим действием у пациентов с различным кардиоваскулярным риском или верифицированным сердечно-сосудистым заболеванием, риском развития васкулярных осложнений сахарного диабета. Недостаток аргинина в организме увеличивает невосприимчивость тканей к инсулину. В ряде исследований было установлено, что дефицит аргинина замедляет рост организма, поскольку он стимулирует продукцию соматотропного гормона, что также оказывает влияние на редуцирование симптомов депрессии, стимулирует память, активность, внимание. Аргинин усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов, улучшая функции эритроцитов, усиливает продукцию интерлейкина-2, имеет высокую рецепторную активность, что положительно влияет на иммунную систему. Прием аргинина способствует ускорению заживления ран, травм сухожилий, восстановлению костной ткани, снижает артрозные изменения [1].

L-аргинин (Arg), α -амино- δ -гуанидино-валериановая кислота, является условно незаменимой аминокислотой. Уникальное строение молекулы аргинина, имеющей гуанидиновую, amino- и карбоксильную группы, а также возможность существовать в зависимости от pH среды в виде одно-, двузарядного катиона, аниона или цвиттер-иона (1), указывает на ее перспективность для получения функциональных производных, обладающих фармакологическим действием. Задачей данного исследования было получение производных аргинина, которые могут быть потенциально использованы в качестве субстанций лекарственных препаратов.



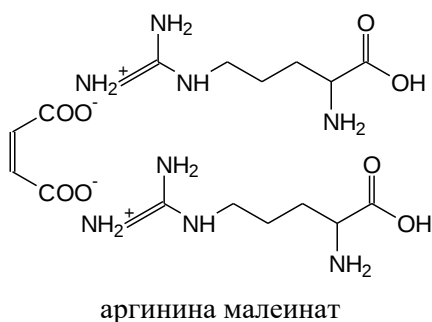
В организме метаболизм аргинина протекает в основном двумя путями: окисным (NO-синтазным); неокисным (аргиназным). В случае NO-синтазного пути метаболизма, аргинин является источником оксида азота (NO), сильного вазодилатора, обеспечивающего физиологический кровоток и его адаптацию к воздействию нагрузок.

Усиление и расширение фармакологических свойств Arg возможно при получении различных функциональных производных. Учитывая существенную роль янтарной кислоты в функционировании сердечно-сосудистой и дыхательной системы за счет участия в цикле Кребса, целесообразным было получение производного на основе аргинина и янтарной кислоты. В Институте физико-органической химии был разработан способ получения ди-L-аргинина сукцината [2], что позволило получить соль, сочетающую фармакологические эффекты янтарной кислоты и аргинина. В настоящее время ди-L-аргинина сукцинат используется в качестве субстанции лекарственного препарата Инокардин (РУП «Белмедпрепараты»), проявляющего антиишемическое и кардиопротекторное действие.

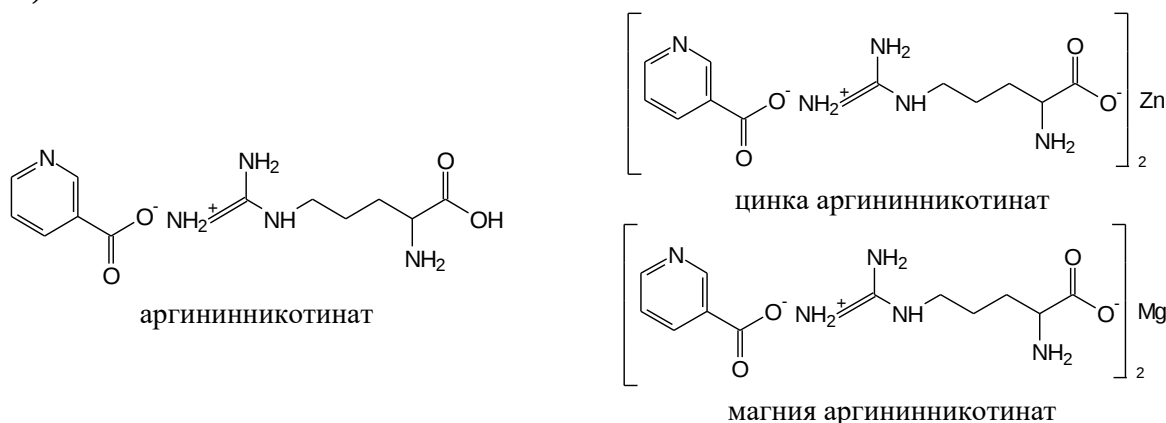


Ввиду того, что ионы калия играют важную роль в функционировании сердечно-сосудистой системы и организма в целом, нами были разработаны пути получения калиевой соли аргинина сукцината. Двухстадийный процесс получения, включающий синтез на первой стадии однозамещенного аргинина сукцината и последующее получение его калиевой соли, позволил получить продукт высокой степени чистоты >99,5% и выходом 88,9%. В случае с получением на первой стадии процесса монокалийевой соли янтарной кислоты, а затем синтеза калий аргинина сукцината был получен продукт >98,6% с выходом 81,0%. Спектроскопические характеристики (ИК, ЯМР) продуктов идентичны, данные элементного анализа подтверждают предполагаемую структуру соединения.

Биологическая активность аргинина и его производных находится в зависимости от их способности проникать через клеточные мембраны. В норме концентрация Arg в плазме крови находится в пределах 40-100 мкмоль/л, его биодоступность зависит не только от физических особенностей (возраст, пол, масса тела, питание), но в том числе от коморбидных состояний (воспалительные заболевания кишечника, синдром раздраженного кишечника, мальабсорбция и др.) [4]. Малеиновая кислота облегчает проникновение биологически активных веществ в клетки. С целью увеличения биодоступности и скорости преодоления клеточных барьеров, были разработаны производные: ди-L-аргинина малеинат и калиевая соль аргинина малеината. Структура соединений подтверждена спектроскопически и данными элементного анализа, аналитическая чистота полученных образцов >99,3%, выход продуктов соответствовал 92% и 90%.



Как было указано выше, альтернативный путь метаболизма Arg в организме человека является неокисным и происходит с образованием L-орнитина и мочевины. Иницилируемые в ходе такого пути процессы в организме способствуют увеличению активного деления клеток и росту тканей, ввиду чего аргинин способствует восстановлению соединительных тканей, ускоряет заживление ран [1]. Подобные биологические свойства проявляет и никотиновая кислота, которая, в свою очередь, стимулирует кислородный обмен в тканях, что способствует их восстановлению. С целью усиления репаративных свойств аргинина нами была синтезирована соль аргинина с никотиновой кислотой. Получено устойчивое соединение фармакопейной степени чистоты > 99% и выходом 94,9%, ИК-спектральные характеристики продукта и ЯМР-спектр, подтверждающие предполагаемое строение аргининникотината (ArgNic).



Учитывая, что микроэлемент цинк принимает активное участие в репарации тканей, способствует заживлению язв, нормализует иммунную систему организма, нами была получена цинковая соль аргининникотината. С использованием аналитических методов (комплексометрическое, потенциометрическое титрование, количественный атомно-эмиссионный анализ, элементный анализ) был установлен состав полученного продукта (мас.%): $92,64 \pm 0,32\%$ $\text{Zn}(\text{ArgNic})_2$ и $7,36 \pm 0,32\%$ ArgNic.

Следует учитывать, что никотиновая кислота, подобно аргинину, принимает также активное участие в деятельности сердечно-сосудистой системы, ее применение способствует расширению сосудов, облегчая циркуляцию крови. В плане расширения фармакологического действия аргининникотината, нами была получена его магниевая соль. Известно, что магний в качестве эссенциального элемента препятствует развитию патологических процессов в сердечно-сосудистой системе, стабилизирует ее работу. Полученный продукт охарактеризован ИК-, ЯМР-спектрами, проведен количественный и качественный аналитический анализ. Состав магний аргининникотината (мас.%): $85,12 \pm 0,42\%$ $\text{Mg}(\text{ArgNic})_2$ и $14,88 \pm 0,42\%$ ArgNic.

Таким образом, был получен ряд производных аргинина, имеющих потенциал терапевтической активности. Полученные производные аргинина могут быть использованы в качестве субстанций лекарственных препаратов различных фармакотерапевтических групп.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аргинин в медицинской практике (обзор литературы) / Степанов Ю.М. [и др.] // Журнал АМН Украины. – 2004. – Т.10, №1. – С. 340-352.
2. Синтез и кардиопротекторная эффективность аргинина сукцината / Лопатик Д.В. [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 2. – С. 181–186.
3. Получение соли аргинина сукцината / Каранкевич Е.Г. [и др.] // Сборник тезисов докладов. I Международной научно-практической конференции Importance of Soft Skills for Life and Scientific Success: Март 1-2, 2022. Днепро, Украина. Р. 124.



4. The effects on plasma L-arginine levels of combined oral L-citrulline and L-arginine supplementation in healthy males / Suzuki T. [et al.] / Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2017. – Vol. 81(2). – P. 372-375.

DERIVATIVES OF L-ARGININE WITH POTENTIAL THERAPEUTIC ACTION

Karankevich E.G., Markovich M.M., Sivchik V.V., Kaminskaya V.V., Kuvaeva Z.I.

*Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
extract@ifoch.bas-net.by*

Methods have been developed for obtaining a number of pharmaceutical grade L-arginine derivatives, including arginine derivatives with succinic, maleic, nicotinic acids, as well as their derivatives in the form of potassium, magnesium and zinc salts. The obtained arginine derivatives can be used as substances of drugs of various pharmacotherapeutic groups.

DE NOVO ДИЗАЙН ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ BCR-ABL ТИРОЗИНКИНАЗЫ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Карпенко А.Д.¹, Войтко Т.Д.², Тузиков А.В.¹, Андрианов А.М.³

¹*Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, 220012, ул. Сурганова 6,
г. Минск, Республика Беларусь, rfe.karpenko@gmail.com*

²*Белорусский государственный университет, проспект Независимости 4, 220030,
г. Минск, Республика Беларусь, timvaitko@gmail.com*

³*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, alexande.andriano@yandex.ru*

Резюме. Разработана генеративная нейронная сеть глубокого обучения для компьютерного *de novo* дизайна потенциальных ингибиторов Bcr-Abl тирозинкиназы – фермента, активность которого является патофизиологической причиной хронического миелоидного лейкоза. Проведено обучение и тестирование нейронной сети на наборе химических соединений, которые содержат 2-ариламинопиримидиновый фрагмент, присутствующий в качестве основного фармакофора в структурах многих низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ. Показано, что разработанная нейронная сеть позволяет генерировать новые химические соединения с заданной биологической активностью против Bcr-Abl тирозинкиназы и ее мутантной формы Bcr-Abl^{T315I}.

Ключевые слова. Методы машинного обучения, глубокое обучение, генеративные нейронные сети, гетерознкодеры, BCR-ABL тирозинкиназа, виртуальный скрининг, молекулярный докинг, противоопухолевые препараты, хронический миелоидный лейкоз.

Введение. В настоящее время методы машинного обучения получили существенное развитие и используются для решения многих задач, связанных с разными областями науки и техники. Применение этих методов в био- и хемоинформатике, а также в медицинской химии позволило ускорить процесс создания новых лекарственных препаратов и повысить эффективность программ фармацевтических исследований [1]. Разработка эффективных алгоритмов глубокого обучения дала толчок к развитию нового направления исследований, ориентированного на генерацию молекул с заданными фармакологическими свойствами [1]. На сегодняшний день предложено большое число генеративных моделей глубокого обучения с разными видами архитектур и типами входных данных. Однако их потенциал все ещё очень велик и его дальнейшее использование представляет большой научный и практический интерес.

Исследования фундаментальных молекулярных механизмов, лежащих в основе передачи сигналов опухолевых клеток, выяснили решающую роль протеинкиназ в канцерогенезе, поскольку в тех случаях, когда эти ферменты чрезмерно экспрессированы или



активны, они способствуют пролиферации клеток [2]. Исследования мутаций генома киназ показали, что генетически наследуемые варианты специфических киназ причинно связаны с возникновением, развитием, прогрессированием и рецидивом рака [2]. В связи с этим актуальным является поиск новых эффективных ингибиторов протеинкиназ, снижающих риск возможного возникновения резистентности к используемым препаратам и обладающих приемлемой токсичностью.

Цель исследования: Разработать и применить генеративную модель гетероэнкодера [3] для конструирования новых потенциальных ингибиторов Bcr-Abl киназы и ее мутантной формы Bcr-Abl^{T315I}, резистентной к ряду противоопухолевых препаратов, используемых в клинической практике для терапии ХМЛ [2].

Задачи исследования:

1) разработка архитектуры гетероэнкодера; 2) формирование обучающей библиотеки малых молекул, содержащих 2-ариламинопиримидиновый компонент, присутствующий в качестве основного фармакофора в структурах многих низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ; 3) обучение и тестирование нейронной сети на наборе соединений из сформированной молекулярной библиотеки; 4) *de novo* дизайн потенциальных ингибиторов Bcr-Abl тирозинкиназы и предсказание их ингибиторной активности методами молекулярного докинга.

Методология исследования. Разработанная нейронная сеть базируется на классической архитектуре гетероэнкодера – автоэнкодера, предназначенного для решения задач, в которых входные данные представлены в нескольких разных форматах [3]. В настоящей работе нами реализована архитектура модели гетероэнкодера с тремя энкодерами и двумя декодерами, которая использует открытую библиотеку Keras (<https://keras.io>), обеспечивающую работу с искусственными нейронными сетями. В этой модели входные данные задаются в форматах SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System), канонический SMILES и вектора характеристик молекулы. С учетом специфики входных данных были разработаны две подмодели: в качестве энкодеров для SMILES-формата и канонического SMILES была выбрана архитектура, состоящая из двух слоев LSTM (Long Short-Term Memory). Входные данные обрабатываются двумя слоями LSTM, и полученные эмбединги для строкового формата передаются на полносвязный слой нейронной сети. Числовые характеристики молекул обрабатываются полносвязной нейронной сетью прямого распространения, состоящей из двух полносвязных слоев, слоя батч-нормализации и дополнительного полносвязного слоя, результаты работы которого являются эмбедингами для числовых признаков. Эти эмбединги попадают на конкатенирующий слой, где образуют один вектор, который нормализуется на слое батч-нормализации и передается на полносвязный слой, после чего задается желаемое значение энергии связывания молекулы с терапевтической мишенью. Результаты работы этого слоя, то есть обработанные эмбединги и величина энергии связывания, образуют латентное пространство. Полученные элементы латентного пространства подаются на декодеры, обрабатываются одним слоем декодера и одним слоем LSTM и поступают на полносвязные слои с функцией активации softmax, которая обрабатывает данные таким образом, чтобы получить на выходе вероятности следующих символов. Для всех остальных полносвязных слоев используется функция активации ReLU, а для слоев LSTM – функция tanh.

Результаты и их обсуждение. Разработанную модель гетероэнкодера использовали для генерации широкого набора высокоаффинных лигандов Bcr-Abl тирозинкиназы с целью последующей идентификации потенциальных ингибиторов этого фермента методами молекулярного докинга. В результате работы гетероэнкодера были получены химические структуры 1 117 молекул, которые очищали от дубликатов, проверяли на валидность, интерпретируемость и содержание 2-ариламинопиримидина с помощью модуля RDKit (<http://www.rdkit.org/>). На заключительном этапе с помощью программы AutoDock Vina



(<https://vina.scripps.edu>) проводили молекулярный докинг 1083 успешно прошедших проверку соединений с рентгеновскими структурами Bcr-Abl тирозинкиназы (PDB ID: 3OXZ; <https://www.rcsb.org>) и ее мутантной формы Bcr-Abl^{T315I} (PDB ID: 3OY3; <https://www.rcsb.org>). Молекулярный докинг проводили в приближении жесткого рецептора и гибких лигандов с помощью программы AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu>). Ячейки для докинга охватывали АТФ-связывающий сайт Bcr-Abl тирозинкиназы. Значение параметра, характеризующего полноту поиска, задавали равным 100. Полученная выборка соединений после их ранжирования по значениям оценочной функции AutoDock Vina составила 569 молекул, проявляющих высокое сродство к АТФ-связывающим сайтам Bcr-Abl тирозинкиназы и ее мутантной формы Bcr-Abl^{T315I}. Согласно данным молекулярного докинга, отобранные соединения имеют низкие значения энергии связывания, варьирующие от –9,0 ккал/моль до –13,8 ккал/моль. С учетом стандартной ошибки программы AutoDock Vina, составляющей 2,9 ккал/моль (<https://vina.scripps.edu>), эти значения сопоставимы с величинами, полученными с помощью идентичного вычислительного протокола для мощного противоопухолевого препарата понатиниба, широко применяемого в клинике для терапии ХМЛ [2].

Заключение. Разработана модель гетероэнкодера на основе рекуррентных и полносвязных нейронных сетей прямого распространения, которая способна генерировать новые потенциальные ингибиторы Bcr-Abl тирозинкиназы – фермента, играющего важную роль в развитии хронического миелоидного лейкоза. Показано, что совместное применение разработанной нейронной сети с методами молекулярного моделирования представляет собой эффективный вычислительный инструмент, позволяющий значительно сократить время и затраты, необходимые для разработки новых эффективных противоопухолевых агентов широкого спектра действия.

Работа выполнена в рамках задания 3.4.1. «Разработка новых противоопухолевых и противовирусных органических соединений с использованием методов компьютерного моделирования, машинного обучения и химического синтеза» ГПНИ «Конвергенция-2025».

ЛИТЕРАТУРА

1. Advances and Perspectives in Applying Deep Learning for Drug Design and Discovery / Lipinski C.F. [et al.] // Front. Robotics and AI. – 2019. – Vol. 6. – P. 108.
2. Köstler W.J., Zielinski C.C. Targeting Receptor Tyrosine Kinases in Cancer. In: Receptor Tyrosine Kinases: Structure, Functions and Role in Human Disease. Eds.: Wheeler D.L., Yarden Y. New York: Springer Science & Business Media, 2015. – P. 78-225.
3. Improving Chemical Autoencoder Latent Space and Molecular De-novo Generation Diversity with Heteroencoders / Bjerrum E.J., Sattarov B. // Biomolecules. – 2018. – Vol. 8(4). – P. 131.



DE NOVO DESIGN OF POTENTIAL BCR-ABL TYROSINE KINSE INHIBITORS USING METHODS OF MACHINE LEARNING AND MOLECULAR MODELING

Karpenko A.D.¹, Vaitko T.D.², Tuzikov A.V.¹, Andrianov A.M.³

¹The State Scientific Institution "The United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus", Surganova str., 220012, Minsk, Belarus, rfe.karpenko@gmail.com

²Belorussian State University, 4 Nezavisimosti Avenue, 220030, Minsk, Belarus, timvaitko@gmail.com

³Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Kuprevicha st., 5/2, 220084 Minsk, Belarus, alexande.andriano@yandex.ru

A generative neural network has been developed for computer-aided *de novo* design of potential inhibitors of Bcr-Abl tyrosine kinase, an enzyme whose activity is the pathophysiological cause of chronic myeloid leukemia. The neural network was trained and tested on a set of chemical compounds that contain 2-arylamino-pyrimidine fragment presenting as a main pharmacophore in the structures of many small-molecule protein kinase inhibitors. It has been shown that the developed neural network makes it possible to generate new chemical compounds with a given biological activity against the Bcr-Abl tyrosine kinase and its mutant form Bcr-Abl^{T315I}.

Keywords. Machine learning methods, deep learning, generative neural networks, heteroencoders, BCR-ABL tyrosine kinase, virtual screening, molecular docking, anticancer drugs, chronic myeloid leukemia.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРОИЗВОДНЫХ ВИТАМИНОВ, ЛАКТОФЕРРИНА И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИШЕМИИ И ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ПОЧЕК КРЫС

Катковская И.Н., Титко О.В., Мурашкевич Ю.Г., Мороз В.Л., Гуринович В.А., Филипович Н.А., Якубович Е.А., Максимчик Ю.З., Лукиенко Е.П., Черемисин А.С., Канунникова Н.П., Мойсеенок А.Г., Надольник Л.И.

Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси», Гродно, 230023, площадь Антония Тызенгауза, д. 7, gurinovich@ibiochemistry.by

Введение. Повреждение почек при ишемии, ишемии/реперфузии (И/ИР) является частой причиной острой почечной недостаточности. Клеточные и молекулярные механизмы последствий И/ИР почек сложны и до конца не изучены. Ишемические и реперфузионные повреждения почек могут являться причиной острого повреждения почек в клинических ситуациях: при сосудистой хирургии, хирургии почек, трансплантологии и кардиохирургии, включая коронарное шунтирование [1-3].

Одним из перспективных направлений ренопротекторной терапии ишемически-реперфузионных повреждений является фармакологическое пре- и посткондиционирование. В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что предварительное введение эритропозтина перед выполнением аортокоронарного шунтирования приводит к уменьшению тяжести острого повреждения почек [4]. Представленные данные свидетельствуют об актуальности исследования механизмов ишемического/реперфузионного повреждения почек и разработки эффективных фармакологических средств их защиты.

Цель работы – оценить влияние рекомбинантного человеческого лактоферрина (рЧЛФ), пантенола, витамина Д и наноконплекса микроэлементов на показатели антиоксидантной системы, концентрацию витаминов и микроэлементов при ишемии и ишемии/реперфузии почек у крыс.



Материалы и методы исследования. Исследования выполнены на половозрелых самках крыс массой 250-300 г. Ишемия и ишемия/реперфузия почек крыс моделировались хирургическим путем. После вскрытия брюшной полости срединным разрезом тупым путем выделялись правая и левая почки, далее выделялась сосудистая ножка каждой почки и накладывался сосудистый зажим. Те же манипуляции были проведены и с левой почкой. Изменение цвета и тургора почек служило подтверждением адекватного пережатия сосудов. Проведено двустороннее моделирование ишемии (30 минут) правой и левой почек, реперфузии подвергалась только левая почка, продолжительность – 120 минут. Операция проводилась под 2,8% хлоральгидратным наркозом при его внутрибрюшинном введении в дозе 350 мг/кг. Хирургические манипуляции осуществлялись с соблюдением всех правил асептики.

Тестируемые препараты вводились в течение 2 недель до хирургического вмешательства, последнее введение – за 30 минут. Использовались следующие дозы тестируемых препаратов: лактоферрин (рекомбинантный человеческий, рчЛФ) в дозе 100 мг/кг, пантенол 200 мг/кг, витамин Д 5000 МЕ/кг, наноконкомплекс микроэлементов (нано-Se (1 мг/кг)+нано-Zn-Cr (Zn 0,5 мг/кг, Cr 1 мг/кг).

В тканях почки, взятых для анализа, спектрофотометрическими методами измерялась концентрация ТБК-реагирующих продуктов ПОЛ, а также показатели антиоксидантной системы: активность СОД, каталазы, глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионтрансферазы (ГТ), концентрация восстановленного глутатиона (GSH). Концентрации витаминов (25(OH)D, витамин Д, ретинол, α -токоферол) были измерены в сыворотке крови и ткани почки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent Technologies 1260, США). Концентрация микроэлементов в сыворотке крови, ткани почки была измерена на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой «NexION 2000 B (Perkin Elmer, США).

Результаты и обсуждение. Выявлены разнонаправленные эффекты ишемии и ишемии/реперфузии на активность СОД и каталазы в почках крыс: повышение активности СОД (15-27,8%) и снижение активности каталазы (16,6-30,0%), а также значительное снижение уровня GSH (15-50%) на фоне снижения активности глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы. Эти изменения могут быть следствием активации свободнорадикальных процессов в почках в условиях ишемии/реперфузии. Защитные эффекты тестируемых соединений проявлялись в условиях ишемии почки (30 минут) и ишемии/реперфузии (30 минут/120 минут). Введение лактоферрина (рчЛФ, 100 мг/кг) и наноконкомплекса микроэлементов (2,5 мг/кг) нормализовало активность СОД и каталазы в почках крыс, в меньшей степени этот эффект проявляли витамин Д (5000 Ед/кг) и пантенол.

Восстановление сниженного в условиях ишемии уровня GSH в почках реализовалось через повышение активности глутатионредуктазы на 37,0% (пантенол, 200 мг/кг) и на 27,9% (лактоферрин, 100 мг/кг) и глутатионтрансферазы на 19-20% (лактоферрин, 100 мг/кг; комплекс МЭ, 2,5 мг/кг). В условиях ишемии/реперфузии (30/120 минут) в почке защитные эффекты на уровень GSH выявлены у лактоферрина и витамина Д, но в этих условиях наиболее значимый восстановительный эффект реализовался через повышение глутатионредуктазы на фоне введения комплекса МЭ (повышение на 40% по сравнению с группой крыс, не получавших препараты).

Введение лактоферрина и витамина Д повышало сниженный на фоне ишемии в почках уровень КоА-SH (в 2,5 и 2,9 раза), но не Ацетил КоА, уровень которого нормализовался только в условиях ишемии/реперфузии при введении пантенола и лактоферрина. Полученные результаты показывают защитные (антиоксидантные, антигипоксические и метаболические) эффекты в тканях крыс в условиях острой ишемии и ишемии/реперфузии у лактоферрина, пантенола, наноконкомплекса МЭ и витамина Д.

Установлено, что ишемия в течение 30 минут и ишемия/реперфузия 30/120 минут проявлялись снижением концентрации витамина Д в почке и печени всех групп животных на



29,5-50,6%, за исключением группы, получавшей рекомбинантный человеческий лактоферрин, где уровень витамина Д не отличался от контрольных значений; введение витамина Д при ишемии повышало его содержание в почке в 6,7 раза, в печени – 5,8 раза. При длительной ишемии (60 минут) в сыворотке крови крыс снизилась концентрация 25(OH)D, но повысилась концентрация витамина Д (10,5%, $p < 0,05$) и ретинола (26,6%, $p < 0,05$). Введение нанокон комплекса МЭ (Se, Zn, Cr) и витамина Д повышало уровень 25(OH)D в сыворотке крови крыс при ишемии/реперфузии.

При моделировании ишемии/реперфузии в сыворотке крови крыс отмечено повышение концентрации селена (1,4 раза), железа (1,4 раза), кобальта (2,0 раза) и снижение концентрации йода (1,8 раза), молибдена (1,7 раза). При ишемии/реперфузии почек только на фоне введения нанокон комплекса МЭ в крови повысилась концентрация селена в 4,6 раза; введение пантенола и рчЛФ снижало концентрацию меди в 1,2-1,5 раза; витамин Д повышал концентрацию Мо в 1,3 раза в сыворотке крови.

При ишемии в почке выявлено значительное повышение содержания железа, меди и снижение содержания кобальта, молибдена, цинка; только на фоне введения комплекса МЭ повышались уровни селена, меди, хрома. При моделировании ишемии/реперфузии (30-мин. ишемия и 120-мин. реперфузия) в почке снижалась концентрация селена, меди, цинка, марганца, молибдена, хрома и повышалась концентрация ванадия, что может быть обусловлено нарушением их экскреции. Только введение нанокон комплекса МЭ повысило содержание селена, меди; уровень хрома восстанавливался до контрольных значений на фоне введения витамина Д; введение рчЛФ и пантенола нормализовало повышенный уровень ванадия.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что ишемия и ишемия/реперфузия почек связаны со значительными изменениями антиоксидантно/прооксидантного баланса почек, нарушением метаболизма витаминов и микроэлементов. При введении тестируемых препаратов – рчЛФ, пантенола, нанокон комплекса микроэлементов, витамина Д – выявлены значительные защитные эффекты, исследование механизмов которых представляет интерес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Факторы ишемического поражения почки и ее резекции / Дряженков И.Г. [и др.] // Клинич. медицина. – 2013. – № 6. – С 21-24.
2. Pathophysiology of acute kidney injury / Basile D.P., Anderson M.D., Sutton T.A. // Comprehensive Physiol. – 2012. – Vol. 2(2). – P. 1303-1353.
3. Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes / Makris K., Spanou L. // Clinical Biochem. Rev. – 2016. – Vol. 37(2). – P. 85-98.
4. Prophylaxis with erythropoietin versus placebo reduces acute kidney injury and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients undergoing cardiac surgery: a randomized, double-blind controlled trial / Tasanarong A. [et al.] // BMC Nephrology. – 2013. – Vol. 14. – Art. e136.

STUDY OF PROTECTIVE EFFECTS OF VITAMINS, LACTOFERRIN AND MICROELEMENTS DERIVATIVES IN SIMULATION OF RAT KIDNEY ISCHEMIA AND ISCHEMIA/REPERFUSION

Katkovskaya I.N., Titko O.V., Murashkevich Yu.G., Moroz V.L., Gurinovich V.A.,
Filipovich N.A., Yakubovich E.A., Maksimchik Yu.Z., Lukienko E.P., Cheremisina A.S.,
Kanunnikova N.P., Moiseenok A.G., Nadolnik L.I.

*Republican Research Unitary Enterprise "Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus", Grodno, 230023, Ploshchad Antoniia Tyzengauza, d.7,
gurinovich@ibiochemistry.by*

The protective effects of lactoferrin, panthenol, nano-Se + nano-Zn-Cr microelement complex were shown on the model of rat kidney ischemia/reperfusion.



РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСИ А В ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ НИЛОТИНИБ- НАН МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС

Коноплич А.В., Будько Е.В., Калиниченко Е.Н.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, alena.konoplich96@gmail.com*

Нилотиниб (Tasigna[®], Novartis Pharma, AG) является препаратом нового поколения, ингибитором протеинкиназ, который применяется в клинической практике для лечения хронического миелолейкоза, положительного по филадельфийской хромосоме (Ph⁺ ХМЛ) [1]. Генотоксичные примеси могут потенциально разрушать структуру ДНК и вызывать необратимые мутагенные процессы в клетке, поэтому количественное определение таких примесей является важнейшей задачей контроля качества лекарственных средств [2].

Целью исследования являлась разработка и валидация количественного определения генотоксичной примеси А (3-(4-метил-1Н-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилин) в лекарственном средстве Нилотиниб-НАН методом высокочувствительной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС).

Материалы и методы. Валидацию методики количественного определения примеси А в лекарственном средстве Нилотиниб-НАН методом ВЭЖХ-МС осуществляли на серии образца лекарственного средства Нилотиниб-НАН производства НПЦ «ХимФармСинтез» ИБОХ НАН Беларуси.

Хроматографический анализ проводили на высокочувствительном жидкостном хроматографе Agilent 1290 с масс-спектрометрическим детектором 6120В. Для анализа использовали хроматографическую колонку Zorbax Extend-C18, Solvent Saver Plus (Agilent Technologies, США), 150 мм × 3,0 мм, с размером частиц 3,5 мкм.

Испытуемые растворы готовили в концентрации 0,6 мг/мл нилотиниба в смеси ацетонитрил / вода (50 : 50 об/об), растворы сравнения – в концентрации 1,8 нг/мл примеси А (соответствует верхней границе содержания примеси – 3 ppm) для анализа лекарственного средства на выпуск, в концентрации 3,6 нг/мл примеси А (соответствует верхней границе содержания примеси – 6 ppm) для анализа лекарственного средства на срок годности.

Хроматографирование проводили в градиентном режиме: подвижная фаза А – раствор 1,26 г/л аммония формиата в воде, доведенный до pH 3,5 муравьиной кислотой безводной, подвижная фаза В – раствор 0,1 % (об/об) муравьиной кислоты безводной в ацетонитриле. Время хроматографирования – 12 минут, температура колонки – 40°C, скорость подвижной фазы – 0,4 мл/мин, объем закола – 8,0 мкл. Параметры масс-спектрометрического детектора: режим ионизации – электроспрей, напряжение на капилляре – 1500 В, полярность – положительная, поток осушающего газа – 10 л/мин, давление на небулайзере – 10 psig, температура осушающего газа – 350°C, детектируемый молекулярный ион – 242,1 (а.е.м.), величина фрагментора – 140.

Результаты и их обсуждение. Технология производства субстанции нилотиниба гидрохлорида моногидрата (4-метил-N-[3-(4-метил-1Н-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]-3-[(4-пиридин-3-ил-пиримидин-2-ил)амино]бензамида гидрохлорида моногидрата, **1**) в ходе химического синтеза включает присоединение 3-(4-метил-1Н-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилина (примесь А, **2**) к промежуточному соединению дигидрохлорид хлорангидрид 4-метил-3-[[4-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил]амино]бензойной кислоты (**3**) при нагревании в хлористом метиле с добавлением ДМФА в качестве катализатора (рисунок 1).

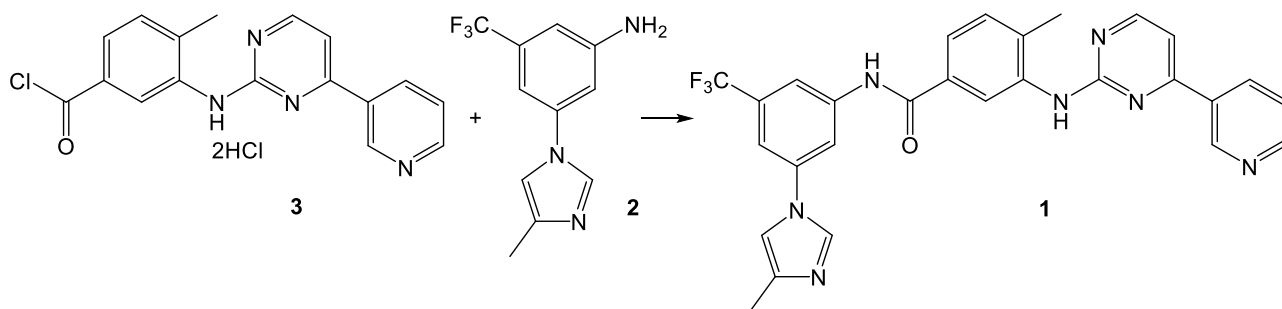


Рисунок 1. Схема получения нилотиниба

Допустимый предел содержания примеси А в лекарственном средстве Нилотиниб-НАН установлен равным 3 ppm на выпуск и 6 ppm на срок годности.

Валидация методики. Валидацию методики определения примеси А проводили в соответствии с требованиями ГФ РБ II по следующим характеристикам: линейность, предел количественного определения, специфичность, правильность, сходимость, робастность, диапазон применения, стабильность. Хроматограммы приведены на рисунке 2.

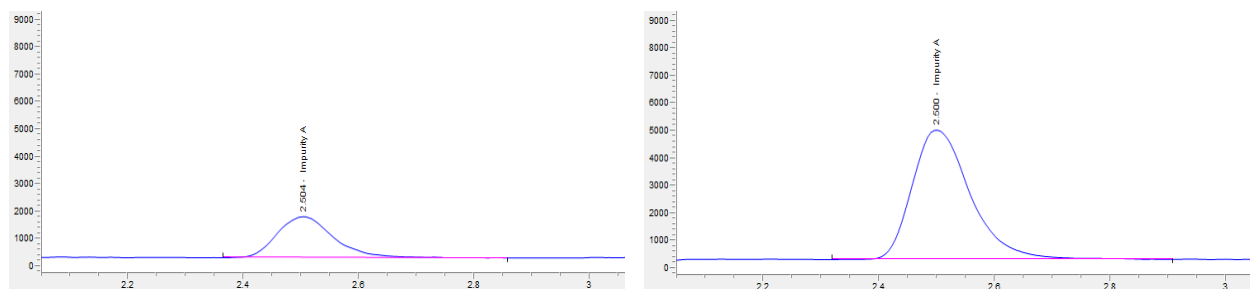


Рисунок 2. Хроматограммы испытуемого раствора и раствора сравнения

Линейность. Линейная зависимость площади пика от концентрации изучалась на модельных растворах концентраций 1,5 ppm – 9 ppm. Полученные результаты представлены в таблице.

Таблица. Результаты статистической обработки данных по изучению линейности

Определяемые параметры	Полученные значения
Коэффициент корреляции r	0,9992
Точка пересечения с осью ординат a	3,0186
Тангенс угла наклона прямой b	0,9457
Относительное стандартное отклонение RSD_0	2,2946

Результаты испытаний серии растворов демонстрируют линейную зависимость площади пика от концентрации; коэффициент корреляции – 0,9992.

Для определения *предела количественного определения* использовали метод оценки сигнал/шум. Путем разбавления модельных растворов вычисляли концентрацию, соответствующую величине предела количественного определения (отношение сигнал/шум ≈ 10). Установлено, что предел количественного определения методики составляет 0,125 ppm.

Специфичность изучали путём сравнения хроматограмм смеси растворителей, плацебо, подвижной фазы и растворов испытуемых образцов с добавлением других примесей в концентрации 1% от массы нилотиниба в испытуемом растворе. В условиях проведения



испытаний на хроматограммах смеси растворителей, плацебо и подвижной фазы не было обнаружено мешающих пиков. Добавление других примесей в испытуемый раствор не влияло на количественное определение примеси А.

Для изучения *правильности* к навескам испытуемого образца добавляли известное количество примеси А. При оценке правильности рассчитывали степень извлечения – отношение в процентах площади пика, соответствующего найденному количеству примеси А, от площади пика, соответствующего введенному количеству примеси А, и смещение степени извлечения (отличие степени извлечения от 100%). Полученные результаты удовлетворяли критерию приемлемости ($\delta \bar{z} \leq \Delta z$).

Сходимость изучали путём анализа шести испытуемых образцов. Относительное стандартное отклонение измерений (RSD (S_r)) составило 7,23% и 4,17% для 3 ppm и 6 ppm, соответственно (критерий приемлемости $RSD \leq 2\%$).

Робастность. Для определения робастности методики определяли содержание примеси А в испытуемых образцах в стандартной и изменённой системах. В ходе изучения робастности меняли такие параметры системы, как pH подвижной фазы А (3,45 и 3,55), скорость подвижной фазы (0,36 и 0,44 мл/мин), температуру колонки (38°C и 42°C). Результаты, полученные при определении содержания примеси А в изменённых условиях, сравнивали с результатами, полученными в стандартных условиях. Отклонения составляли 10%.

Исходя из данных по изучению линейности, предела количественного определения, сходимости и правильности, *диапазон применения методики* составил от 1,5 ppm до 9 ppm.

Доказана *стабильность* испытуемых растворов в течение 8 часов при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ и растворов сравнения в течение 24 часов при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$.

Проверка пригодности хроматографической системы. Для подтверждения пригодности хроматографической системы оценивали относительное стандартное отклонение ($RSD < 10\%$), соотношение сигнал / шум (не менее 20) и фактор асимметрии для растворов сравнения (не более 2,0).

Заключение. Разработана методика количественного определения примеси А в лекарственном средстве Нилотиниб-НАН методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Методика позволяет получать результаты испытаний, удовлетворяющие предварительно установленным критериям приемлемости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nilotinib, an approved leukemia drug, inhibits smoothened signaling in Hedgehog-dependent medulloblastoma / K.K. Chahal [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol. 14(9). – Art. e0214901.
2. Quantum mechanical descriptors of nilotinib's impurities / Mitra Debanjan // Innovare Journal of Scinces. – 2008. – Vol. 6. – P. 1-8.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF IMPURITY A IN MEDICAL PRODUCT NILOTINIB-NAN

Konoplich A.V., Budko E.V., Kalinichenko E.N.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, alena.konoplich96@gmail.com*

HPLC-MS method for the determination of impurity A in medical product Nilotinib-NAN produced at «ChemPharmSynthesis» center has been validated for linearity, limit of quantification, specificity, accuracy, robustness, solution stability, system stability. The method was used for the quantification of impurity A in medical product Nilotinib-NAN.



РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЛОТИНИБА В ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ

Коноплич А.В., Савицкий В.А., Калиниченко Е.Н.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, alena.konoplich96@gmail.com

Нилотиниб (Tasigna[®], Novartis Pharma Stein, AG, Швейцария) является препаратом нового поколения, ингибитором протеинкиназ, который применяется в клинической практике для лечения впервые диагностированного хронического миелолейкоза, положительного по филадельфийской хромосоме (Ph⁺ ХМЛ), в фазе акселерации и фазе бластного криза при резистентности или непереносимости предшествующей терапии [1].

Разработка отечественного нилотиниб-содержащего препарата Нилотиниб-НАН (производства НПЦ «ХимФармСинтез» ИБОХ НАН Беларуси) и оценка его клинической взаимозаменяемости с инновационным препаратом Тасигна (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) представляется актуальной задачей с позиции оптимизации лекарственного обеспечения медицинских организаций и населения. С этой целью проведено исследование биоэквивалентности препаратов Нилотиниб-НАН и Тасигна.

Целью исследования являлась разработка и валидация количественного определения нилотиниба в плазме человеческой крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) для последующего применения разработанного метода в исследованиях биоэквивалентности.

Материалы и методы. Валидацию методики количественного определения нилотиниба в плазме человеческой крови методом ВЭЖХ-МС осуществляли на модельных растворах, приготовленных на бланковой плазме человеческой крови, не содержащей анализируемое вещество.

Хроматографический анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 с масс-спектрометрическим детектором 6120B. Для анализа использовали хроматографическую колонку Zorbax Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD (Agilent Technologies, США), 2,1 мм × 50 мм, с размером частиц 1,8 мкм.

Подготовка проб осуществлялась методом осаждения белков. Испытуемые растворы готовили по схеме: 200 мкл размороженной при комнатной температуре плазмы вносили в пробирки типа эппендорф, добавляли 1000 мкл смеси растворителей ацетонитрил / метанол (1 : 3 об/об), содержащей внутренний стандарт (дейтерированный стандарт нилотиниба), смесь встряхивали на шейкере в течение 5 минут, затем центрифугировали с относительной центрифужной силой 20000 g при температуре 4°C в течение 10 минут. Надосадочный слой жидкости переливали в вials и хроматографировали. Бланковые, нулевые, модельные, калибровочные растворы и растворы контроля качества готовили с использованием плазмы крови, не содержащей анализируемое вещество. Линейный диапазон методики составил 6-2400 нг/мл. Для образцов контроля качества выбраны концентрации 1800 нг/мл, 720 нг/мл, 180 нг/мл и 18 нг/мл.

Хроматографирование проводили в градиентном режиме: подвижная фаза А – раствор 1,26 г/л аммония формиата в воде, доведенный до pH 3,5 муравьиной кислотой безводной, подвижная фаза В – раствор 0,1% (об/об) муравьиной кислоты безводной в ацетонитриле. Время хроматографирования – 5,6 минут, температура колонки – 40°C, скорость подвижной фазы – 0,4 мл/мин, объем закола – 4,0 мкл. Параметры масс-спектрометрического детектора: режим ионизации – электроспрей, напряжение на капилляре – 1600 В, полярность – положительная, поток осушающего газа – 10 л/мин, давление на небулайзере – 20 psig, температура осушающего газа – 350°C, детектируемые молекулярные ионы – ДВ: 530,2 и 531,2; ВС: 534,2 и 535,2 (а.е.м.), величина фрагментора – 190.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведения валидации изучены следующие характеристики: селективность, эффект переноса, нижний предел количественного



определения, линейность градуировочной кривой, правильность и прецизионность внутри цикла и между циклами, эффект матрицы, стабильность.

Для оценки *селективности* методики были проанализированы образцы плазмы крови от 6 разных источников, а также гемолизная и гиперлипидемическая плазма крови. В проанализированных образцах отклик сигнала аналита не превышал 4,36% по нижнему пределу количественного определения (НПКО) и 0,14% – для внутреннего стандарта (ВС).

Эффект переноса. В ходе проведения валидации перенос пробы был в пределах заданных требований. Перенос в холостой образец после ввода стандартного образца с высокой концентрацией составил 15,57% величины НПКО для аналита и 0,08% – для ВС.

Нижний предел количественного определения методики (6 нг/мл) поддавался надежному количественному определению с приемлемой правильностью и прецизионностью, более, чем в 5 раз, превосходил величину сигнала холостого образца.

Линейный диапазон данного метода 6-2400 нг/мл. Для оценки градуировочной кривой использовано 9 различных концентраций. В ходе валидации получены четыре градуировочных графика. Коэффициент корреляции – не менее 0,997. Относительное отклонение концентрации от номинальных значений – не более 11,12% (для НПКО – не более 4,40%), процент соответствующих градуировочных стандартов для 4 аналитических циклов – 100%.

Для оценки *правильности и прецизионности внутри* цикла и *между* циклами (3 аналитических цикла) оценены НПКО, нижний, средний и верхний уровни образцов для контроля качества, по пять образцов каждой концентрации, а также нижний и верхний уровни образцов для контроля качества, приготовленных на гемолизной и гиперлипидемической плазме крови. Отклонения найденных концентраций от номинальных значений не превышало 6,82% внутри цикла и 4,53% между циклами, коэффициента вариации не превышал 3,20% внутри цикла и 6,37% между циклами.

Для оценки *эффекта матрицы* проанализированы образцы на верхнем и нижнем уровне концентраций контроля качества в присутствии матрицы и на «чистом растворителе». Для получения матричного раствора бланковая плазма осаждалась смесью растворителей ацетонитрил / метанол (1 : 3 об/об). В качестве «чистого растворителя» использовали смесь растворителей-вода (10 : 2). Для определения были использованы пробы плазмы крови, не содержащей аналит, полученные от 6 различных источников. Относительное стандартное отклонение нормализованного эффекта матрицы по внутреннему стандарту, рассчитанное для 6 биологических образцов, составило 1,58% (для верхнего уровня концентрации контроля качества) и 2,34% (для нижнего уровня концентрации контроля качества).

Стабильность естественного хранения изучалась на модельных растворах, содержащих нилотиниб. Образцы показали свою стабильность при температуре $(-70 \pm 10)^{\circ}\text{C}$ в течение 9 месяцев. Дополнительно изучена краткосрочная, постпрепаративная стабильность образцов, стабильность в автосамплере, замороженного и размороженного образца (3 цикла заморозки-разморозки), стабильность рабочих и исходных растворов.

Заключение. Разработанный метод прошел валидацию, все определяемые параметры соответствовали заранее установленным критериям приемлемости. Метод успешно применен для количественного определения нилотиниба в плазме человеческой крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в ходе проведения биоэквивалентных испытаний лекарственных средств Нилотиниб-НАН и Тасигна. Методика позволяет получать результаты испытаний, удовлетворяющие предварительно установленным критериям приемлемости.



ЛИТЕРАТУРА

1. Nilotinib, an approved leukemia drug, inhibits smoothened signaling in Hedgehog-dependent medulloblastoma / Chahal K.K. [et al.] // J. Plos One. – 2019. – Vol. 14. – Art. e0214901.
2. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION NILOTINIB IN HUMAN PLASMA

Konoplich A.V., Savitski V.A., Kalinichenko E.N.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, alena.konoplich96@gmail.com*

HPLC-MS method for the determination of nilotinib in human plasma has been validated for selectivity, carryover, linearity of the calibration curve (6–2400 ng/ml), lower limit of quantification, accuracy and specificity, matrix effect, stability. The method was used in bioequivalence studies of Nilotinib-NAN (REP SPC «ChemPharmSynthesis», Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus) and Tasigna® (Novartis Pharma Stein, AG, Switzerland).

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ АДЕНОЗИНА И ИХ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ

Космач А.А.¹, Герловский Д.О.², Литвинко Н.М.²

¹*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, БГУ, Биологический факультет, 220030, г. Минск, nstksmch@gmail.com*

²*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2*

Введение. В настоящее время наблюдается увеличение устойчивости патогенных микроорганизмов к противомикробным препаратам (УПП), создавая серьезные глобальные угрозы для здоровья, включая высокие медицинские расходы и уровень смертности. Известно, что в Соединенных Штатах УПП является причиной почти 3 миллионов инфекций и 35 тысяч смертей ежегодно. В Европе более высокая распространенность инфекций в связи с УПП характерна для стран южной и восточной частей континента по сравнению со странами севера. Точные данные по Африке отсутствуют, так как 40% стран не имеют записей о заболеваемости из-за УПП, но наблюдается явная тенденция к росту таких инфекций. Несколько азиатских стран имеют очень высокий уровень заболеваемости в связи с УПП и, по оценкам, в следующие 30 лет устойчивость к антибиотикам может стать причиной ежегодной глобальной смертности. По прогнозам, большая часть этих смертей и потерь в экономике будет приходиться на Африку и Азию. После вспышки COVID-19 более широкое использование антибиотиков может еще больше ускорить развитие устойчивости к антибиотикам [1]. Для борьбы с устойчивыми к антибиотикам возбудителями инфекций имеет большое значение поиск и создание новых противомикробных агентов, а также конструирование новых препаративных форм уже известных соединений. Нуклеозидные антибиотики представляют уникальный класс соединений с разнообразной биологической активностью [2].

Целью настоящего исследования являлось получение липосомальных форм антимикробных препаратов и сравнение антибиотической активности модифицированных нуклеозидов и их липосомальных форм в отношении ряда бактериальных культур *in vitro*.

Методы исследования. В работе использовали модифицированные нуклеозиды (эффекторы) и их липосомальные формы, культуры *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*. Применяли общепринятые микробиологические методы определения

антимикробной активности [3,4]. Противомикробную активность нуклеозидных соединений оценивали по размерам зон задержки роста на чашке Петри для модифицированного диско-диффузионного метода и характеризовали по признакам роста культуры в пробирке при совместном культивировании бактериальных культур с препаративными формами нуклеозидов. Растворы нуклеозидов готовили с конечной концентрацией 100 мкмоль/мл. Фосфатидилхолин(ФХ)-содержащие липосомальные формы нуклеозидов получали путём обработки ультразвуком до полной прозрачности раствора. Проводили очистку полученных липосомальных форм методом диализа. Для количественного определения антибиотической активности препаратов нуклеозидов были построены кривые роста *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* при добавлении различных растворов нуклеозидов, их липосомальных форм, в качестве контроля использовали ФХ в составе липосом. Высевы делали через 3, 6 и 24 часа культивирования. Активность выражали в изменении КОЕ/мл (КОЕ – число выживших колоний образующих единиц данного микроорганизма) путём нахождения среднего количества по результатам трех измерений.

Результаты. Получены препаративные формы нуклеозидов из кристаллических субстанций (исследованные соединения были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории химии нуклеотидов и полинуклеотидов ИБОХ НАН Беларуси). С использованием спектрофотометрических методов охарактеризованы спектральные свойства, рассчитаны коэффициенты молярной экстинкции и найдены максимумы поглощения нуклеозидов ($E=14300$ для 2-фтораденозина). Проверена антибиотическая активность полученных препаративных форм нуклеозидов на твердых питательных средах модифицированным диско-диффузионным методом, и для соединений со специфической и ярко выраженной антибиотической активностью найдены минимальные ингибирующие концентрации (например, для 2-хлораденозина МИК в отношении *Salmonella typhimurium* составила 50 мкмоль/мл). После обработки и анализа результатов отобрали наиболее интересные для дальнейших исследований нуклеозиды: 2-фтораденозин и 2-хлораденозин (рисунок). Получены липосомальные формы описанных препаратов.

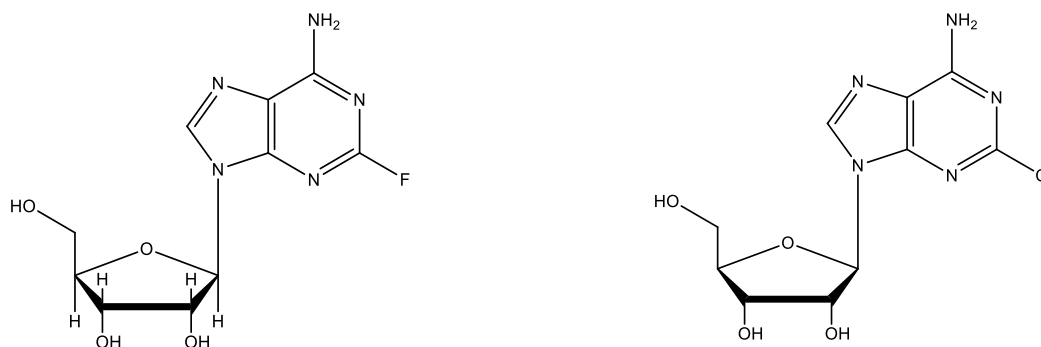


Рисунок. Структура нуклеозидов, выбранных для включения в состав липосом (2-фтораденозин и 2-хлораденозин)

Согласно полученным результатам, 2-хлораденозин в липосомальной форме оказывает незначительный антибиотический эффект на клетки *Salmonella typhimurium*: спустя сутки культивирования с 2-хлораденозином в составе липосом значение КОЕ/мл составляет 86% по сравнению с контролем. Водный раствор нуклеозида имеет более выраженный эффект: спустя сутки культивирования с водорастворимой формой 2-хлораденозина значение КОЕ/мл составляет 39% по сравнению с контролем. Показано, что водный раствор 2-хлораденозина не проявляет значительной антимикробной активности в отношении культуры *Staphylococcus aureus*: при культивировании с водным раствором 2-хлораденозина КОЕ/мл составляет 91% по сравнению с контролем. Однако его липосомальная форма обладает ярко выраженным антибиотическим эффектом по отношению к клеткам *Staphylococcus aureus*: значение КОЕ/мл



после культивирования с липосомальной формой 2-хлораденозина составляет 19% по сравнению с контролем.

Раствор 2-фтораденозина, для которого был показан ранее значительный антибиотический эффект на твердых питательных средах, при построении кривых роста также обладает антибиотическим действием в отношении культуры *Escherichia coli*: инкубация с раствором чистого 2-фтораденозина – значение КОЕ/мл составляет около 2% по сравнению с контролем. Липосомальная форма 2-фтораденозина теряет свои антибиотические свойства и, в противоположность, стимулирует рост бактериальной культуры, начиная с шестого часа культивирования: значение КОЕ/мл составляет 274% по сравнению с контролем. Это может указывать на наличие двух мишеней для 2-фтораденозина в клетках *Escherichia coli*. 2-Фтораденозин проявляет антибиотический эффект, действуя на поверхностные структуры бактериальной клетки, в то время как липосомальная форма облегчает попадание 2-фтораденозина внутрь клетки, где 2-фтораденозин выступает в качестве аналога вторичного мессенджера (цАМФ).

Заключение. Таким образом, включение модифицированных нуклеозидов в липосомы может изменять их антибиотические свойства (как при использовании 2-фтораденозина, так и 2-хлораденозина): наблюдается как усиление проявляемого антибиотического эффекта, так и уменьшение. Предполагается, что изменение антибиотических свойств может быть связано с тем, что эффектор в чистом виде без липидной оболочки проявляет антибиотический эффект, действуя на поверхностные структуры бактериальной клетки, в то время как липосомальная форма меняет рост клеток посредством облегчения проникновения производных нуклеозидов внутрь клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nucleoside Analogues Are Potent Inducers of Pol V-mediated Mutagenesis / Sumabe B.K. [et al.] // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11(6). – P. 843-851.
2. Engineering nucleoside antibiotics toward the development of novel antimicrobial agents. / Niu G. [et al.] // J. Antibiot. – 2019. – Vol. 72. – P. 906-912.
3. Микробиология. Практикум / Авт.-сост. В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина. – Мн.: БГУ, 2015. – 115 с.
4. Физиология микроорганизмов / Авт.-сост. В.В. Лысак, Е.И. Игнатенко. – Мн.: БГУ, 2016. – 80 с.

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ASP-GLU НА УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ

Кравченко Е.В.¹, Бизунок Н.А.², Дубовик Б.В.², Суровец А.И., Асташко Ю.В.

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, kravchenko@iboch.by

²Учреждение образования «Белорусский медицинский университет», Республика Беларусь, г. Минск, 220116, пр. Дзержинского, 83

Введение. К числу перспективных соединений с нейротропной активностью относится дипептид Asp-Glu (A-702), структурно родственной фрагменту *Gln* - *Asp* нейропептидов вазопрессина, окситоцина и кортикотропина, а также – наиболее распространенному пептидному нейромедиатору в мозге млекопитающих, агонисту пресинаптических метаботропных mGlu3-рецепторов N-ацетиласпартилглутамату (NAAG). Влияние Asp-Glu на уровень тревожности (УТ) млекопитающих мало изучено.

Цель работы – оценка влияния Asp-Glu на УТ аутбредных мышей ICR, крыс инбредных спонтанно-гипертензивных SHR и линейных крыс August в условиях создания этологически адекватных эмоциогенных ситуаций.



Методы исследования. Проведена оценка действия дипептида Asp-Glu (Sigma, США, lot 056K1507) на поведение половозрелых лабораторных грызунов (мыши самцы аутбредные ICR, крысы самцы инбредные August, SHR в возрасте 2-2,5 мес.) в условиях их помещения в незнакомую ситуацию, вызывающую проявления страха и тревоги [1]. Животные поставлялись виварием Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Двигательная активность является одним из важнейших показателей жизнедеятельности лабораторных грызунов. Освоение нового пространства в условиях регистрации актограммы сопровождается столкновением двух противоположных форм поведения разной модальности: тревоги и поисковой активности. Наиболее высокая степень «опасности» ситуации отмечается при обследовании животными центрального квадрата (ЦК) актометра, далее в порядке убывания способности индуцировать тревогу следуют центральная зона (ЦЗ), боковые и угловые зоны (БЗ и УЗ соответственно).

Видоспецифическая реакция животного *на тест-стимул («отверстие в перегородке, разделяющей камеру»)* используется для изучения инстинктивного оборонительного поведения у крыс и позволяет эффективно и избирательно оценить тревожно-фобический статус (ТФС) грызунов [1].

Применение двух указанных тестов позволяет осуществить комплексное определение влияния Asp-Glu на УТ животных.

Действие Asp-Glu на УТ мышей ICR изучали, регистрируя их поведение в камере актометра «Универсал 22–32», Республика Беларусь (камера небольших размеров – 32 см × 22 см × 19 см, сходная с «домашней» клеткой). Пребывание в каждой из зон актометра (УЗ, БЗ, ЦЗ и ЦК, в процентах от общего времени нахождения в многоканальном регистраторе активности) регистрировалось автоматически на протяжении часа. Мышей помещали в камеры актометра поодиночке в условиях искусственного освещения (лампы SL 36/26-735). Животным экспериментальных групп №2 (n=10), №3 (n=10) и №4 (n=10) применяли Asp-Glu в дозах 0,01, 0,5 и 5,0 мг/кг внутрибрюшинно (в/б), соответственно, мышам группы 1 (n=10) – дистиллированную воду (ДВ) в/б. Тестируемые соединения и растворитель вводили за 60 мин до начала актометрии.

Исследование влияния дипептида Asp-Glu на латентный период (ЛП) перехода через отверстие в перегородке проводили в двух экспериментах: 1) на грызунах линии August (*эксперимент 1*); 2) на крысах линии SHR (*эксперимент 2*). Из данных литературы известно, что у особей August эффективность дофаминергической стресслимитирующей системы выше, чем у крыс линии Wistar [2]; грызуны линии SHR являются признанной экспериментальной моделью, включающей импульсивность и гиперактивность [3].

В *первой серии эксперимента 1* использовали крыс August (n=30), опыты проводили в марте, в утренние и дневные часы (12:30-14:30). Животным экспериментальных групп №2а (n=6), №3а (n=6) и №4а (n=9) применяли дипептид в дозах 0,1, 0,5 и 5,0 мг/кг в/б, соответственно. *Вторую серию эксперимента 1* выполняли на крысах August (N=40), опыты проводили в конце августа-сентябре, в утренние часы (с 9:30 до 12:45). Крысам групп №2б (n=10), №3б (n=10) и №4б (n=10) применяли Asp-Glu в дозах 0,1, 0,5 и 5,0 мг/кг в/б, соответственно.

В *первую серию эксперимента 2* включали особей SHR (n=40), опыты проводили в конце августа, в утренние часы (9:30-12:30). Животным групп №2в (n=10), №3в (n=10) и №4в (n=10) применяли дипептид в дозах 0,1, 0,5 и 5,0 мг/кг в/б, соответственно. Во *второй серии эксперимента 2* использовали особей линии SHR (n=30), опыты проводили в сентябре, в 9:30-12:45. Крысам группы №2г (n=20) применяли соединение в дозе 0,5 мг/кг в/б. Крысам контрольных групп (№1а (n=9), №1б (n=10), №1в (n=10), №1г (n=10)) в том же режиме вводили растворитель (ДВ). Образцы вводили за 30 мин до помещения животных в экспериментальную установку.

ЛП прохождения через отверстие определяли следующим образом: в условиях комнатной освещенности животное помещали в одно из двух отделений камеры аппарата



«PACS-30 Shuttle-BOX» («Columbus Instrument», США) и начинали отсчет времени, за которое крыса осуществляла переход в другое отделение камеры через отверстие в перегородке, разделяющей камеру. Поведение животного в данном тесте оценивалось в баллах: 0 баллов – выполнение действия за экспериментально установленное время, в пределах которого 50-70% животных в популяции действие выполняли (0-30 с); 1 балл – 31-60 с; 2 балла – 61-180 с включительно; 3 балла – невыполнение (свыше 180 с) [1]. При наличии колебаний у животного при выполнении действия (заглядывание в отверстие или начатый, но незавершенный переход) оценку за выполнение действия увеличивали на 0,5 балла [1].

Данные представляли в виде $X \pm Sx$. Эксперименты выполнены в соответствии с Хельсинкской Декларацией о гуманном обращении с животными (1986 г).

Результаты. Данные о влиянии Asp-Glu на УТ мышей за 60 мин актометрии приведены в таблице 1. В контроле и в остальных сопоставляемых группах животные проводили статистически значимо меньше времени в ЦЗ и ЦК, чем в УЗ, а в ЦК – достоверно меньше, чем в БЗ. В дозе 0,01 мг/кг Asp-Glu повышал уровень тревожности, о чем свидетельствовало статистически значимое снижение пребывания мышей группы №2 в БЗ в сравнении с контролем и особями, которым вводили соединение в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг (таблица 1). При введении Asp-Glu в дозе 0,01 мг/кг животные предпочитали проводить больше времени в наиболее «безопасных» угловых зонах и избегали посещения центральной зоны (таблица 1).

Таблица 1. Влияние Asp-Glu (в/б) на освоение зон актометра «Универсал 22–32» мышами ICR

Зоны актометра (%)	Продолжительность актометрии	Контроль (n=10)	Доза Asp-Glu, мг/кг		
			0,01 (n=10)	0,5 (n=10)	5,0 (n=10)
Угловые зоны	60 мин	70,5±8,9	82,1±4,1	56,2±9,1 °	67,7±7,0 °
Боковые зоны		23,3±6,7 °	12,6±2,3	34,5±7,2 °	29,6±7,0 °
Центральная зона		5,7±2,5*	2,0±0,6*	8,5±4,3*	2,5±0,5*
Центральный квадрат		0,46±0,28*#	3,3±3,2*#	0,75±0,54*#	0,19±0,08*#

Примечания: различия статистически значимы, $P < 0,05$: ° – в сравнении с Asp-Glu в дозе 0,01 мг/кг; * – в группе, в сравнении с активностью в угловой зоне (%), # – в группе, в сравнении с активностью в боковой зоне (%), критерий Крускала-Уоллиса с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критерию Тьюки.

Сведения о модуляции УТ в тесте «переход через отверстие в перегородке» приведены в таблице 2. Показано, что у SHR (*эксперимент 2, серия 1*) в указанном тесте УТ статистически достоверно ниже, чем у особей August (*эксперимент 1, серия 1*). Эти результаты хорошо согласуются с данными о снижении ТФС у особей SHR в сравнении с крысами Lewis (SHR в большей степени исследовали аверсивную среду в батарее тестов для оценки УТ) [4]. Введение Asp-Glu в дозе 0,5 мг/кг (в/б) способствовало статистически значимому уменьшению УТ крыс August – от $2,3 \pm 0,2$ до $1,6 \pm 0,3$ баллов (таблица 2). Кроме того, исследуемый дипептид при введении в дозах 0,1; 0,5; 5,0 мг/кг повышал УТ крыс SHR, устраняя статистически значимые различия с August. На фоне введения дипептида уровень тревожности спонтанно гипертензивных крыс (*эксперимент 2, серии 1 и 2*) колебался в достаточно узком диапазоне от $0,9 \pm 0,3$ до $1,2 \pm 0,2$ балла (стабилизация УТ), тогда как в контроле «размах» достигал $0,5 \pm 0,2 - 1,6 \pm 0,6$ баллов.

**Таблица 2.** Влияние Asp-Glu (в/б) на УТ инбредных крыс August и SHR в тесте «переход через отверстие в перегородке»

Группа / доза, мг/кг	УТ (баллы) ^x			
	крысы August, эксперимент 1		крысы SHR, эксперимент 2	
	серия 1	серия 2	серия 1	серия 2
Контроль	2,3±0,2 (n=9)	1,7±0,3 (n=10)	0,5±0,2 [#] (n=10)	1,6±0,6 (n=10)
Asp-Glu, 0,1	1,8±0,6 (n=6)	1,5±0,3 (n=10)	1,0±0,3 (n=10)	-
Asp-Glu, 0,5	1,6±0,3* (n=6)	1,2±0,3 (n=10)	1,1±0,3 (n=10)	1,2±0,2 (n=20)
Asp-Glu, 5,0	1,7±0,3 (n=9)	1,7±0,3 (n=10)	0,9±0,3 (n=10)	-

Примечания: 1) ^x - сумма баллов по критериям: «ЛП перехода через отверстие в перегородке»; «число заглядываний в соседний отсек»; «число незаконченных переходов»; 2) [#] – различия с контролем (крысы August, серия 1, эксперимент 1) статистически значимы, $P < 0,05$, критерий Крускала-Уоллиса с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критерию Данна (в анализ включены все 14 групп); 3) * – $P = 0,05$ при сравнении только с контролем (крысы August, серия 1, эксперимент 1), критерий Манна-Уитни.

Заключение. Дипептид Asp-Glu, вводимый в дозах 0,01 или 0,1; 0,5; 5,0 мг/кг (в/б), вызывал статистически значимую дозозависимую модуляцию уровня тревожности лабораторных грызунов в условиях создания этологически адекватных эмоциогенных ситуаций. При введении в дозе 0,01 мг/кг (в/б) Asp-Glu оказывал статистически значимое анксиогенное действие на мышей ICR по данным оценки посещения ими зон камеры актометра. При использовании Asp-Glu в дозе 0,5 мг/кг (в/б) выявлен существенный анксиолитический эффект у крыс August в тесте «переход через отверстие в перегородке камеры».

ЛИТЕРАТУРА

1. Новый метод оценки тревожно-фобических состояний у крыс / В.И. Родина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1992. – Т. 114, № 7. – С. 11-14.
2. Катехоламины, оксид азота и устойчивость к стрессорным повреждениям: влияние адаптации к гипоксии / Пшенникова М.Г. [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2002. – Т. 88, № 4. – С. 485-495.
3. Rat models of ADHD / T. Sagvolden, E.B. Johansen // Curr. Top. Behav. Neurosci. – 2012. – Vol. 9. – P. 301-315.
4. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain / Ramos A. [et al.] // Behavioural Brain Research. – 2002. – Vol. 129. – P. 113-123.



THE EFFECT OF THE ASP-GLU COMPOUND ON THE LEVEL OF ANXIETY OF LABORATORY RODENTS

Kravchenko E.V.¹, Bizunok N.A.², Dubovik B.V.², Surovets A.I., Astashko Yu.V.

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences, Belarus, 220084, Minsk, 5/2 Kuprevich Str., kravchenko@iboch.by*

²*Educational Institution "Belarusian State Medical University", 220116, Minsk, Dzerzhinsky Ave., 83, Republic of Belarus*

Dipeptide Asp-Glu, administered in doses of 0.01 or 0.1; 0.5; 5.0 mg / kg (i.p.), caused a statistically significant dose-dependent modulation of the anxiety level of laboratory rodents in conditions of creating ethologically adequate emotional situations. When administered at a dose of 0.01 mg/ kg (i.p.), Asp-Glu had a statistically significant anxiogenic effect on ICR mice, according to the assessment of their visits to the areas of the actimeter chamber. When used at a dose of 0.5 mg / kg (i.p.) Asp-Glu in August rats in the test "passage through the hole in the partition of the chamber" caused a significant anxiolytic effect.

ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДА PRO-LEU НА УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПЕРЕМЕННОЙ СТРЕССОГЕННОСТИ

Кравченко Е.В.¹, Бизунок Н.А.², Дубовик Б.В.²

¹*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купевича, д.5, корп.2, kravchenko@iboch.by*

²*Учреждение образования «Белорусский медицинский университет», Республика Беларусь, г. Минск, 220116, пр. Дзержинского, 83,*

Введение. Анализ опубликованных в научной литературе экспериментальных данных указывает на возможность существования эндогенной системы, выступающей в качестве звена срочной и хронической адаптации организма и являющейся мишенью действия коротких фрагментов регуляторных пептидов. Эта система может играть определенную роль в осуществлении таких функций, как повышение стресс-резистентности, уменьшение реакции тревоги, модуляция уровня внимания и памяти, улучшение социальных (зоосоциальных) взаимодействий в условиях неблагоприятного внешнего воздействия. Одним из перспективных соединений с полимодальной нейротропной активностью является дипептид Pro-Leu. Pro-Leu статистически значимо предотвращал нарушения неассоциативного обучения (габитуация) как у половозрелых, так и у ювенильных крыс SHR (0,5 мг/кг, в/б или в/ж), облегчал процессы габитуации в условиях «изоляции стресса» у инбредных мышей BALB/c с повышенной базовой тревожностью и сниженной бензодиазепиновой рецепцией, а также – у группированных аутбредных мышей ICR и особей линии BALB/c в условиях как низкой, так и высокой стрессогенности экспериментальной обстановки, предотвращал нарушения неассоциативного обучения, вызванные блокадой ГАМК-ергической системы (ГАМК-нейротрансмиссия играет ключевую роль в регуляции состояний тревоги и страха) [1]. Одним из предполагаемых механизмов, благодаря которому достигается облегчение неассоциативного обучения в стрессогенных условиях, является анксиолитическое действие указанного дипептида.

Цель работы – оценка влияния соединения Pro-Leu на УТ инбредных лабораторных крыс SHR в условиях переменной стрессогенности.

Методы исследования. Изучали влияние Pro-Leu на УТ инбредных крыс в камере «Contextual Place Preference Box» (Columbus Instrument, США). Эксперименты проводили с использованием парадигмы «предпочтение места». В основу теста положено естественное стремление грызунов избегать ярко освещенных мест [2,3]. Аппарат разделен на «светлую» и «темную» половины. Показатели «общая двигательная активность», «амбулаторная



активность», «стереотипные движения», «время неактивности», а также «пройденная дистанция» (в дюймах) в каждой из зон камеры регистрировались автоматически на протяжении 10 мин. Подвижность животного оценивали в зонах: А – боковые зоны избегаемого (светлого) отсека с белыми стенками; В – промежуточная зона между боковой и центральной зонами избегаемого (светлого) отсека с белыми стенками; С – центральная зона избегаемого (светлого) отсека с белыми стенками; D – центральная зона предпочитаемого (темного) отсека с черными стенками; Е – промежуточная зона между боковой и центральной зонами предпочитаемого (темного) отсека с черными стенками; F – боковые зоны предпочитаемого (темного) отсека с черными стенками. Регистрация движения грызуна в камере осуществлялась с помощью ИК-датчиков, расположенных на расстоянии 1 дюйма друг от друга (съем данных проводился с частотой 10 раз в секунду). Грызунов помещали в камеру поодиночке.

Учитывая предполагаемую антистрессовую направленность действия дипептида, эксперименты проводили на фоне ряда стрессирующих факторов в условиях высокого уровня неопределенности среды: хэндлинг, помещение в незнакомую обстановку «открытого поля», купание в бассейне, физические нагрузки на *rota-rod*.

Исследования дипептида Pro-Leu (Sigma, США) проводили в эксперименте на половозрелых инбредных крысах-самцах SHR в возрасте 2 мес. Особи SHR являются признанной экспериментальной моделью, включающей импульсивность и гиперактивность [4]. Опыты проводили весной (март), в дневное и вечернее время суток (11:30-20:00). Животным экспериментальных групп №2 (N=6), №3 (N=6), №4 (N=6), №5 (N=6), №6 (N=6) применяли исследуемый дипептид в дозах 0,01; 0,5; 1,0; 5,0 и 10,0 мг/кг соответственно. Крысам контрольной группы №1 (N=6) назначали растворитель (дистиллированная вода). Изучаемые образцы вводили субхронически (18-кратно) интрагастрально с использованием металлического зонда в режиме 5 раз в неделю.

Критический уровень статистической значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Данные представляли в виде $X \pm Sx$. Эксперименты выполнены в соответствии с Хельсинкской Декларацией о гуманном обращении с животными (1986 г.).

Результаты. Статистически значимых межгрупповых различий дистанции, пройденной в зонах А-F, не выявлено. В контроле и на фоне введения Pro-Leu во всех изученных дозах пройденная дистанция в зоне А избегаемого отсека статистически достоверно отличалась от таковой в зонах Е и F (наиболее удаленных от «опасной» территории). Применение дипептида сопровождалось возрастанием продолжительности нахождения крыс в «некомфортных» зонах (в зоне В – на фоне доз 0,01-10,0 мг/кг; в зоне С – 0,01; 0,5; 1,0; 10,0 мг/кг). Введение дипептида в дозах 0,01; 0,5; 1,0 и 5,0 мг/кг сопровождалось редукцией статистически значимых различий между зонами В и Е (в отличие от контроля) – таблица 1. Вместе с тем, Pro-Leu в дозе 0,01 мг/кг способствовал появлению статистически значимых различий дистанции, пройденной в зонах С и F. В случае введения Pro-Leu в наиболее высокой дозе 10,0 мг/кг отличий от контроля не наблюдалось.

Таким образом, введение дипептида (0,5; 1,0; 5,0, в меньшей степени – 0,01 мг/кг) обеспечивало более активное, в сравнении с контролем, поведение в «дискомфортной» зоне В, что указывало на анксиолитический эффект соединения.

**Таблица 1.** Влияние Pro-Leu на пройденную дистанцию крысами SHR в зонах камеры «Contextual Place Preference Box»

Зона светлой/темной камеры	Контроль	Доза Pro-Leu, мг/кг				
		0,01 (n=6)	0,5 (n=6)	1,0 (n=6)	5,0 (n=6)	10,0 (n=6)
Зона А	4,2±2,0* [#]	4,7±2,0* [#]	5,0±2,1* [#]	6,5±3,6* [#]	4,7±1,5* [#]	6,3±2,3* [#]
Зона В	17,8±5,8*	31,2±10,6	31,8±9,9	28,5±8,9	23,3±8,8	33,8±10,5*
Зона С	18,0±3,7*	24,8±7,4* [#]	29,3±8,3*	22,7±7,1*	16,7±4,3*	33,8±9,9*
Зона D	30,3±3,8	44,3±12,5	44,5±10,9	41,3±12,5	43,5±10,6	48,3±11,4
Зона E	203,2±39,3	188,3±27,5	188,5±33,9	204,0±31,6	188,7±43,9	190,8±43,8
Зона F	79,8±14,4	146,3±17,9	110,5±13,6	109,3±20,1	153,5±32,0	126,0±25,5

Примечания: 1) А – боковые зоны избегаемого (светлого) отсека; В – промежуточная зона между боковой и центральной зонами избегаемого отсека; С – центральная зона избегаемого отсека; D – центральная зона предпочитаемого (темного) отсека; E – промежуточная зона между боковой и центральной зонами предпочитаемого отсека; F – боковые зоны предпочитаемого отсека; 2) различия статистически значимы, $P < 0,05$: * – в группе в сравнении с соответствующим показателем в зоне E; [#] – в группе в сравнении с соответствующим показателем в зоне F, критерий Фридмана с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критерию Тьюки.

Данные, приведенные в таблице 2, продемонстрировали, что введение Pro-Leu в широком диапазоне доз (0,01-10,0 мг/кг), в отличие от многих известных анксиолитиков синтетического или растительного происхождения, не вызывало существенных изменений двигательной активности животных. Какие-либо признаки интоксикации при субхроническом применении дипептида в сравнительно высоких дозах (10- и 20-кратно превосходящих экспериментально определенную «терапевтическую» дозу 0,5 мг/кг) не обнаруживались. Это является несомненным преимуществом исследуемого соединения.

Таблица 2. Влияние Pro-Leu на показатели двигательной активности крыс SHR в камере «Contextual Place Preference Box»

Показатель	Двигательная активность крыс SHR (в усл. ед. и % к контролю)					
	Контроль	Pro-Leu, мг/кг				
		0,01	0,5	1,0	5,0	10,0
Общая двигательная активность	371,5±45,3 100,0	474,5±48,0 127,7	418,7±29,5 112,7	404,5±42,0 108,9	467,2±80,6 125,8	445,5±86,4 119,9
Амбулаторная активность	295,5±37,3 100,0	359,3±33,6 121,6	321,2±28,7 108,7	321,3±37,1 108,7	353,2±70,7 119,5	343,2±69,0 116,1
Стереотипные движения	46,8±4,8 100,0	62,7±8,4 134,0	51,8±5,4 110,7	46,3±4,9 98,9	62,8±7,8 134,2	55,0±8,2 117,5
Время неактивности («отдых»)	489,0±13,3 100,0	454,7±14,9 93,0	476,7±9,4 97,5	473,7±13,6 96,9	457,0±19,8 93,5	461,8±24,7 94,4
Пройденная дистанция	369,8±39,8 100,0	460,7±58,4 124,6	426,2±51,6 115,3	428,0±62,9 115,7	449,2±87,0 121,5	459,3±98,1 124,2

Заключение. В условиях переменной стрессогенности, при свободном выборе комфортных условий в камере «Contextual Place Preference Box» по критерию «пройденная дистанция в зонах избегаемого и предпочитаемого отсеков» Pro-Leu проявил умеренное (0,5; 1,0; 5,0 мг/кг) или слабо выраженное (0,01 мг/кг) анксиолитическое действие. Улучшение



пролил-лейцином когнитивных функций в стрессогенных условиях (наиболее отчетливое при использовании в дозе 0,5 мг/кг), предположительно, связано с его противотревожным эффектом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимова Л.В. Изучение эффектов нейротропных олигопептидов на модели неассоциативного обучения: дисс. ... канд. биол. наук: 14.03.06 / Л.В. Максимова. – Мн: Ин-т фармакологии и биохимии НАН Беларуси, 2010. – 160 с.
2. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств. / Т.А. Воронина [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Гл. 16. – С. 264-275.
3. Новый метод оценки тревожно-фобических состояний у крыс / В.И. Родина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1992. – Т. 114, № 7. – С. 11-14.
4. Rat models of ADHD / T. Sagvolden, E.B. Johansen // Curr. Top. Behav. Neurosci. – 2012. – Vol. 9. – P. 301-315.

THE EFFECT OF DIPEPTIDE PRO-LEU ON THE LEVEL OF ANXIETY OF RATS IN CONDITIONS OF VARIABLE STRESS

Kravchenko E.V.¹, Bizunok N.A.², Dubovik B.V.²

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences, Belarus, 220084, Minsk, 5/2 Kuprevich Str., Republic of Belarus, kravchenko@iboch.by*

²*Educational Institution "Belarusian State Medical University", 220116, Minsk, Dzerzhinsky Ave., 83, Republic of Belarus*

Under conditions of variable stress, with a free choice of comfortable conditions in the "Contextual Place Preference Box" chamber according to the criterion of "distance traveled in the areas of avoided and preferred compartments", Pro-Leu showed moderate (0.5; 1.0; 5.0 mg/kg) or weakly expressed (0.01 mg/kg) anxiolytic effect. The improvement of cognitive functions by prolyl-leucine under stressful conditions (most pronounced when used at a dose of 0.5 mg/kg) is presumably associated with its anti-anxiety effect.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕТА-ЛАКТАМНОГО АНТИБИОТИКА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ НОВОЙ РЕЦЕПТОРНО-ФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Куприенко О.С.¹, Вашкевич И.И.¹, Зильберман А.И.¹, Кудрик И.Г.², Свиридов О.В.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, kuprienko@iboch.by

²Белорусский государственный ветеринарный центр, Республика Беларусь, 220005, г. Минск, ул. Красная, 19а

Бета-лактамы антибиотики составляют большой класс антимикробных препаратов, широко используемых как в гуманной, так и в ветеринарной медицине. В результате их применения для лечения животных остаточные количества этих фармсубстанций могут присутствовать в продовольственном сырье и пищевой продукции животного происхождения. Систематическое поступление в организм бета-лактамов провоцирует изменение микрофлоры пищеварительной системы и дисбактериоз, вызывает аллергические реакции и, что особенно опасно, становится причиной возрастания антибиотикорезистентности микроорганизмов.

В Беларуси, как и во многих странах мира, установлены максимальные допустимые уровни содержания остаточных количеств различных бета-лактамов антибиотиков (пенициллинов и цефалоспоринов) в пищевом сырье животного происхождения, мясных и молочных продуктах (Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 г. № 28, ТР ТС 021/2011, ТР ТС 033/2013, ТР ТС 034/2013, Commission Regulation (EU) № 37/2010 от 22 декабря 2009 г.). Для контроля соответствия пищевой продукции установленным требованиям применяются скрининговые исследования содержания антибиотиков в мясных и молочных продуктах чаще всего иммуноаналитическими методами. Подтверждение уровня загрязнения образцов и идентификация конкретного соединения могут далее выполняться инструментальными методами, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография в комбинации с масс-спектрометрией.

Наряду со средствами иммуноанализа в последнее время для определения бета-лактамов антибиотиков стали применяться биоаналитические системы лиганд-рецепторного взаимодействия на основе белков-рецепторов микроорганизмов, выполняющих у бактерий защитную функцию [1]. Важной характеристикой таких белков является их широкая групповая специфичность, то есть связывание целой группы антибиотиков, обладающих схожими структурами и одним и тем же механизмом воздействия на патогенную бактерию.

С использованием полученного рекомбинантного фрагмента рецепторного белка BlaR-CTD из *Bacillus licheniformis*, распознающего как пенициллины, так и цефалоспорины, разработана тест-система ИРФА–бета-лактамы для определения бета-лактамов антибиотиков и исследованы ее аналитические характеристики на примере определения в продуктах питания и пищевом сырье животного происхождения антибиотика ампициллина, представителя группы пенициллинов.

Материалы и методы исследования. Настоящую работу проводили с использованием рецепторно-ферментной тест-системы ИРФА–бета-лактамы, в состав которой входят следующие компоненты. Биосорбент, представляющий собой полистирольный планшет, на внутренней поверхности лунок которого через очищенные специфические антитела мыши иммунохимически иммобилизован рекомбинантный рецепторный белок BlaR-CTD. Стандарт ампициллина – лиофилизированный препарат, содержащий ампициллин. Из-за высокой лабильности бета-лактамов антибиотиков пробы для построения градуировочного графика тест-системы ИРФА–бета-лактамы готовятся из стандарта непосредственно перед проведением анализа. Конъюгат является бифункциональным соединением, состоящим из бета-лактамов антибиотика и фермента пероксидазы хрена. Буферные растворы для приготовления проб и разведения конъюгата имеют подобранные составы, благодаря которым нивелируются эффекты матрицы исследуемых образцов продуктов, обеспечивается высокая

чувствительность системы и стабильность ее технико-аналитических параметров. Компонентами тест-системы являются также моющий буфер для отмывки лунок планшета, хромоген-субстратная смесь и стоп-реагент, предназначенные для запуска и остановки ферментативной реакции, в которой нарабатывается окрашенное соединение.

Использовали продукты питания и пищевое сырье животного происхождения, которые по данным метода ВЭЖХ-МС (проводился в соответствии с ГОСТ 34533-2019 и ГОСТ 34137-2017) не содержат бета-лактамов антибиотиков (пенициллины и цефалоспорины). Для определения степени извлечения ампициллина нагружали молоко и молочные продукты до концентрации антибиотика 4 мкг/кг, мясо и субпродукты – 20 мкг/мл. Пробоподготовку образцов для исследования с помощью тест-системы ИФРА–бета-лактамов выполняли следующим образом. Аликвоту молока разводят буфером из набора в 10 раз. Экстракцию антибиотиков из остальных продуктов проводили четырехкратным избытком воды, затем разбавляли экстракт в 2-8 раз буфером из набора.

Анализ в тест-системе ИФРА–бета-лактамов проводили в 2 стадии (1 – высокоаффинное лиганд-рецепторное связывание и 2 – ферментативная реакция) с временами инкубации соответственно 60 мин и 15 мин без применения оборудования для перемешивания и нагревания.

Результаты. Тест-система ИФРА–бета-лактамов служит для выполнения прямого конкурентного рецепторно-ферментного анализа. В ходе анализа бета-лактамовые антибиотики в составе пробы и конъюгата конкурируют за сайты связывания рецепторного белка. Конъюгата связывается тем больше, чем меньше свободного (неконъюгированного) антибиотика содержится в пробе. Градуировочный график тест-системы ИФРА–бета-лактамов в координатах $\text{logit}(B_i/B_0)$ -lgC представляет собой прямую линию (рисунок). $\text{logit}(B_i/B_0) = \lg((B_i/B_0)/(1-B_i/B_0))$, где B_i – сигнал в лунках, в которые вносили градуировочные пробы, B_0 – сигнал в лунках с градуировочным раствором, не содержащим бета-лактамовых антибиотиков. C – концентрация ампициллина, нг/мл. Аналитическая чувствительность предложенной тест-системы ИФРА–бета-лактамов составляет 0,08 нг/мл, градуировочная прямая строится в диапазоне концентраций ампициллина от 0,08 до 1,00 нг/мл, коэффициент вариации полученных результатов не более 10%.

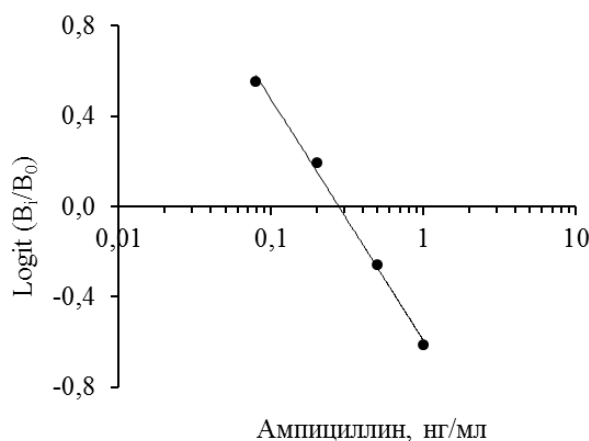


Рисунок. Градуировочный график тест-системы ИФРА–бета-лактамов

С использованием тест-системы ИФРА–бета-лактамов проведено определение бета-лактамовых антибиотиков в образцах продуктов питания и пищевом сырье животного происхождения. Показана чистота исследуемых образцов: содержание в них бета-лактамовых антибиотиков было менее 0,8 мкг/кг для сухого обезжиренного молока (после



восстановления), молока пастеризованного, сыворотки сухой (после восстановления), сметаны, йогурта, масла, творожной пасты, менее 1,6 мкг/кг для молока концентрированного и молочного коктейля, менее 3,2 мкг/кг для мяса и почек. При исследовании образцов с добавкой открытие (извлечение) ампициллина варьировалось от 96% до 135%.

Таблица. Определение антибиотика ампициллина тест-системой ИФРА–бета-лактам

Образец	Ампициллин, мкг/кг		Открытие, %
	внесено	определено	
Сухое обезжиренное молоко	0	Менее 0,8	-
	4	3,83	96
Молоко пастеризованное	0	Менее 0,8	-
	4	4,06	101
Сыворотка сухая	0	Менее 0,8	-
	4	4,16	104
Молоко концентрированное	0	Менее 1,6	-
	4	4,40	110
Коктейль молочный	0	Менее 1,6	-
	4	4,53	113
Сметана	0	Менее 0,8	-
	4	4,40	110
Йогурт	0	Менее 0,8	-
	4	3,83	96
Масло	0	Менее 0,8	-
	4	5,38	135
Творожная паста	0	Менее 0,8	-
	4	4,27	107
Мясо	0	Менее 3,2	-
	20	20,61	103
Почки	0	Менее 3,2	-
	20	24,87	124

Таким образом, тест-система ИФРА–бета-лактам может быть использована для измерения содержания ампициллина в продуктах питания и пищевом сырье с надлежащими показателями точности и пределом обнаружения существенно более низким, чем максимально допустимые уровни этого антибиотика (4 мкг/кг для молока, 50 мкг/кг для мяса и субпродуктов).

ЛИТЕРАТУРА

1. Development of a direct ELISA based on carboxy-terminal of penicillin-binding protein BlaR for the detection of β -lactam antibiotics in foods / J. Peng [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2013. – Vol. 405. – P. 8925-8933.



DETERMINATION OF A BETA-LACTAM ANTIBIOTIC IN FOODSTUFFS AND FOOD RAW MATERIALS OF ANIMAL ORIGIN USING A NEW ENZYME-LINKED RECEPTOR ASSAY SYSTEM

Kuprienko O.S.¹, Vashkevich I.I.¹, Zilberman A.I.¹, Kudrik I.G.², Sviridov O.V.¹

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084 Belarus, kuprienko@iboch.by*

²*Belarusian State Veterinary Center, Minsk, Belarus*

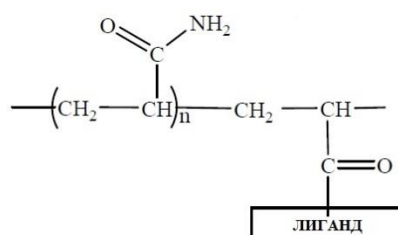
A test system, named ELRA–beta-lactam and intended for an enzyme-linked receptor assay of beta-lactam antibiotics, was developed and used for the determination of ampicillin in foods. It was found that the ELRA–beta-lactam had the limit of detection below 0.08 ng/ml, the coefficient of variation of the assay results was less than 10%, and recovery values were in the range from 96 to 135%.

ПОЛУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ IGG-СВЯЗЫВАЮЩИХ ГЕМОСОРБЕНТОВ НА ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ОСНОВНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Лапко А.В., Семков И.Д., Голубович В.П.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, gormoshkina@gmail.com*

Полиакриламидный гель – наиболее распространенная матрица, используемая на сегодняшний день в эфферентной медицине Республики Беларусь. Выбор полиакриламидной матрицы обусловлен ее стабильностью, биологической инертностью, возможностью введения лиганда на стадии полимеризации. По разработанной в лаборатории системе оценки гемосовместимости ранее было установлено, что данный тип матрицы обладает достаточно высокой степенью гемосовместимости. Нити линейного полимера акриламида, сшитые N,N'-метиленбисакриламидом, образуют относительно жесткую и химически инертную пространственную сетку геля, хорошо удерживающую воду. Пористость и жесткость геля определяется процентным содержанием в нем полимера. Сорбент представляет собой полиакриламидный гель с иммобилизованным на нем аминокислотным или пептидным лигандом (аминокислоты Phe, Trp, Tyr и пептиды Phe-DTyr, β Ala-Tyr, Gln-Phe-Phe-Tyr-OEt), в котором участок полимерной цепи с лигандом представлен формулой:



где $n = 1\text{--}70$ – число звеньев полиакриламидной цепи между центрами иммобилизации лигандов, а число участков цепи с лигандом составляет 50–10000, при этом сорбент содержит полиакриламид, лиганд и воду при следующем их соотношении, мас. %: полиакриламид 5–10; лиганд 0,5–1,5; вода остальное [1].

Для получения сорбента для извлечения из биологических жидкостей иммуноглобулинов G к мономерам акриламиду и метиленбисакриламиду добавляют ацилированный акрилоилхлоридом лиганд (аминокислоту или пептид), растворенный в 1 М растворе гидроксида натрия. К полученной смеси добавляют в качестве инициаторов



полимеризации аммоний надсернокислый и натрий метабисульфит, полученный гель измельчают и многократно промывают дистиллированной водой и 0,9% раствором хлорида натрия.

Гидрогель на основе полиакриламида не растворяется в воде, но, будучи по природе гидрофильным соединением, сильно набухает. По физико-химическим свойствам данное соединение имеет некоторое сходство с живыми тканями: оно эластично, легко проницаемо для многих молекул и содержит в своем объеме большое количество воды. В процессе перфузии крови через такой гемосорбент она взаимодействует с более «привычной» биосовместимой поверхностью. В полиакриламидном геле имеются поры, которые обеспечивают эффективный транспорт извлекаемых субстратов в объем полимера с дальнейшим их связыванием лигандом [2].

Изучение физико-химических и биологических свойств проводилось по основным показателям, требуемым для образцов изделий медицинского назначения. К ним относятся: внешний вид субстанции, водородный показатель, объем образца, потеря массы полиакриламидного геля при высушивании, относительный показатель связывания иммуноглобулина G сорбентом, удельная емкость и количество лиганда, иммобилизованного в геле.

Контроль внешнего вида гемосорбента проводился визуально при температуре $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Гель представляет собой полимер, сформированный в виде волокон и гранул, светло серого цвета, без посторонних включений, полностью покрытый 0,9% раствором NaCl по всему объему.

Водородный показатель (pH) раствора натрия хлорида изотонического 0,9%, равновесного с гемосорбентом, определяли с помощью лабораторного pH-метра. За результат определения принимали среднее арифметическое значение двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 0,2 единицы pH. В результате pH для различных лигандов колеблется в диапазоне от 6,5 до 8,0.

Для контроля объема гемосорбента содержимое емкости с гелем перенесли в мерный цилиндр и оставили на 10 мин для оседания и уплотнения слоя гемосорбента, затем определили объем по разнице между верхней и нижней границами слоя сорбента, который составил не менее 30 мл.

Определение потери массы гемосорбента при высушивании проводили следующим способом. Около 2 г геля помещали на капроновую сетку, находящуюся на воронке для фильтрования, позволяли раствору натрия хлорида изотонического стечь в приемник и просушивали гемосорбент на бумажном фильтре в течение 3 мин. Затем 1,00 г гемосорбента высушили при $100\text{--}105^\circ\text{C}$ до постоянной массы в стеклянном бюксе. Препарат считается высушенным до постоянной массы, если расхождение результатов двух последовательных взвешиваний не превышает 0,5%. Потерю массы гемосорбента определяли по формуле:

$$m_{\text{п.м.}} (\%) = (1 - m) \times 100,$$

где m – масса гемосорбента после высушивания, г; $m_{\text{п.м.}}$ – потеря массы гемосорбента при высушивании, %.

Таким образом, потеря массы полиакриламидного геля при высушивании составила 77–86%.

Относительный показатель связывания иммуноглобулина G сорбентом определялся с помощью метода иммуноферментного анализа. Предварительно навески в 1 г геля инкубировались с известным количеством иммуноглобулина G. Далее отбирались пробы, и в них определялось содержание несвязавшегося иммуноглобулина. Расчёт связанного сорбентом иммуноглобулина проводили по формуле:

$$\text{Отн}_{\text{св}} (\%) = 100 - c_{\text{кон}} \times 100 / c_{\text{нач}},$$



где $c_{\text{нач}}$ — начальная концентрация иммуноглобулина, мг/мл;

$c_{\text{кон}}$ — конечная концентрация иммуноглобулина, мг/мл.

В результате проведенных испытаний разброс относительного показателя связывания иммуноглобулина класса G для различных лигандов составил от 35,3 до 81,9%, что требует в дальнейшем дополнительных исследований и оптимизации процесса для подбора наилучшего лиганда в гемосорбент.

Содержание лигандов, иммобилизованных в геле, относительно их начального количества определялось по ароматическим аминокислотам методом спектрофотометрии и составило от 64 до 76%.

Таким образом, получен ряд образцов биоспецифических сорбентов на основе полиакриламидной матрицы для удаления из крови и других биологических жидкостей иммуноглобулинов класса G и изучены их физико-химические и биологические характеристики, которые в достаточно полной мере соответствуют требованиям, предъявляемым к данному типу изделий медицинского назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сорбент для извлечения из биологических жидкостей бактериальных эндотоксинов и способ его получения / Гапанович В.Н. [и др.] – Патент РБ № BY 15108 от 30.12.2011.
2. Биоспецифическая сорбция: состояние проблемы и перспективы развития / И.М. Ровдо, В.В. Кирковский // Белорусский медицинский журнал. – 2003. – № 2. – С. 112-114.

OBTAINING THE SAMPLES OF BIOSPECIFIC IGG-BINDING HEMOSORBENTS BASED ON POLYACRYLAMIDE GEL AND STUDYING THEIR BASIC PHYSICO- CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES

Lapko A.V., Semkov I.D., Golubovich V.P.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084 Belarus, gormoshkina@gmail.com*

A number of samples of biospecific sorbents for the removal of immunoglobulin G from blood and other biological fluids based on a polyacrylamide matrix were obtained and their physicochemical and biological characteristics were studied, which fully meet the requirements for this type of medical devices.



СРАВНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВЯЗЫВАНИЯ IgG ОБРАЗЦАМИ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕМОСОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ ОЛИГОПЕТИДОВ С ПРОТЕИНОМ А СОДЕРЖАЩИМ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫМ ГЕЛЕМ

Лапко А.В., Голубович В.П.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, gormoshkina@gmail.com*

Протеин А – элемент клеточной стенки золотистого стафилококка, который обладает высокой степенью сродства к Fc-фрагменту иммуноглобулинов класса G (IgG) и блокирует при внедрении бактерии процесс нормального фагоцитоза в иммунном ответе [1]. В настоящее время данный белок используется в ряде сорбентов в качестве лиганда, связывающего иммуноглобулины из крови человека. Уровень общего иммуноглобулина G в крови составляет 7-16 г/л, а при наличии аутоиммунных заболеваний данное значение повышается (вплоть до 10-кратных значений) в зависимости от различных факторов: нозологической формы, степени развития и тяжести протекания заболевания. Использование сорбционных методов терапии позволяет быстро и качественно снизить уровень антител, облегчив тем самым симптоматику текущего заболевания. При использовании данного метода абсолютный негативный эффект от удаления антител из крови человека не может быть достигнут по причине того, что данная процедура ограничена емкостью сорбента. Например, для колонок Immunosorba (Excorim, Lund, Sweden), где в качестве лиганда содержится протеин А, а матрицей служит сефароза, сорбционная емкость по IgG достигает 20-25 мг/мл, т.е. одна доза сорбента способна связать до 1,25-1,5 грамм IgG [2]. Удаление такого количества иммуноглобулина G существенно не ухудшит иммунный статус, но при этом позволит избавиться от определенного количества аутоантител, улучшив таким образом состояние пациента.

Ранее нами были получены образцы гемосорбентов на полиэтиленовой матрице с различными аминокислотными и олигопептидными лигандами, которые продемонстрировали достаточно высокие показатели связывания IgG [3]. Однако, в связи с тем, что наиболее распространенной в текущий момент матрицей у нас в стране является полиакриламидный гель, было решено испытать полученные лиганды на данном типе носителя.

Для сравнительной характеристики эффективности связывания IgG образцами гемосорбентов использовались пептиды β Ala-Tyr, Gln-Phe-Phe-Tyr-OEt (аналог эпитопа протеина А) и сорбент с протеином А (SpA). Для получения полиакриламидного геля вышеперечисленные лиганды подвергались ацилированию акрилоилхлоридом вместе с 1М раствором гидроксида натрия. После этого в раствор вносились мономеры акриламид и метиленбисакриламид и инициаторы полимеризации. Полученный гель измельчали для образования волокон и многократно промывали до исчезновения в промывочном растворе следовых количеств лигандов, не связавшихся с матрицей. На каждом этапе промывки содержание лигандов контролировалось спектрофотометрически по ароматическим аминокислотам. Так, для пептида β Ala-Tyr потери составили на первой промывке 20%, на второй – 6%, третьей – 1%. На остальных этапах количество несвязавшегося лиганда незначительно. Суммарно связалось около 73% внесенного в раствор лиганда. Потери тетрапептида после всех стадий промывки составили в общей сумме около 50%, что нуждается в дальнейшей доработке и совершенствовании методики. Для протеина А данный показатель равняется 55,5%, что, в принципе, сопоставимо с пептидным аналогом его активного центра связывания.

Функциональная активность исследуемых образцов и сравнение их с протеином А подтверждалась методом модельного эксперимента на плазме крови человека. Для этого образцы геля инкубировались с точным объемом плазмы с известной концентрацией IgG в течение 60 минут при температуре 37°C. На тридцатой минуте была отобрана промежуточная проба плазмы. Количество несвязавшегося сорбентом IgG определяли методом иммуноферментного анализа. По результатам проведенных исследований установлено, что



связывание IgG сорбентом с лигандом β Ala-Тур составляет на 30-ой минуте 49,66%, на 60-ой минуте – 51,61%, для Gln-Phe-Phe-Тур-OEt снижение уровня составило на 30-ой минуте – 62,37%, на 60-ой – 53,48% от начальной концентрации иммуноглобулина. Матрица с протеином А сорбировала IgG в количестве 73,81% на 30-ой минуте и 55,61% на 60-ой.

Согласно полученным данным по снижению уровня IgG в плазме была рассчитана сорбционная емкость синтезированных образцов сорбентов. Для сорбента с лигандом β Ala-Тур она составила 6,09 мг IgG на грамм геля, для сорбента с Gln-Phe-Phe-Тур-OEt – 7,65 мг IgG, для сорбента с протеином А – 9,05 мг.

Таким образом, полученные образцы биоспецифических иммуноглобулин-связывающих гемосорбентов являются функционально активными в отношении общего иммуноглобулина G. При этом следует отметить схожесть по характеру взаимодействия сорбентов с протеином А и его сконструированным тетрапептидным аналогом в динамике связывания IgG по времени. Более того гель с тетрапептидом лишь на 10% уступает по сорбционному показателю сорбенту с нативным белком, что свидетельствует о достоверности моделирования и разработки лиганда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity / M. Graille [et al.] // PNAS. – 2000. – Vol. 97(10). – P. 5399-5404.
2. Protein A-based adsorbents for antibodies removal / J. Ren [et al.] // Comprehensive Biotechnology (Second Edition). – 2011. – Vol. 5. – P. 729-739
3. Разработка гемосорбентов для связывания IgG на основе олигопептидных лигандов / А.В. Лапко [и др.] // Известия Национальной академии наук Беларуси. – 2016. – Т. 1. – С. 57-60.

COMPARISON OF IGG BINDING SCORE BY SAMPLES OF BIOSPECIFIC HEMOSORBENTS BASED ON OLIGOPETIDES WITH PROTEIN A CONTAINING POLYACRYLAMIDE GEL

Lapko A.V., Golubovich V.P.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084 Belarus, gormoshkina@gmail.com*

The resulting samples of biospecific immunoglobulin-binding hemosorbents are functionally active against total immunoglobulin G. At the same time, it should be noted that the nature of the interaction of sorbents with protein A and its engineered tetrapeptide analogue in the dynamics of IgG binding over time is similar. Moreover, the gel with a tetrapeptide is only 10% inferior in terms of sorption score to the sorbent with native protein, which indicates the reliability of the modeling and development of the ligand.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СОПУТСТВУЮЩИХ ПРИМЕСЕЙ В ГЕНЕРИЧЕСКОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ НА ОСНОВЕ ТИКАГРЕЛОРА

Литвинюк А.И., Рак А.И., Гудович В.В., Юрکشтович Н.К.

*Государственное предприятие «АКАДЕМФАРМ», 220084, г. Минск,
ул. Академика В. Ф. Купевича, д.5, к.3, info@academpharm.by*

Введение. В работе представлены результаты валидации методики определения содержания сопутствующих примесей в готовой лекарственной форме на основе субстанции тикагрелора методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). При валидации методики проводился анализ по следующим показателям: пригодность



хроматографической системы, специфичность, правильность, сходимость, линейность, диапазон применения методики, стабильность растворов, робастность методики [1].

Цель работы – экспериментально доказать, что методика пригодна для определения содержания сопутствующих примесей в генерическом лекарственном препарате (ЛП) на основе тикагрелора и гарантирует получение ожидаемых и воспроизводимых результатов.

Материалы и методы. Определение содержания сопутствующих примесей в генерическом ЛП на основе тикагрелора проведено методом ВЭЖХ на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200. Условия хроматографирования: колонка Zorbax SB-C18, длиной 150 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, с размером частиц 1,8 мкм; подвижная фаза А: фосфатный буферный раствор pH 3,0; подвижная фаза В: ацетонитрил; скорость подвижной фазы: 1,0 мл/мин; длина волны детектора: 242 нм; объём вводимой пробы: 20 мкл; температура колонки: 40°C; время интегрирования: 30 мин. Использован стандартный образец тикагрелора EP CRS и стандартный образец для проверки пригодности системы EP CRS.

Результаты. Пригодность хроматографической системы определяли по пяти последовательным заколам раствора сравнения (b), который содержит стандартный образец тикагрелора, раствору сравнения (c) и раствору для проверки чувствительности.

На хроматограммах растворов сравнения относительное стандартное отклонение площади пика тикагрелора не превысило 2,0%, эффективность колонки, рассчитанная по пику тикагрелора, составила более 100000 теоретических тарелок, коэффициент асимметрии пика тикагрелора находился в диапазоне 0,8-2,0, разрешение между пиком примеси В и пиком тикагрелора составило 5,8, среднее значение отношения сигнал/шум получили 18, что доказало применимость системы для проведения испытания определения содержания сопутствующих примесей.

Специфичность методики подтверждали доказательством разделения продуктов разложения и действующего вещества после стрессовых воздействий, исследовали влияние плацебо на определение основных компонентов. На хроматограммах раствора плацебо отсутствовали пики, совпадающие по времени удерживания с тикагрелором и основными примесями. На хроматограмме раствора тикагрелора после кислотного и щелочного гидролиза, термического воздействия, воздействия ультрафиолетовым излучением и окисления пероксидом водорода минимальное разрешение между пиком тикагрелора и близкореагирующим продуктом деградации составило более 1,5. Установленные значения относительных времен удерживания R_f идентифицированных примесей составили: примесь А – 0,57, примесь В – 1,05, примесь С – 1,23, примесь D – 1,38.

Линейность методики подтверждали на 10 уровнях концентраций, на всем диапазоне применения методики (см. *диапазон применения методики*). Диапазон применения устанавливали от предела количественного определения (ПКО) до 150% от предельного содержания единичной примеси. Корректность линейной зависимости для тикагрелора подтверждена коэффициентом корреляции, который составил $r = \sqrt{R^2} \rightarrow \sqrt{0,9999} = 0,9998$. ПКО для единичных примесей составил 0,03%.

Правильность методики определения сопутствующих примесей проверяли на 4 модельных смесях различных концентраций на всем диапазоне методики (см. *диапазон применения методики*). Расчет проводили методом внешнего стандарта. Правильность оценивали систематической составляющей неопределенности, которая не превысила свой доверительный интервал.

Сходимость методики изучали на испытуемых растворах, подвергнутых УФ-облучению. Подтверждением сходимости явилось относительное стандартное отклонение среднего значения (RSD, %), значение которого не превысило 2,0%.

Диапазон применения методики устанавливали 30% – 150% от предельного значения единичной примеси.

Стабильность растворов изучалась на растворе сравнения (b) и испытуемых растворах в течение 12 часов в автосамплере при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Доказательством стабильности



растворов послужила разность между количеством действующего вещества в день приготовления и после хранения, которая не превысила 2,0%.

Робастность методики изучали путем незначительных изменений условий хроматографирования, а именно изменений температуры термостата колонки. За критерий приемлемости взяли выполнение критериев проверки пригодности хроматографической системы (см. *пригодность хроматографической системы*) и доказали, что при незначительных изменениях параметров методика остается устойчивой.

Заключение. Валидация методики определения сопутствующих примесей в готовой лекарственной форме на основе субстанции тикагелора методом высокоэффективной жидкостной хроматографии выполнена в соответствии с аналитическими характеристиками метода: специфичность, правильность, сходимость, линейность, робастность, стабильность растворов. По каждому из проведенных испытаний получены результаты, удовлетворяющие критериям приемлемости.

Методика прошла валидацию и может быть использована для рутинного определения сопутствующих примесей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II): в 2 т. / под общ. ред.: А. А. Шерякова. – Молодечно: Победа, 2012. – Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств. – С. 895.

VALIDATION OF METHOD FOR THE DETERMINATION OF RELATED SUBSTANCES CONTENT IN TICAGRELOR GENERIC DRUG

Litviniuk A., Rak A., Gudovich V., Yurkshtovich N.

State Enterprise «ACADEMPHARM», academician Kuprevich str., 5/3, 220084, Minsk, Republic of Belarus, info@academpharm.by

The results of the validation of related substances of generic drug based on ticagrelor by HPLC are presented. The following parameters: specificity, accuracy, precision, robustness, stability, linearity, and range were determined during the validation.

ИНДОКСАНИБ (СУНИТИНИБ) – ТАРГЕТНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ, ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ И НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

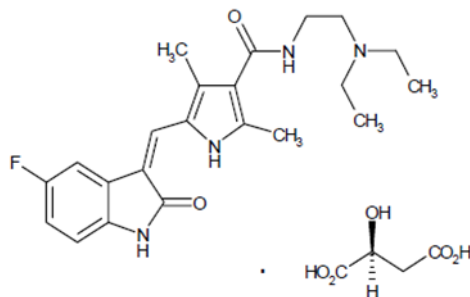
Лобов А.Ю.¹, Коноплич А.В.¹, Малявко А.В.¹, Бабицкая С.В.¹, Тетерюкова А.Ю.²,
Балашова Л.А.², Лятун И.Ю.², Трушко В.А.², Калиниченко Е.Н.¹

¹*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, andreylov@iboch.by*

²*УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», 223040 Минский район, аг. Лесной, д. 31, clinic.head@antidoping.by*

В Институте биоорганической химии НАН Беларуси на базе НПЦ «ХимФармСинтез» разработана технология производства лекарственного препарата (ЛП) Индоксаниб (МНН – сунитиниб) в форме капсул дозировкой 50 мг. Индоксаниб имеет аналогичный качественный и количественный состав действующего вещества и ту же лекарственную форму, что и референтный препарат Сутент (Sutent, Pfizer Italia S.r.l.). Производство ЛП Индоксаниб осуществляется по полному циклу из отечественной фармацевтической субстанции сунитиниба малата, зарегистрированной в Республике Беларусь.

Основным достижением в терапии ряда онкологических заболеваний за последние десятилетия является образование нового класса таргетных препаратов, действие которых направлено на определенные, заранее установленные внутриклеточные молекулярные мишени, имеющие ключевое значение для жизнедеятельности опухолевой клетки. В основу таргетной терапии легли достижения в понимании ключевых клеточных сигнальных путей и генетических факторов, приводящих к возникновению и прогрессии новообразования. К данному классу препаратов относятся антитела и малые молекулы, в т.ч. ингибиторы тирозинкиназ, в частности – сунитиниб.



В исследованиях *in vitro* установлено ингибирующее действие сунитиниба, реализующееся в отношении различных рецепторных тирозинкиназ, участвующих в процессах роста опухолей, патологического ангиогенеза и метастатического прогрессирования опухоли. В доклинических исследованиях продемонстрирована противоопухолевая активность сунитиниба и его активного метаболита.

Результаты, полученные в ходе проведенных клинических исследований сунитиниба, подтверждают его безопасность и высокую эффективность при терапии пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями при резистентности/непереносимости предшествующей терапии иматинибом, пациентов с метастатической почечно-клеточной карциномой (как ранее не получавших лечение, так и при резистентности/непереносимости предшествующей терапии цитокинами) и пациентов с нейроэндокринными опухолями поджелудочной железы. В указанных популяциях пациентов сунитиниб характеризуется приемлемой переносимостью и хорошо изученным профилем безопасности. Сунитиниб разрешен к применению в клинической практике во многих странах мира (США, Европейский союз, Российская Федерация и др.).

С целью определения биоэквивалентности разработанного ЛП Индоксаниб референтному ЛП Сутент проведено открытое с ослеплением биоаналитического этапа рандомизированное перекрестное с 2 периодами и 2 последовательностями исследование биоэквивалентности ЛП Индоксаниб и Сутент, с приемом однократной дозы натошак взрослыми здоровыми субъектами мужского пола (код NDXNB-IBOCH-2021) в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности ЛП в рамках ЕАЭС (2016). Полученные в исследовании данные необходимы для государственной регистрации препарата Индоксаниб на территории стран ЕАЭС, включая Республику Беларусь.

Клинической и биолого-статистической базами выступила УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория»; аналитической базой – испытательная лаборатория отдела контроля качества НПЦ «ХимФармСинтез».

Клинический этап исследования



Рисунок 1. Дизайн и этапы исследования

По результатам скринингового обследования (оценка с помощью лабораторных, инструментальных методов исследования, физикального обследования, оценка соответствия



критериям включения/невключения) 58 потенциальных субъектов в исследование было включено 36 здоровых субъектов мужского пола. 34 субъекта полностью завершили клинический этап исследования. Два субъекта от участия в исследовании отказались по семейно-бытовым обстоятельствам.

Медиана возраста включенных в исследование субъектов составила 31,5 лет (от 19 до 43 лет), веса – 79,1 кг (от 64,0 до 101,6 кг), ИМТ – 25,2 кг/м² (от 20,9 до 28,8 кг/м²), а роста – 177,0 см (от 170,0 до 189,0 см). Все исходные показатели лабораторных исследований у включенных субъектов соответствовали норме или их отклонения от нормы были расценены врачами-исследователями как клинически незначимые. Субъекты, включенные в исследование, были распределены случайным образом на две группы по 18 человек.

В ходе клинического этапа субъекты принимали внутрь по 1 капсуле (соответствует 50 мг сунитиниба) однократно в каждом периоде исследования. Отбор крови производился за 30 мин до приема ЛП, а также через 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 5 ч 30 мин, 6 ч, 6 ч 30 мин, 7 ч, 7 ч 30 мин, 8 ч, 8 ч 30 мин, 9 ч, 9 ч 30 мин, 10 ч, 10 ч 30 мин, 11 ч, 11 ч 30 мин, 12 ч, 12 ч 30 мин, 13 ч, 14 ч, 16 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч и 72 ч после приема препарата в каждом периоде исследования.

Данные по безопасности (характер, частота и выраженность нежелательных явлений [НЯ]) были проанализированы у всех субъектов, получивших хотя бы одну дозу исследуемого препарата или препарата сравнения, на протяжении всего времени участия в исследовании.

В исследовании зарегистрировано 42 случая НЯ, которые наблюдались у 23 (64%) из 36 субъектов, участвовавших в исследовании. НЯ включали нарушения со стороны нервной системы (2 случая после приема ЛП Индоксаниб и 3 случая после приема ЛП Сутент), пищеварительной системы (5 случаев – ЛП Индоксаниб и 1 случай – ЛП Сутент) и изменения лабораторных показателей (22 случая – ЛП Индоксаниб и 9 случаев – ЛП Сутент). Причинно-следственная связь всех зарегистрированных НЯ классифицирована как условная или вероятная. Не наблюдалось ни одного случая НЯ со степенью тяжести 2-5 (по критериям классификации НЯ Национального института рака, версия 5.0, СТСАЕ 5.0), не было отмечено серьезных НЯ/НР или смерти у субъектов, принимавших исследуемые ЛП.

В данном исследовании установлено, что однократный прием взрослыми здоровыми субъектами тестируемого ЛП Индоксаниб, капсулы 50 мг и референтного ЛП Сутент, капсулы 50 мг, натошак был безопасен. Исследуемые препараты обладают приемлемым профилем безопасности и хорошо переносятся здоровыми субъектами.

Аналитический этап исследования

Определение аналита (сунитиниба) в плазме человеческой крови проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрическим детектированием. Испытания проводились с использованием масс-спектрометрического детектора с одинарным квадрупольным анализатором и электро-распылительным интерфейсом ионизации. Всего было проанализировано 3136 образцов плазмы крови.

Биолого-статистический этап исследования

На основе полученных данных о концентрации сунитиниба в тестируемом и референтном препаратах в плазме крови через дискретные интервалы времени рассчитывали внемодельным способом фармакокинетические параметры у каждого субъекта. После усреднения данных о концентрации сунитиниба в плазме крови субъектов исследования строили фармакокинетический профиль по средним концентрациям ЛП (тестируемого и референтного препарата) у «среднего» субъекта. Была проведена проверка гипотезы о биологической эквивалентности.

Нулевая статистическая гипотеза (H ₀) о бионеэквивалентности	Альтернативная статистическая гипотеза (H _A) о биоэквивалентности
H ₀ : $\text{Ln}\mu\text{T}-\text{Ln}\mu\text{R} < \text{LnQ1}$ или $\text{Ln}\mu\text{T}-\text{Ln}\mu\text{R} > \text{LnQ2}$	H _A : $\text{LnQ1} \leq \text{Ln}\mu\text{T}-\text{Ln}\mu\text{R} \leq \text{LnQ2}$

где Q_1 и Q_2 – нижняя и верхняя принятые допустимые границы биоэквивалентности, а μ_T и μ_R – генеральные средние показатели сравнения для тестируемого и референтного ЛП, соответственно.

Альтернативная гипотеза о биологической эквивалентности принимается, если 90% доверительные интервалы для отношения логарифмически преобразованных средних арифметических (тестового/референтного) фармакокинетических параметров C_{max} , $AUC_{(0-72)}$ (или для f' , f'' соответственно) с использованием 2 односторонних проверок нулевой гипотезы об отсутствии биоэквивалентности (о бионеэквивалентности) при 5% уровне значимости для каждого теста находятся в пределе 0,80 – 1,25 или 80,0 – 125,0% (что при логарифмической трансформации данных соответствует симметричному интервалу – 0,223 , 0,223).

По результатам биостатистического отчета (БО-07-22/1.0) принята гипотеза о биоэквивалентности ЛП Индоксаниб и Сутент, поскольку для сунитиниба выполняются критерии сопоставимости оценки сравнительной биодоступности по условию степени биоэквивалентности – доверительные интервалы для величин f' и f'' не превышают обычный диапазон 80,00 – 125,00% по максимальной концентрации данного соединения в плазме крови и площади под фармакокинетической кривой в условиях однократного приема натощак.

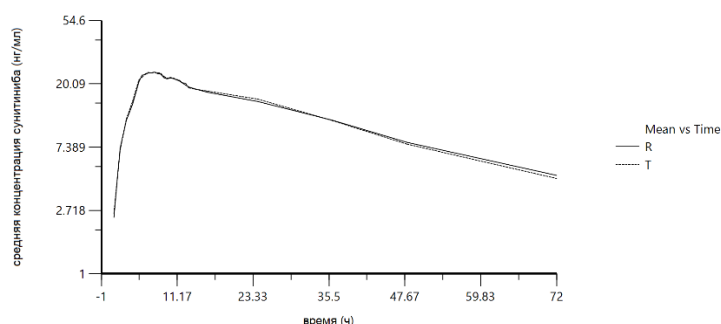


Рисунок 2. Усредненный фармакокинетический профиль по сунитинибу (R – Сутент, Т – Индоксаниб) в полулогарифмических координатах

Заключение. Установлена биоэквивалентность разработанного импортозамещающего лекарственного препарата Индоксаниб референтному препарату Сутент (Pfizer Italia S.r.l.).

INDOXANIB (SUNITINIB) IS A TARGETTED DRUG FOR THE TREATMENT OF GASTROINTESTINAL STROMALE TUMORS, RENAL CELL CARCINOMA AND NEUROENDOCRINE PANCREATIC TUMORS

Lobov A.Yu.¹, Konoplich A.V.¹, Malyavko A.V.¹, Babitskaya S.V.¹, Teteryukova A.Yu.², Balashova L.A.², Lyatun I.Yu.², Trushko V.A.², Kalinichenko E.N.¹

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, 220084, Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, Belarus, andreylobov@iboch.by*

²*National Anti-Doping Laboratory, 223040, ag. Lesnoy, 31, Minsk region, Belarus, clinic.head@antidoping.by*

A technology for the production of the medicinal product Indoxanib (INN – sunitinib) in the form of capsules has been developed. Indoxanib has a similar qualitative and quantitative composition of active ingredient as the reference drug Sutent (Pfizer Italia S.r.l.). The production of Indoxanib is carried out on a full cycle from the domestic pharmaceutical substance sunitinib malate, registered in the Republic of Belarus.

In order to determine the bioequivalence of the developed product Indoxanib to the reference drug Sutent, an open blinded bioanalytical stage randomized cross-over study with 2 periods and 2



sequences of the bioequivalence of Indoxanib and Sutent drugs was conducted, in accordance with the Rules for conducting bioequivalence studies of drugs in the EAEU.

In this study, it was found that Indoxanib and Sutent have an acceptable safety profile and are well tolerated by healthy subjects. Based on the obtained data on the concentration of sunitinib in the test and reference drugs in blood plasma at discrete time intervals, the hypothesis of the bioequivalence of Indoxanib and Sutent drugs was confirmed.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОИНТЕРФЕРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОВМЕСТИМОСТИ КОМПОНЕНТОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ТРАНСДЕРМАЛЬНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Макарова В.В.¹, Мандрик М.А.^{1,2}, Садковский И.А.^{1,2}, Голяк Н.С.³, Антонов С.В.¹

¹Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева РАН, 119991, ГСП-1, Российская Федерация, г. Москва, Ленинский пр., д. 29

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³Белорусский государственный медицинский университет, 220116, Республика Беларусь, г. Минск, пр. Дзержинского, 83, vvm@ips.ac.ru

Резюме. Рассмотрены возможности применения метода лазерной микроинтерферометрии для изучения и оценки совместимости компонентов при разработке трансдермального пластыря с мелоксикамом. Получены данные о совместимости мелоксикама с полиэтиленгликолем 400, триэтилцитратом и ацетилтрибутилцитратом в широком диапазоне температур. Показано, что с увеличением температуры растворимость мелоксикама в полиэтиленгликоле 400 и триэтилцитрате растет, в то время как в системе мелоксикам-ацетилтрибутилцитрат наблюдается полная несовместимость компонентов, связанная с малой полярностью растворителя. Полученные ранее данные по совместимости растворителей с гидроксипропилцеллюлозой позволяют использовать платформы на ее основе для создания трансдермальных терапевтических систем.

Ключевые слова: трансдермальные терапевтические системы, мелоксикам, лазерная микроинтерферометрия.

Актуальность. Обеспечение высокой комплаентности, то есть неукоснительного соблюдения пациентом предписаний и рекомендаций, в первую очередь по приему лекарственных препаратов, полученных от лечащего врача, является важной задачей современной системы здравоохранения. Вместе с тем, ни правильное информирование пациента, ни повышение его мотивации не гарантируют точного соблюдения назначения, что особенно ярко проявляется в случаях с гериатрическими пациентами, у которых зачастую проявляются прогрессирующие возрастные изменения: нарушение зрения, слуха, а также когнитивных функций. Таким образом, разработка систем доставки лекарственных средств, нивелирующих риск их неправильного применения, является актуальной задачей фармацевтической науки.

Трансдермальные терапевтические системы (ТТС), обладающие рядом преимуществ, такими как контролируемое высвобождение, отсутствие эффекта первого прохождения, простота использования, и обеспечивающие высокую комплаентность представляют большой интерес и становятся всё более востребованнее. При этом наибольшее распространение получили трансдермальные пластыри матричного типа (drug-in-adhesive), принципиально состоящие из двух частей: внешний покровный слой (непроницаемая пленка) и адгезионная матрица, содержащая как действующие, так и вспомогательные вещества, зачастую представленные не только полимерной основой, но и пластификаторами, стабилизаторами, усилителями проницаемости и др. Скорость высвобождения активной фармацевтической субстанции (АФС) из адгезионной матрицы в первую очередь определяется концентрацией



АФС. При этом получение трансдермального пластыря, в адгезионной матрице которого содержится АФС в кристаллической форме возможно, но является нежелательным и должно строго нормироваться, так как проходящие процессы растворения и кристаллизации АФС способны влиять на кинетику высвобождения действующего вещества. Спонтанная же кристаллизация АФС при хранении не допускается. Таким образом, при разработке трансдермальных пластырей большое значение приобретают данные о фазовом состоянии многокомпонентных композиций, взаимной растворимости АФС и вспомогательных веществ, и ее изменении с температурой, а также скорости диффузионных процессов.

Для получения этих данных представляется целесообразным использование метода лазерной микроинтерферометрии. Этот метод, получивший заметное распространение в исследовании фазового состояния полимерных систем, основан на явлении интерференции света в клиновом зазоре, которое позволяет следить за взаимодиффузией компонентов бинарной системы. В оптическую ячейку, образованную полупроницаемыми стеклами, помещаются и приводятся в контакт бок о бок вещества, диффузия между которыми исследуется. Твердые вещества при этом помещаются в виде пленки, а жидкие доливают с торцов ячейки. Прохождение пучка света от лазерного источника через ячейку обуславливает появление интерференционной картины, наблюдаемой посредством оптического микроскопа, оснащенного камерой. Частота интерференционных полос при этом оказывается пропорциональной коэффициенту преломления среды, через которую проходит световой поток. Процесс взаимной диффузии компонентов приводит к искривлению интерференционных полос в диффузионной зоне, причем степень искривления оказывается пропорциональной объемной доле компонентов в данной точке. Таким образом, зная коэффициенты преломления компонентов, можно рассчитать их соотношение в каждой точке диффузионной зоны в данный момент времени. Проводя эксперимент при фиксированной температуре, можно определить границы растворимости компонентов и коэффициенты их взаимодиффузии, а выполняя сканирование по температуре, оказывается возможным получить в ходе одного эксперимента зависимость растворимости компонентов от температуры и построить фазовую диаграмму системы. Важнейшим преимуществом метода лазерной микроинтерферометрии является экспрессность и низкая трудоемкость экспериментов. При этом методу присущи и определенные недостатки. Во-первых, необходимым условием эксперимента является оптическая прозрачность хотя бы одного из компонентов, а также значение разности показателей компонентов не менее 10^{-3} . Кроме этого, лазерная интерферометрия пригодна в основном для исследования бинарных систем, дополнительные компоненты усложняют расшифровку интерференционной картины.

Цель. В настоящей работе рассматриваются возможности метода лазерной микроинтерферометрии на примере задач, поставленных при разработке трансдермального пластыря с мелоксикамом.

Материалы и методы. В качестве АФС использовали субстанцию мелоксикама (Aurobindo Pharma Ltd., 5.M06). Мелоксикам – нестероидное противовоспалительное средство с молекулярной массой активного вещества 351 Да и суточной дозировкой от 7,5 мг, что делает его потенциальным кандидатом на использование в трансдермальных пластырях. Кажущийся коэффициент распределения ($\log P$) мелоксикама в системе *n*-октанол/буфер с pH 7,4 составляет 0,1 [1], что указывает на довольно высокую степень гидрофильности этой молекулы. Исходя из этого, в качестве кандидатов на роль растворителей АФС были предложены следующие относительно гидрофильные вещества, способные также выступать в качестве пластификаторов полимерных систем: полиэтиленгликоль 400 (ПЭГ 400, ООО ТД «Химмед»), триэтилцитрат (ТЭЦ, ООО ТД «Химмед»), ацетилтрибутилцитрат (АТБЦ, ООО ТД «Химмед»). В качестве полимерной основы адгезионной матрицы была предложена гидрофильная гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ), совместимость которой с ПЭГ-400 и ТЭЦ исследовалась ранее [2]. В соответствии с поставленной задачей, в работе исследовали



совместимость компонентов в системах мелоксикам – ПЭГ-400, мелоксикам – ТЭЦ и мелоксикам – АТБЦ

Растворимость мелоксикама в растворителях исследовали методом лазерной интерферометрии. Методика проведения измерений, и обработка интерферограмм не отличались от традиционных [3]. Порошок мелоксикама предварительно спрессовывали и далее помещали между двумя полупрозрачными стеклами, формируя диффузионную ячейку. Растворитель доливали в зазор. Измерения проводили в режиме ступенчатого подъема и снижения температуры от 25 до 160°C. Момент соприкосновения компонентов считали началом диффузионного процесса. В качестве источника света использовали модульный лазер KLM-A532-15-5 с длиной волны 532 нм. Интерференционную картину фиксировали с помощью цифровой видеокамеры с передачей изображения на компьютер. Показатели преломления компонентов определяли с помощью рефрактометра ИФР-22, оснащенного масляным термостатом Huber.

Результаты. По данным лазерной микроинтерферометрии при контакте порошка мелоксикама с ПЭГ-400 и ТЭЦ образуются незначительные загибы интерференционных полос вблизи межфазной границы со стороны растворителя, что свидетельствует о слабом растворении в них субстанции. С ростом температуры загибы усиливаются. На основании данных рефрактометрии построили концентрационные профили компонентов в диффузионной зоне при разных температурах и определили растворимости мелоксикама в растворителях. Так растворимость мелоксикама в ПЭГ 400 с ростом температуры от 25 до 150°C возрастает от 0,4 до 3,3 об. %, а в ТЭЦ – с 0,2 до 2,9 об. %. Эти значения близки к литературным данным, в частности, согласно работе [4] растворимость мелоксикама в ПЭГ-400 составляет порядка 0,82% масс. при 25°C, а по данным работы [5] она составляет при 35°C около 0,62%. Близость полученных величин к литературным данным указывает на возможность применения лазерной микроинтерферометрии для определения растворимости АФС. При контакте порошка мелоксикама с АТБЦ не происходило каких-либо изменений в интерференционных полосах, т.е. мелоксикам нерастворим в АТБЦ.

Для ранее исследованных систем ГПЦ-ПЭГ 400 и ГПЦ-ТЭЦ характерно наличие ЖК-равновесия при высоких концентрациях полимера [2]. При этом показано, что ГПЦ полностью растворима в ПЭГ 400 в диапазоне температур 25-200°C, а фазовая диаграмма системы содержит ЖК-ликвидус, выше которого растворы изотропны, а ниже – мезоморфны. В случае системы ГПЦ-ТЭЦ фазовое равновесие также содержит ЖК-фазу, однако наряду с этим присутствует аморфное расслоение в области малых и умеренных концентраций ГПЦ, что отражается на фазовой диаграмме в виде бинодали с ВКТР и ЖК-ликвидуса, соответственно.

Заключение. Результаты исследования демонстрируют возможность успешного применения метода лазерной микроинтерферометрии для изучения и оценки совместимости компонентов в ходе разработки трансдермального пластыря с мелоксикамом. В ходе работы были получены данные, позволившие рассчитать совместимость мелоксикама с растворителями в широком диапазоне температур. На основании изменений в интерференционной картине показано, что с ростом температуры растворимость мелоксикама в ПЭГ 400 и ТЭЦ растет, причем растворимость в ПЭГ-400 несколько выше, чем в ТЭЦ, в то время как для системы мелоксикам-АТБЦ наблюдается полная несовместимость в исследуемом температурном диапазоне, что, по всей видимости, связано с малой полярностью АТБЦ. Полученные ранее данные по совместимости ТЭЦ и ПЭГ-400 с ГПЦ позволяют использовать платформы ГПЦ – ПЭГ-400 и ГПЦ – ТЭЦ для создания ТТС при условии достаточной растворимости АФС.



ЛИТЕРАТУРА

1. Разработка и валидация методики определения мелоксикама в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием / Мидруев Е.Ю. [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – №4. – С. 124-127.
2. Фазовые равновесия в растворах производных целлюлозы и реологические свойства растворов в разных фазовых состояниях / Куличихин В.Г. [и др.] // Высокомолек. соед. Серия А. – 2010. – Т. 52, № 11. – С. 2001-2013.
3. Makarova, V., Kulichikhin, V. Application of Interferometry to Analysis of Polymer-Polymer and Polymer-Solvent Interactions. – 2012. – InTech ed. I. Padron. – p. 395.
4. Solubility and solution thermodynamics of meloxicam in polyethylene glycol 400+ water mixtures / Cárdenas Z.J., Jiménez D.M., Martínez F. // Journal of Molecular Liquids. – 2015. – Vol. 211. – P. 233-238.
5. Solubility enhancement of meloxicam by liquisolid technique and its characterization / Sirisolla J. // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2015. – Vol. 6(2). – P. 835.

APPLICATION OF LASER MICROINTERFEROMETRY TO DETERMINE THE COMPATIBILITY OF COMPONENTS IN THE DEVELOPMENT OF TRANSDERMAL THERAPEUTIC SYSTEMS

Makarova V.V.¹, Mandrik M.A.^{1,2}, Sadkovskii I.A.^{1,2}, Golyak N.S.³, Antonov S.V.¹

¹A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, RAS, 29 Leninsky prospect,
119991, Moscow, Russia

²Sechenov University, 119991, Moscow, Russia, 8-2 Trubetskaya st.

³Belarusian State Medical University, 220116, Republic of Belarus, Minsk, 83 Dzerzhinsky Ave.,
vvm@ips.ac.ru

The possibilities of using the method of laser microinterferometry for studying and evaluating the compatibility of components in the development of a transdermal patch with meloxicam are considered. Data were obtained on the compatibility of meloxicam with polyethylene glycol 400, triethyl citrate and acetyl tributyl citrate in a wide temperature range. It has been shown that the solubility of meloxicam in polyethylene glycol 400 and triethyl citrate increases with temperature rise. Complete incompatibility of the components is observed in the meloxicam-acetyltributyl citrate system that is associated with the low polarity of the solvent. Previously obtained data on the compatibility of solvents with hydroxypropyl cellulose demonstrate possibility of using such platforms for development of transdermal therapeutic systems.

Keywords: transdermal therapeutic systems, meloxicam, laser microinterferometry.

АКТУАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭКСТЕМПОРАЛЬНОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ ТВЕРДЫХ ПЕРОРАЛЬНЫХ ФОРМ ДЛЯ ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Мальчёнкова С.С., Голяк Н.С.

Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь,
220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, malchenkova.svetlana@yandex.by

Резюме. дозированные порошки для перорального применения являются основной лекарственной формой, изготавливаемой аптеками для детского населения Республики Беларусь. Анализ индивидуальной рецептуры производственных аптек г. Минска (10 аптек), и аптек областных и районных центров (28 аптек) выявил, что среди 44 наименований составов наибольшую долю составляют назначения гепатопротектора урсодезоксихолевой кислоты – 15,7%, ингибитора ангиотензинпревращающего фермента эналаприла – 15,4% и бета-адреноблокаторов (пропранолол, метопролол, атенолол) – 13,1%. 6,7% от общего количества детских порошков для приема внутрь принадлежали к противогрибковым препаратам (флуконазол, тербинафин, нистатин), а 6,2% являлись витаминами.



Ключевые слова: аптечное изготовление, порошки, детские заболевания.

Введение. Согласно принятому Евразийской экономической комиссией Руководству по определению возможности использования лекарственной формы в педиатрической практике или на ограниченной части педиатрической популяции выделяют следующие возрастные группы: недоношенные новорожденные младенцы, доношенные новорожденные младенцы (0-27 дней), младенцы и дети младшего возраста (от 1 месяца до 23 месяцев), дети (2-11 лет), подростки (12-16 лет). Период от 2 до 11 лет разделяют на дошкольный (2-5 лет) и школьный (6-11 лет) возраст [1]. В возрастной периодизации Л.С. Выготского к младенцам отнесены новорожденные и грудные дети до 1 года, а в детском возрасте выделено раннее (от 1 года до 3 лет) и дошкольное детство (от 3 до 6-7 лет). Младший школьный возраст приходится на период от 7 до 10-11 лет [2].

Терапия заболеваний у детей, особенно у младенцев, раннего и дошкольного возраста, должна осуществляться с применением детских лекарственных форм. Предпочтительны жидкие по консистенции приятного вкуса составы для внутреннего применения – растворы, суспензии, сиропы, капли [3]. Дозы препаратов подбираются исходя из веса или площади поверхности тела ребенка. Фармацевтическая промышленность по ряду причин (экономические, технологические и др.) не в состоянии производить все варианты детских дозировок лекарственных средств. В тоже время согласно постановления Министерства здравоохранения Республики Беларусь «Об установлении перечня стратегически важных лекарственных препаратов» № 116 от 29.10.2021 г. в этот перечень входят все лекарственные средства независимо от кода АТХ, предназначенные для применения только у детей. Потребность в детских препаратах с разнообразным индивидуальным дозированием покрывает аптечное изготовление. К детской рецептуре производственных аптек Республики Беларусь относится в том числе изготовление твердых дозированных порошков для перорального применения как из фармацевтических субстанций, так и из готовых таблеток или капсул, содержащих взрослые дозировки активных компонентов. Таблетки измельчают, смешивают с индифферентным наполнителем, затем смесь разделяют на дозы. Доза некоторых лекарственных средств (дигоксин, левотироксин) в одном порошке исчисляется микрограммами, что требует от ассистента точных расчетов и строгого соблюдения технологии изготовления.

Цель исследования состоит в определении ассортимента изготавливаемых аптеками детских порошков для перорального применения и выявлении среди них препаратов-лидеров.

Материалом для исследования являлись данные об изготовлении детских порошков для перорального применения по индивидуальным рецептам в производственных аптеках г. Минска (№№ 22, 97, 68, 109, 80, 1, 17, 22, 110, 59); г. Бобруйска (№ 127/8); г. Бреста (№№ 2, 173, 1, 105); г. Гродно (№№ 153, 134, 90); г. Новогрудок (№60); г. Гомель (№№194, 185, 184; г. Жлобин (№ 199); в центральных районных аптеках (ЦРА): ЦРА № 146 г. Лиды, ЦРА № 90 г. Житковичи, ЦРА № 53 г. Речица, ЦРА № 83 г. Ганцевичи, ЦРА № 9 г. п. Зельва, ЦРА № 136 г. Волковыск, ЦРА № 18 г. Береза, ЦРА № 66 г. Дрогичин, ЦРА № 9 г. Ивацевичи, ЦРА № 4 г. Лепель, ЦРА № 109 г. Осиповичи, ЦРА № 66 г. Калинковичи, ЦРА № 65 г. Ушачи, ЦРА № 118 г. Вилейка, ЦРА № 97 г. Копыль за пять рабочих дней в период с 29.06. по 05.07.2022 г.

Результаты исследования. В аптеки из общего количества индивидуальных рецептов поступило 306 назначений на 44 наименования лекарственных средств в виде детских порошков для внутреннего применения. Порошки с тиамином, рибофлавином, фолиевой, никотиновой, аскорбиновой кислотами объединены в группу витаминных (таблица).



Таблица. Рецептура детских пероральных порошков

№ п/п	Наименование препарата	Количество рецептов	% от общего количества детских пероральных порошков
1	Аминокапроновая кислота	1	0,3
2	Адаптол (Мебикар)	1	0,3
3	Амиодарон (Кордарон)	4	1,3
4	Атенолол	7	2,3
5	Ацетилсалициловая кислота (Аспирин)	1	0,3
6	Баклофен	1	0,3
7	Варфарин	1	0,3
8	Витаминные порошки	19	6,2
9	Галоперидол	1	0,3
10	Гопантеновая кислота (Пантокальцин)	2	0,7
11	Гидрокортизон	9	2,9
12	Дигоксин	3	1,0
13	Домперидон (Мотилиум, Мотилак)	1	0,3
14	Димедрол	11	3,6
15	Карбамазепин	1	0,3
16	Клопидогрель (Лопирел)	1	0,3
17	Ко-тримаксазол (Бисептол)	4	1,3
18	Леветирацетам (Левипил, Пирроцет)	2	0,7
19	Левотироксин натрия (Эутирокс)	4	1,3
20	Левадопа/бенсеразид (Мадопар)	1	0,3
21	Метилпреднизолон (Медрол)	1	0,3
22	Метамизол натрий (Анальгин)	1	0,3
23	Метопролол (Эгилок)	13	4,2
24	Ипидакрин (Нейромидин)	9	2,9
25	Нистатин	4	1,3
26	Нитрофурантоин (Фурадонин)	4	1,3
27	Ницерголин (Сермион)	3	1,0
28	Пирацетам (Луцетам)	8	2,5
29	Такролимус (Програф)	3	1,0
30	Толперизон (Мидокалм)	2	0,7
31	Папаверина гидрохлорид	2	0,7
32	Пропафенон (Пропанорм)	5	1,6
33	Пропранолол (Анаприлин)	20	6,5
34	Силденафил (Виасил)	8	2,6
35	Спиринолактон (Верошпирон)	3	1,0
36	Тербинафин (Ламиктал)	2	0,7
37	Урсодезоксихолиевая кислота (Урсосан)	48	15,7
38	Фенибут (Ноофен)	17	5,6
39	Финастерид (Финаст)	1	0,3
40	Флуконазол (Дифлюкан)	10	3,3
41	Фуразидин (Фурамаг, Фурагин)	5	1,6
42	Фуросемид	14	4,6
43	Хлорпротиксен	1	0,3
44	Эналаприл (Энап)	47	15,4
Общее количество индивидуальных рецептов		306	100



Заключение. Из изготовленных для детей пероральных порошков наибольшее количество приходится на урсодезоксихолевую кислоту (15,7%), которая применяется в детской практике для терапии неонатальной гипербилирубинемии, а также в комплексном лечении заболеваний печени, муковисцидоза. Значительную долю составляют препараты для лечения патологий сердечно-сосудистой системы – эналаприл (15,4%), пропранолол (6,5%), фуросемид (4,6%), силденафил (2,6%). Почти каждый десятый порошок был изготовлен с ноотропными лекарственными средствами (мебикар, фенибут, пирацетам, гопантеновая кислота) – всего 9,2%. В 2,9% случаев были изготовлены порошки с ипидакрином (нейромидином) для лечения заболеваний периферической и центральной нервной системы. Столько же – по прописям на производные нитрофурана (фурагин, фурадонин). Поступали также единичные рецепты на порошки из различных психотропных препаратов – карбамазепин, хлопротиксен, баклофен, толперизон, леветирацетам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евразийская Экономическая Комиссия [Электронный ресурс]: Руководство по определению возможности использования лекарственной формы в педиатрической практике или на ограниченной части педиатрической популяции. – Режим доступа: <https://inlnk.ru/kX698m>. – Дата доступа: 18.09.2022.
2. Касвинов С.Г. Система Выготского. Обучение и развитие детей и подростков [Электронный ресурс] / С.Г. Касвинов // Кн. 1. – Харьков, 2013. – Режим доступа: <http://www.medpsy.ru/library/library169.pdf>. – Дата доступа: 20.09.2022.
3. Современные проблемы дозирования лекарственных средств для детей в Российской Федерации [Электронный ресурс] / Н.С. Егорова [и др.] // Вестник смоленской государственной медицинской академии. – 2019. – Т. 18. – №4. – С. 220-228. – Режим доступа: <https://inlnk.ru/xv8Evx>. – Дата доступа: 20.09.2022.

CURRENT STATE OF COMPOUNDING OF SOLID ORAL FORMS FOR CHILDREN IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Malchenkova S.S., Goljak N.S.

*Belarusian State Medical University, Republic of Belarus, 220116, Minsk, Dzerzhinsky Ave., 83,
malchenkova.svetlana@yandex.by*

Dosed powders for oral use are the main dosage form compounded by pharmacies for the children's population of the Republic of Belarus. An analysis of the individual formulation of industrial pharmacies in Minsk (10 pharmacies), and pharmacies of regional centers (28 pharmacies) revealed that among 45 formulations, the largest share is the prescription of the hepatoprotector ursodeoxycholic acid – 15.7%, the Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor enalapril – 15.4% and beta-blockers (propranolol, metoprolol, atenolol) – 13%. 6.7% of the total children's oral powders belonged to the antifungal group (fluconazole, terbinafine, nystatin), 6.2% were vitamins.

Key words: pharmaceutical compounding, powders, children's diseases.



СОВРЕМЕННАЯ СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СОЕДИНЕНИЙ МЕТАЛЛОВ

Милаева Е.Р.

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3,
milaeva@med.chem.msu.ru*

Развитие нового направления в области разработки лекарственных препаратов на основе соединений металлов, получившего название «Неорганическая медицинская химия», привело к устойчивому формированию отдельного сектора фармацевтического рынка и активным выходом на мировой фармацевтический рынок низкомолекулярных лекарственных препаратов и диагностических средств, в молекулах которых присутствуют атомы металла/элемента.

Применение металлосодержащих средств (metal-based drugs) для диагностики (metallodiagnosics) и терапии (metallotherapeutics) социально значимых заболеваний открывает уникальные возможности для борьбы с теми видами патологий, которые не поддавались лечению классическими препаратами органической природы [1]. К наиболее известным примерам относятся соединения платины, золота, рутения, олова, сурьмы, лития, галлия, гадолиния, лантана и др., введенные Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) в клиническую практику в XX-XXI веках. Уникальные возможности варьирования природы металла, его широкие координационные возможности при связывании с мишенью, нетривиальные механизмы биомолекулярного действия, а также обнаружение новых мишеней обеспечило взрывной интерес исследователей к этой области.

Ключевым фактором успешного создания нового лекарственного средства на современном этапе развития медицинской химии является выбор мишени и лиганда (лекарственного препарата), селективно с ней взаимодействующего. С этой точки зрения ряд преимуществ применения соединений металлов приводят и к их недостаткам, главным из которых является неспецифичность действия, т.е. действие одновременно на несколько мишеней, что выражается в серьезных побочных эффектах.

Одним из подходов для решения задачи устранения неспецифичности является комбинация в молекуле препарата активного металла и органического вектора, обеспечивающего доставку к мишени, ответственной за патогенез заболевания. В качестве такого перспективного вектора может выступать фрагмент известного лекарственного препарата, для которого известны мишень и биомолекулярный механизм фармакологической активности. В этом случае образование комплекса с металлом с также известной фармакологической активностью может обеспечить стабильность субстанции по отношению к гидролизу, направленное действие на соответствующую мишень и более эффективное связывание с мишенью из-за дополнительных координационных возможностей атома металла.

В настоящей работе приведен обзор наших исследований, направленных на молекулярное конструирование гибридных молекул, в состав которых входит известный лекарственный препарат (drug) (либо его модифицированный аналог – drug^{mod}) и атом металла (М) общей формулы (drug)MLX или $(\text{drug}^{\text{mod}})\text{MLX}$, где LX = сторонние стабилизирующие лиганды или атомы галогена. Преимущество данного подхода определяется рядом факторов:

1) таргетный лекарственный препарат органической природы (drug) или $(\text{drug}^{\text{mod}})$ в составе молекулы выполняет роль вектора, определяет биодоступность нового лекарства и, будучи включенным в молекулярную систему комплекса металла (drug)MLX или $(\text{drug}^{\text{mod}})\text{MLX}$, обладает улучшенными фармакокинетическими характеристиками и пролонгированным действием;



2) металлосодержащий фрагмент MLX, будучи «закрепленным» в молекулярной структуре комплекса путем образования ковалентных связей с органической частью (drug) или (drug^{mod}), проявляет широкие координационные возможности в сайте связывания с мишенью, теряет часто наблюдаемую неспецифичность и повышает общую эффективность лекарства;

3) при конструировании лабильных комплексов, склонных к распаду в клетке, оба компонента [(drug) или (drug^{mod}) + металлосодержащий фрагмент MLX] действуют по независимым мишень-ориентированным маршрутам, обеспечивая «двойной удар».

В качестве лекарственных препаратов органической природы (drug) выбраны абиратерон и абиратерона ацетат – ингибитор цитохрома CYP17A1, нестероидные противовоспалительные препараты (пироксикам и диклофенак – ингибиторы циклооксигеназ COX-1 и COX-2, аспирин – селективный и необратимый ингибитор COX-1), бексаротен – ингибитор ретиноидного рецептора X, лонидамин – ингибитор митохондриально связанной гексокиназы, лозартан – специфический антагонист (блокатор) рецепторов ангиотензина II типа AT1, обладает антигликирующей активностью), антиоксиданты (мексидол, эмоксипин, дибуфелон).

В качестве металлосодержащих структурных фрагментов (MLX) выбраны структурные аналоги и модели средств, содержащих платину (цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин, сатраплатин), рутений (BOLD-100), золото (ауранофин), олово (пурлитин).

Предложен и разработан подход для создания соединений Au(I), содержащих 2,6-диалкилфенольные группы в качестве периферийных фрагментов, моделирующих природные антиоксиданты [2]. Обнаружено, что для соединения Ph₃PAuSR (R = 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил) мишенью является фермент тиоредоксинредуктаза (значение IC₅₀ = 0,57±0,15 мМ). Изучение распределения в органах крыс показало, что данное соединение накапливается преимущественно в почках и печени.

Показана высокая противоопухолевая активность комплексов Pt(IV), содержащих фрагменты модифицированных препаратов лонидамина и бексаротена [3]. Исследовано внутриклеточное накопление комплекса Pt с лигандом на основе модифицированного лонидамина, изучено его действие на клеточный цикл, механизм гибели раковой клетки и активность в 3D моделях. Впервые изучена *in vivo* острая токсичность комплекса Pt(IV) и его биораспределение. Продемонстрирована цитотоксичность соединений Ru на различных клеточных линиях рака человека. Показана высокая селективность комплекса Ru(III) с фрагментом модифицированного бексаротена по отношению к клеточной линии нейробластомы и возможность связывания комплекса с альбумином и трансферрином. Методом молекулярного моделирования было показано, что новые соединения связываются с молекулярной мишенью, что может объяснить высокую активность соединений. В серии синтезированных соединений Sn(IV) выявлено соединение-лидер, проявляющее антипролиферативную активность в наномолярном диапазоне для панели клеточных линий рака человека и обнаружена принадлежность к умеренно токсичным соединениям (III/IV класс токсичности), что открывает перспективы для их дальнейшего исследования в качестве противоопухолевого агента [4]. Отобраны два соединения-лидера, для которых начаты доклинические испытания. Определены значения LD₅₀, проведена оценка средней продолжительности жизни животных, безопасности применения по протоколу OECD 420 и кардиотоксичности, оценено влияние на первичный очаг эпидермоидной карциномы Lewis, на активность метастазирования в легкие, выявлены морфо-функциональные нарушения по результатам патоморфологического исследования и изменению активности маркерных ферментов крови. Результаты исследования с использованием методов ¹H, ¹³C, ¹¹⁹Sn NMR, ИК, ESI-MS DPPH, CUPRAC, NBT, LOX, MTT показали, что сочетание оловоорганических соединений с фармакофорными лигандами – нестероидными противовоспалительными препаратами, открывает перспективы для поиска новых мультитаргетных лекарственных агентов цитотоксического действия [5].



Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (22-63-00016).

ЛИТЕРАТУРА

1. Милаева Е.Р. Неорганическая медицинская химия. М.: Издательство Московского университета. 2022. 224 с. ISBN: 978-5-19-011660-1.
2. The antioxidant 2,6-di-*tert*-butylphenol moiety attenuates the pro-oxidant properties of the auranofin analogue / Shpakovsky D.B. [et al.] // *Metallomics*. – 2018. – V. 10(3). – P. 406-413.
3. Enhancing the cytotoxic activity of anticancer Pt(IV) complexes by introduction of lonidamine as an axial ligand / Nosova Yulia N. [et al.] // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2017. – Vol. 12. – P. 1785-1791.
4. Antitumor pharmacological activity of hybrid organotin compounds on the Lewis epidermoid carcinoma model / Dodokhova M.A. [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40(16). – Suppl. e15004.
5. Cytotoxic activity of organotin compounds containing non-steroidal anti-inflammatory drugs / Antonenko T.A. [et al.] // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2022. – Vol. 960. – Art. 122191.

STATE-OF-THE-ART APPROACHES TO CREATING METAL-BASED DRUGS

Milaeva E.R.

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Russian Federation,
119991, Moscow, Leninskie Gory, 1-3, milaeva@med.chem.msu.ru*

We resolved the strategic problem of developing a new approach to low molecular weight synthetic targeted hybrid metal-based molecules. This approach is based on combinations of organic drug and metal containing fragment for selective binding of pharmacologically relevant intracellular structures (targets). We synthesized the agents containing the pharmacophore groups of the retinoic acid receptor agonist bexarotene and inhibitor of glycolysis called lonidamine. New cationic complexes of Ru and Pt with bexarotene and lonidamine were evaluated using MTT tests. Multifactorial testing of hybrid complexes of Sn and Au containing an antioxidant 2,6-di-*tert*-butylphenol fragment showed a dose dependent manner of the effect. Tin complexes were more potent than the respective Au complexes. For the tin conjugate we suggested a non-trivial mechanism of action on tubulin, that is, de novo microtubule formation instead of inhibition of depolymerization. For construction of new multitargeted substances we synthesized a number of organotin compounds combined with non-steroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and aspirin. Results of ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn NMR, IR, ESI-MS DPPH, CUPRAC, NBT, LOX, and MTT methods demonstrated that the combinations of organotin compounds with non-steroid anti-inflammatory agents are a perspective road to new antitumor strategies. For two lead tin compounds preclinical testing on B16 melanoma bearing mice and Lewis carcinoma bearing mice was performed. Neither compound evoked heart or liver toxicity at doses that caused an anti-metastatic efficacy. Both compounds are classes III/IV general toxicity.



ЛИПИДНЫЕ МЕССЕНДЖЕРЫ ГОМЕОСТАЗА (АУТОКОИДЫ) – ПАЛЬМИТОИЛЭТАНОЛАМИД И ЕГО КОНГЕНЕРЫ: К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМЫ БИОДОСТУПНОСТИ

Михальчук А.Л.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, lipmal@iboch.by*

Современная фармакология располагает широким арсеналом средств, позволяющих решать практически все задачи купирования известных патологий. Тем не менее, в отдельных случаях даже после успешного подавления патологических процессов, достижение устойчивого выздоровления пациента оказывается либо недостижимым, либо требует длительной пост-терапевтической реабилитации. Это обусловлено дестабилизацией гомеостаза организма в процессах возникновения и развития патологий. Гомеостаз, являющийся фундаментальным эволюционным базисом возникновения, существования и развития биологической формы материи, заключается в способности организмов (открытых биологических систем от клеточного до ткане-организменного уровня) сохранять динамическое постоянство состава и свойств внутренней среды.

Применяемые в настоящее время терапевтические средства наряду с фармацевтиками, как правило, являющимися ксенобиотиками, включают также большое число вспомогательных средств, парафармацевтиков или биологически активных добавок (БАД), облегчающих течение заболеваний, ускоряющих выздоровление и пост-терапевтическую реабилитацию. К БАД относят различные биологические или пищевые добавки минерального, растительного и животного происхождения [1]. Особое место в этом ряду занимает обнаруженный в середине прошлого века и получивший к настоящему времени широкое распространение и практическое применение пальмитоилэтаноламид (PEA) [1-5]. В Европе PEA позиционируется как «*food for medical purposes*» (пища медицинского назначения), в США как «*a diet supplement*» (диетическая добавка) и как «*dietary supplement*» (БАД) в остальном мире [3].

PEA является родоначальником ряда этаноламидов жирных кислот (FAEAs), широко распространённых в растительном и животном мире [2]. В настоящее время PEA применяется как парафармацевтик в виде индивидуальных препаратов: *Palmidrol (Spofa, Almirall)*, *Normast (Epitech, Ergomax)*, PEA (*GIHI Chemicals co.*), *PeaPure (RSG Ltd.)*, *PeaCure (JP Russell Science Global Ltd.)*, *PEAm (Epitech Group)*, *PEAum (GIHI Chemicalsco.)*, так и в виде комплексных препаратов с фармакологическими агентами, например, с ибупрофеном – «*Advil*» (*Pfizer Consumer Mfg.; Advil Sp A*), *Motrin (Teva Pharmaceuticals; Par Pharmaceutical)*; с лютеолином – *Mirica (Young nutraceuticals)* и с другими парафармацевтиками: глюкозамином, куркумином, включая витамины *Pea Plex (JPRSG Ltd.)* и витаминно-минеральные комплексы [1].

PEA и его конгенеры FAEAs широко представлены в биологических объектах от микроорганизмов до высших растений и млекопитающих. FAEAs обнаруживаются во всех тканях и биологических жидкостях [5]. Уровни эндогенного PEA в нормальных мышечных и жировых тканях достигают 0,04-6,00 пМ/мг. Наиболее высокие уровни PEA регистрируются в поражённых тканях (до ~200-250 пМ/мг) при воспалениях различной этиологии, например, при инфарктах, инсультах, ишемиях различного генеза, при инфекционных, травматических, термических воспалениях, дерматитах, стоматитах, энтероколитах и др. Повышенное внимание и преимущественное упоминание в литературных источниках именно PEA обусловлено прежде всего наиболее широкой его представленностью и распространённостью. Вообще же к настоящему времени в биологических объектах обнаружены практически все гипотетически возможные представители ряда FAEAs [5].

PEA является представителем семейства FAEAs или N-ацилэтаноламинов (NAEs). PEA экспрессируется при необходимости в цитоплазматическом мембранном липидном бислое



(клеточных мембранах) и липидном матриксе внутриклеточных органелл. РЕА действует локально, реализуя свои эффекты на аутокринно/паракринном уровнях и присутствует во всех клетках, органах, тканях, биологических жидкостях организма человека, включая мозг, а в более широком контексте – организмах млекопитающих. РЕА вырабатывается как прогомеостатический защитный ответ на клеточные и тканевые повреждения при различных патологических состояниях. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о беспрецедентно широком спектре биологических эффектов РЕА. Согласно этим данным, плейотропные эффекты РЕА включают противовоспалительное, антиаллергическое, обезболивающее, противосудорожное, противовирусное и противомикробное, жаропонижающее, противоэпилептическое, иммуномодулирующее, нейропротекторное действия и множество других физиологических эффектов [2]. РЕА так же способствует купированию аллостерических нагрузок при хронических воспалительных заболеваниях, улучшению когнитивных функций, восстановлению мышц, что делает его дополнительное введение в организм жизнеспособной терапевтической стратегией для повышения его эндогенного уровня и восстановления гомеостаза организма.

Множественные физиологические эффекты РЕА обусловлены его уникальным прогомеостатическим защитным механизмом действия, оказывающим влияние на ключевые рецепторы, запускающие процессы поддержания гомеостаза. Основной мишенью РЕА является связанный с G-белком активируемый пролифератором пероксисом ядерный рецептор альфа (PPAR- α). РЕА также взаимодействует со связанными с G-белком рецепторами GPR55 и GPR119. Посредством эффекта антуража (окружения), ингибируя деградацию анандамида, РЕА активирует рецепторы плазматических мембран 1 и 2 (CBR1 и CBR2). РЕА десенсибилизирует каналы временного рецепторного потенциала ваниллоидного рецептора 1 (TRPV1), способствуя значительному антиноцицептивному эффекту. Исключительно важное значение в физиологических эффектах РЕА и его конгенов имеет их способность ингибировать дегрануляцию тучных клеток, препятствуя неуправляемому выбросу провоспалительных факторов (цитокинов, хемокинов, протеаз и др.) и предотвращая цитокиновый шторм. Этот процесс, открытый Монтальчини Р.Л. с коллегами охарактеризован как аутокоидный локальный воспалительный антагонизм.

Глобальной проблемой РЕА и FAEAs в целом является их низкая биодоступность, обусловленная, с одной стороны, низкой растворимостью, а с другой – быстрой биodeградацией, что предполагает, во-первых, разработку растворимых или, как минимум, солюбилизированных препаратов и, во-вторых, поиск конгенов с замедленной биodeградебельностью. Одним из частных решений этой проблемы стала разработка микронизированных (PEAm) и ультрамикронизированных (PEAum) препаратов [1].

Исследования сотрудников лаборатории химии липидов ИБОХ, проводимые совместно с сотрудниками Института физиологии НАН Беларуси, направлены на углубление понимания физиологических функций FAEAs и РЕА и разработку препаратов с улучшенными характеристиками биодоступности. Следует отметить, что разрабатываемые подходы к повышению биодоступности FAEAs и РЕА являются экономической альтернативой PEA_m, PEA_{um} препаратов.

Первоначально, в качестве альтернативы ограничено доступным PEA_m, PEA_{um} препаратам изучались и использовались липосомальные и мицеллярные суспензии FAEAs и РЕА. Объективными недостатками таких препаратов являлись низкая стабильность, ограниченные возможности стерилизации вследствие лабильности и, наконец, ограничения по концентрационной нагрузке получаемых препаратов и избыточной нагрузке вспомогательных агентов. Тем не менее, в этих исследованиях было показано, что с помощью таких подходов в значительной мере достигается основная цель – повышение биодоступности, а липосомальные и мицеллярные препараты FAEAs и РЕА, в частности, не уступают по эффективности коммерческим препаратам PEA_m, PEA_{um}.



В этом направлении в лаборатории химии липидов изучаются и оптимизируются методы получения FAEAs из коммерчески доступного масложирового сырья и способы солюбилизации получаемого в результате материала.

К настоящему времени опробованы и оптимизированы методы получения индивидуальных FAEAs от короткоцепочечных ($C_4 - C_8$) до средне- ($C_8 - C_{12}$) и длинноцепочечных ($C_{14} - C_{20}$). В частности, используя хлорангидридный метод, метод смешанных ангидридов и метод аминолита метиловых эфиров жирных кислот получены насыщенные бутаноил-, каприлоил-, пальмитоил-, стеароилэтаноламиды и –диэтаноламиды, и изучены их физико-химические свойства. Как отмечалось выше, все перечисленные FAEAs присутствуют в биологических объектах растительного и животного происхождения и, как следствие, позиционируются как биобезопасные.

В отличие от известных и используемых в современной практике синтетических схем производства FAEAs в лаборатории химии липидов разработан и опробован метод последовательного щелочного метанолиза/аминолиза масложировых триглицеридных смесей, позволяющий значительно снизить термическое воздействие в процессах превращений (на 50-70°C) и осуществлять синтез FAEAs, включая полиненасыщенные, в температурных интервалах 70-110°C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михальчук А.Л. N-ацилэтаноламиды – биогенные агенты поддержания гомеостаза организма человека и животных в норме и восстановления при патологиях и возрастных изменениях. / Международная научная конференция «Физико-химическая биология как основа современной медицины», посв. 75-летию со дня рожд. проф. Е.В. Барковского. Под редакцией В.В. Хрусталёва, А.Д. Тагановича, Т.А. Хрусталёвой. Тезисы докладов. Минск, 21 мая 2021 г. – С. 187-189.
2. Palmitoylethanolamide: A Natural Compound for Health Management / Clayton P. [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 35(10). – Art. 5305.
3. The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations / Petrosino S., Di Marzo V. // British Journal of Pharmacology. – 2017. – Vol. 174. – P. 1349-1365.
4. Palmitoylethanolamide in CNS health and disease. Review / Giuseppina Mattace Raso [et al.] // Pharmacological Research. – 2014. – Vol. 86. – P. 32-41.
5. Quantification of 24 circulating endocannabinoids, endocannabinoid-related compounds, and their phospholipid precursors in human plasma by UHPLC-MS/MS / Röhrig W. [et al.] // J. Lipid Res. – 2019. – Vol. 60(8). – P. 1475-1488.

LIPID MESSENGERS OF HOMEOSTASIS (AUTOCOIDS) – PALMITOYLETHANOLAMIDE AND ITS CONGENERS: TO SOLVING THE PROBLEM OF BIOAVAILABILITY

Michal'chuk A.L.

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, lipmal@iboch.by*

The results of literary-bibliographic, synthetic, physicochemical and medical-biological studies aimed at increasing the bioavailability of exogenous fatty acid ethanolamides are described and discussed. Fatty acid ethanolamides are present in all tissues and biological fluids of human, animal and plant objects and exhibit a wide range of biological effects. This puts them among the most important nutraceuticals (parapharmaceuticals) of modern medicine and actualizes the problems of their use in maintaining the health of people and animals from birth to old age in normal conditions and in various pathologies.



МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВИТАМИННО-АМИНОКИСЛОТНОГО КОМПЛЕКСА (ЛИПОВАЯ КИСЛОТА, ТИАМИН, ТИРОЗИН) ПРИ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У КРЫС

Надольник Л.И., Полубок В.Ч., Виноградов В.В.

Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси», Гродно, 230023, площадь Антония Тызенгауза, д. 7, lnadolnik@tut.by

Введение. Диабет 2 типа проявляется значительными метаболическими нарушениями: дислипидемия и нарушение механизмов контроля массы тела, развитие инсулинорезистентности, нарушение метаболизма глюкозы, а также нарушение регуляторных эффектов гормонов, цитокинов, функции различных сигнальных систем. Разработка способов коррекции метаболических нарушений, связанных с диабетом 2 типа, – весьма актуальное направление, учитывая устойчивый рост уровня заболеваемости и сложности его лечения. В настоящее время для лечения осложнений, связанных с диабетом, широко применяется липовая кислота (ЛК). ЛК играет важную роль в энергообеспечении организма в рамках цикла Кребса, ускоряет окисление жирных кислот, является мощным липофильным антиоксидантом; доказано ее воздействие на перекисное окисление липидов (ПОЛ) в митохондриях и микросомах [1,2]. Показано, что дефицит синтетазы ЛК ассоциирован с активацией маркеров воспаления (TNF- α), моноцит-хемоаттрактивным протеином-1 (MCP-1). При введении ЛК пациентам с ожирением и диабетом 2 типа повышается индекс инсулин-чувствительности периферических тканей, усвоение глюкозы клетками и процессы сохранения гликогена в мышцах, а также снижается уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина.

Цель работы – оценить эффективность коррекции метаболических нарушений при диабете 2 типа у крыс при использовании витаминно-аминокислотного комплекса на основе липовой кислоты (ЛК+тиамин+тирозин).

Материалы и методы. Исследования выполнены на самцах и самках крыс массой 200-240 г в следующих группах животных: контроль, высокожировая диета (ВЖД) и диабет 2 типа (ВЖД+СТЗ) и ВЖД+СТЗ+Комплекс. Диабет 2 типа моделировали с использованием высокожировых диет (ВЖД), которые скармливали животным на протяжении 18 недель. После 12 недель употребления ВЖД животным вводился стрептозотоцин (СТЗ) в дозе 40 мг/кг; в течение первых суток опытные животные получали в качестве питья 30% раствор глюкозы, во вторые сутки – 30% раствор глюкозы и воду. В течение эксперимента ни одно животное не погибло. Все манипуляции с животными проводились согласно требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для научных целей, руководство по уходу и использованию лабораторных животных (№ 123; пересмотрено в 1986 году) [ETS 123 – Protection of Vertebrate Animals, 18.III.1986].

Витаминно-аминокислотный комплекс гомеостазин вводился ежедневно интрагастрально в виде водной суспензии на протяжении 4-х недель в дозе 250 мг/кг (ЛК 100 мг/кг, тиамина гидрохлорид 100 мг/кг, тирозин 50 мг/кг).

Уровень глюкозы в капиллярной крови контролировали утром натощак в капле крови из кончика хвоста с использованием разовых тест-полосок (Rightest Test Strips GS 100) и глюкометра Rightest GM100 («Bionime GmbH», Switzerland). Измерение концентрации глюкозы в капиллярной крови было проведено перед началом эксперимента, через 11 недель употребления ВЖД, до введения стрептозотоцина, через 5 суток после его введения, а также за 24 часа до декапитации животных (18 недель). В сыворотке крови измеряли концентрацию триглицеридов (ТГ), ЛПВП, ЛПНП согласно инструкции производителя (коммерческие наборы АнализМед, Республика Беларусь). Методом ИФА (коммерческие наборы «FineTest», Китай) измерены следующие показатели: лептин (LEP), адипонектин (ADP), глюкагоноподобный пептид (GLP-1), кортикостерон (CORT), инсулиноподобный фактор



роста (IGF), фактор некроза опухоли (TNF-1 α), С-реактивный белок (СРБ). Уровень эстрадиола, тестостерона, прогестерона, Т4общ, Т4своб, Т3своб измерены согласно инструкции производителя («АнализМед», Республика Беларусь). Были измерены общие биохимические показатели – АЛТ, АСТ, ЩФ, креатинин, билирубин с использованием наборов «АнализМед», (Республика Беларусь).

Результаты и обсуждение. Введение гомеостазина в дозе 250 мг/кг в течение 4-х недель не вызывало изменений показателей липидного обмена в сыворотке крови самок крыс; можно отметить незначительное снижение концентрации общего холестерина (на 21,9%) и ЛПНП (на 33,3%). Тем не менее, у самцов выявлено повышение в крови уровня ТГ (на 63,5%, $p=0,0008$) и коэффициента ТГ/ХЛ в 1,59 раза по сравнению с группой, не получавшей гомеостазин (ВЖД+СТЗ). При исследовании микроскопической структуры печени выявлено снижение степени стеатоза на фоне введения гомеостазина только у самцов, – но не у самок (рис. 2). Можно предположить, что гомеостазин защищает гепатоциты от накопления липидов, это сопровождается повышением их уровня в крови. Уровни холестерина, ЛПВП и ЛПНП в крови самцов практически не изменялись.

Эффекты гомеостазина на уровень глюкозы в крови зависели от пола животных. У самок, получавших в течение 4-х недель гомеостазин, концентрация глюкозы в капиллярной крови натошак снижалась незначительно, но в сыворотке крови была в 2 раза ниже, чем у диабетических животных, не получавших гомеостазин. Положительных эффектов гомеостазина на степень гипергликемии у самцов не выявлено. Самки крыс, содержащиеся на ВЖД+СТЗ, демонстрировали признаки инсулинорезистентности и интолерантности к глюкозе, характеризующейся крайне низкой степенью ее клиренса. Площадь под кривой при диабете 2 типа составляла 149,8% от контроля ($p=0,0025$) и 126,2% при введении гомеостазина ($p=0,001$). Статистически значимого улучшения клиренса глюкозы 4-х-недельное введение гомеостазина не вызывало ($p=0,2475$ по сравнению с группой ВЖД+СТЗ), – тем не менее площадь под кривой снизилась в 1,2 раза по сравнению с группой ВЖД+СТЗ. Введение гомеостазина проявлялось снижением степени инсулинорезистентности у самок крыс: концентрация инсулина снизилась в 1,74 раза, незначительно повысился уровень IGF-1 и снизился индекс НОМА-IR. У самцов крыс эффекты были менее значимы. Но отмечается снижение уровня инсулина в крови в 1,78 раза; при этом значения индекса НОМА-IR, концентрация IGF-1 не изменялись.

После введения витаминно-аминокислотного комплекса в дозе 250 мг/кг в течение 4 недель базальный уровень глюкагоноподобного пептида (GLP-1) в сыворотке крови крыс повысился на 86,9% по сравнению с группой ВЖД+СТЗ и не отличался от контрольных значений. У группы ВЖД+СТЗ, не получавшей лечение, он был снижен на 38,6% по сравнению с группой контроль. Введение комплекса нормализовало также некоторые общие биохимические показатели, что свидетельствует о его существенном влиянии на метаболизм. Показано снижение у самок на 55,2% уровня мочевины ($p=0,04$) и на 28,9% – уровня креатинина ($p=0,005$), повышенных у крыс при диабете.

Введение гомеостазина в дозе 250 мг/кг не влияло на уровень эстрадиола, прогестерона и тестостерона в крови самцов и самок крыс; можно отметить лишь незначительную тенденцию снижения уровня эстрадиола у самцов (на 15,9%) и повышения уровня тестостерона (на 87,0%) по сравнению с группой ВЖД+СТЗ. Введение гомеостазина не влияло на уровень Т4общ., но повысило уровень Т4своб на 47,1% ($p=0,04$), сниженный в группе ВЖД+СТЗ, только у самок, – но не у самцов. Тем не менее, соотношение Т4своб/Т4общ сохранялось сниженным по сравнению с контрольными значениями у самцов и самок групп ВЖД+СТЗ, получавших и не получавших гомеостазин. Гомеостазин также повышал уровень Т3своб в крови самок (на 23,9%, $p=0,07$) по сравнению с группой ВЖД+СТЗ, но не влиял на его уровень в крови самцов (который сохранялся сниженным на 40,6%; $p=0,01$) по сравнению с контрольной группой, – как и в группе ВЖД+СТЗ ($p=0,02$). Соотношение Т3своб/Т4своб во всех опытных группах сохранялось на уровне контрольных значений, что может



свидетельствовать о функциональных сдвигах в изменении уровней свободных Т3 и Т4. Введение гомеостазина не вызывало статистически значимых изменений в уровне кортикостерона у самцов и самок группы ВЖД+СТЗ. Можно отметить, что у самцов в 1,43 раза снизилась, а у самок в 1,38 раза повысилась концентрация кортикостерона в сыворотке крови, что предполагает разнонаправленные эффекты гомеостазина на глюкокортикоидный статус крыс, связанные с полом, которые интересны для дальнейших исследований. Показаны разнонаправленные эффекты гомеостазина на уровни свободных Т3, Т4 у самцов и самок крыс, повышение их концентрации у самок и отсутствие изменений и/или снижение – у самцов.

Полученные результаты свидетельствуют, что эффекты гомеостазина проявляются в большей степени у самок, чем у самцов, что предполагает важным выяснение механизмов данных закономерностей, связанных с полом животных. Судя по изменению исследованных показателей, можно предположить, что защитный эффект гомеостазина может быть реализован через оптимизацию метаболизма тиреоидных гормонов, нарушенного при диабете 2 типа, проявляющуюся повышением уровней Т4своб и Т3своб. Также можно отметить повышение при диабете уровня эстрадиола у крови самок крыс. Эти результаты согласуются с ролью тиреоидных гормонов в регуляции метаболизма липидов [3], а также их участием в контроле захвата глюкозы, синтеза и деградации инсулина [4].

Заключение. На модели экспериментального диабета 2 типа у крыс установлено, что введение витаминно-аминокислотного комплекса на основе липоевой кислоты (липоевая кислота, тиамин, тирозин) в течение 4-х недель снижает уровень глюкозы и индекс НОМА-IR, повышает концентрацию глюкагоноподобного пептида. Механизмы выявленных эффектов могут быть реализованы через повышение уровня свободных тиреоидных гормонов, что проявляется у самок крыс. Эффекты комплекса у самцов крыс менее значимы, чем у самок, что может быть опосредовано защитным эффектом эстрадиола, который повышался у самок, и менее значимыми защитными эффектами тестостерона и тиреоидных гормонов у самцов. Механизмы выраженных гендерных различий представляют интерес для разработки способов таргетной фармакотерапии при диабете 2 типа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Improvement of insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus after oral administration of alpha-lipoic acid / P. Kamenova // *Hormones (Athens)*. – 2006. – Vol. 5(4). – P.251-258.
2. Lipoic acid synthase (LASY): a novel role in inflammation, mitochondrial function, and insulin resistance / I. Padmalayam [et al] // *Diabetes*. – 2009. – Vol. 58(3). – P. 600-608.
3. Sinha R.A. Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism / R.A. Sinha, B.K. Singh, P.M. Yen // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 14. – P. 259-269.
4. Brenta G. Why can insulin resistance be a natural consequence of thyroid dysfunction? / G. Brenta // *J. Thyroid Res.* – 2011. – Vol. 2011. – Art. 152850.

METABOLIC EFFECTS OF VITAMIN- AND AMINO ACID- CONTAINING COMPLEX (LIPOIC ACID, THIAMINE, TYROSINE) IN TYPE 2 DIABETES IN RATS

Nadolnik L.I., Polubok V.Ch., Vinogradov V.V.

Republican Research Unitary Enterprise "Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus", Grodno, 230023, Ploshchad Antoniia Tyzengauza, d.7, lnadolnik@tut.by

A model of experimental type 2 diabetes was used to establish that the administration of a vitamin-and amino acid-containing complex based on lipoic acid (lipoic acid, thiamine and tyrosine) over 4 weeks decreased the levels of blood glucose and the HOMA-IR resistance index and elevated the concentration of glucagon-like peptide -1. We suggest that the mechanisms of the found effects could be realized through the raised levels of free thyroid hormones which were noticed only in



female rats. In male rats, the effects of the complex were less significant compared to females, which might be mediated through protective action of estradiol that was increased in females.

ГУАНИДИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПИЛЛАР[5]АРЕНА, КАК НОВЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ

Назмутдинова В.А.¹, Александрова Ю.И.¹, Шурпик Д.Н.¹, Зеленихин П.В.², Стойков И.И.^{1,3}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Россия, 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, д. 29/1

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Россия, 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, д. 18.

³ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Россия, 420075 г. Казань, Научный городок-2, n-vika-art@mail.ru

В соответствии с последними обзорами ВОЗ за последние десятилетия более 80% хронических инфекционных заболеваний связаны с бактериальными биопленками, которые представляют серьезную угрозу общественному здоровью, так как большинство современных антибактериальных средств не способны к их разрушению. Следовательно, актуальным направлением исследований в медицинской химии является разработка новых антибактериальных препаратов, способных к эффективному разрушению или подавлению роста бактериальных биопленок.

В последние годы высокую биоцидную активность в борьбе с инфекционными заболеваниями проявили лекарственные средства, содержащие в качестве активного начала гуанидиновый фрагмент (сульгин, буформин, сферофизин, стрептомицин и др.). А одним из современных подходов предотвращения развития биопленок патогенных бактерий является ингибирование их образования с помощью производных парациклофанов – полифункциональных катионных производных пиллар[5]аренов. В связи с этим целью работы является синтез пиллар[5]аренов, содержащих девять и десять гуанидиновых фрагментов, и оценка их антибактериальных свойств по отношению к некоторым патогенным биопленкам. Для достижения поставленной цели была предложена и разработана стратегия региоселективной функционализации пиллар[5]арена с получением новых водорастворимых замещенных макроциклов с антибактериальными свойствами. Структура полученных целевых соединений и промежуточных продуктов была подтверждена и охарактеризована комплексом современных физических методов, таких как ЯМР ^1H , ^{13}C , ИК спектроскопии, ESI и MALDI масс-спектрометрии.

Исследование способности синтезированных макроциклов к самоассоциации в водных растворах методом динамического светорассеяния показало, что пиллар[5]арен, содержащий десять гуанидиновых фрагментов, не образует устойчивых самоассоциатов во всем диапазоне исследуемых концентраций (10^{-4} - 10^{-6} М). А производное, содержащее девять гуанидиновых фрагментов, в концентрации 10^{-5} М в воде способно к образованию устойчивой монодисперсной системы ($d_{cp}=141$ нм, $PDI=0,22$). Морфология полученных ассоциатов была изучена методом просвечивающей электронной микроскопии, согласно снимкам которой, поверхность образующейся пленки состоит из ассоциатов дендридной формы.

Биологические исследования по оценке антибактериальных свойств полученных гуанидиновых производных проводились при помощи колориметрических МИК (минимальная ингибирующая концентрация) тестов полученных производных по отношению к штаммам бактерий (*Salmonella typhimurium* TA 98, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Было показано, что макроцикл, содержащий 10 гуанидиновых фрагментов, ингибирует рост всех представленных бактериальных биопленок ($МИК=2-7 \times 10^{-5}$). В случае с пиллар[5]ареном, содержащим девять гуанидиновых фрагментов, исследования проводились по отношению к двум штаммам



бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*). В ходе исследования была выявлена обратная зависимость – с уменьшением концентрации макроцикла наблюдается рост его ингибирующей способности к подавлению развития бактериальных пленок, что показывает эффективность в низких концентрациях и пролонгацию действия ассоциированной формы пиллар[5]арена в борьбе с патогенными биоплёнками.

Таким образом, была разработана стратегия региоселективного синтеза новых водорастворимых катионных производных пиллар[5]арена, содержащих гуанидиновые фрагменты, что может найти применение в качестве новых антибактериальных агентов по отношению к бактериальным биоплёнкам.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-73-10166.

GUANIDINE DERIVATIVES OF PILLAR[5]ARENE AS NEW ANTIBACTERIAL AGENTS

Nazmutdinova V.A.¹, Aleksandrova Yu.I.¹, Shurpik D.N.¹, Zelenikhin P.V.², Stoikov I.I.^{1,3}

¹A.M. Butlerov Chemical Institute, Kazan Federal University, Kremlevskaya, 18,
420008, Kazan, Russia

²Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kremlevskaya, 18,
420008, Kazan, Russia;

³Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Center for Toxicological, Radiation and
Biological Safety", Scientific town-2, 420075, Kazan, Russia

In this study, new water-soluble pillarar[5]arene derivatives containing both ten and nine guanidine fragments were obtained by regioselective functionalization of pillar[5]arene. It was shown that pillar[5]arene **1** containing ten guanidine fragments does not form stable self-associates by dynamic light scattering. On the contrary, pillar[5]arene **2** with nine guanidine fragments at a concentration of 10^{-5} M in water has the ability to form stable self-associates ($d_{av}=141$ nm, PDI=0.22). According to the data of transmission electron microscopy, the surface of the resulting film of macrocycle **2** consists of dendritic associates. Macrocycle **1** was shown to inhibit the growth of five strains of bacterial biofilms ($MIC=2-7 \times 10^{-5}$) and an inverse relationship was found between the inhibitory ability of macrocycle **2** to the development of bacterial films (*St. aureus*, *Kl. pneumoniae*) on concentration of **2**.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТИПА ПРОЛОНГИРУЮЩЕГО КОМПОНЕНТА И ЕГО КОНЦЕНТРАЦИИ НА ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВЕ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА

Насенникова Е.Е., Климашевич В.Б., Гудович В.В., Юркштович Н.К.

Республиканское производственное унитарное предприятие «АКАДЕМФАРМ»,
220084, Минск, ул. Академика Купревича В. Ф., д. 5, корп. 3, info@academpharm.by

Введение. Для многих существующих лекарственных препаратов пролонгированная форма представляет собой продолжение и усовершенствование лекарственных средств с немедленным высвобождением. Достоинствами таких лекарственных форм являются увеличение продолжительности терапевтического эффекта, уменьшение частоты приема, устранение раздражающего действия лекарственного вещества на желудочно-кишечный тракт, уменьшение проявления побочных эффектов, исключения демпинга дозы и др. [1].

Тип и концентрация полимера, используемого в качестве матрицеобразующего компонента (пролонгатора), может оказать существенное влияние на фармацевтико-технологические характеристики таблеток, в частности, на прочность на сжатие и истирание.



Цель работы. Статистически оценить влияние типа пролонгирующего компонента и его концентрации в рамках исследуемых значений на прочность на сжатие и истирание таблеток на основе пентоксифиллина.

Методы исследования. Оценку влияния типа пролонгатора и его концентрации на фармацевтико-технологические характеристики таблеток определяли по расчетным уровням значимости с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с использованием статистического пакета анализа данных Statistica Version 10. В качестве объекта исследования использовали 8 вариантов опытных образцов таблеток, полученных методом влажной грануляции, которые представляют собой комбинацию высокомолекулярного соединения матрицеобразующего компонента гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), гидроксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ), карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и фосфатцеллюлозы (ФЦ) в двух концентрациях (35% и 45% от содержания активной субстанции) с низкомолекулярным активным пентоксифиллином дозировкой 400 мг. Для наработки опытных образцов использовали следующее оборудование: высокоскоростной смеситель-гранулятор, сушильный шкаф и лабораторный однопуансонный таблеточный пресс. Определение прочности на сжатие и истирание таблеток проводили с помощью специальных приборов: измеритель прочности таблеток на сжатие Erweka TBH 225 (Германия) и прибор для определения прочности таблеток на истирание Erweka TAR 120 (Германия) [2].

Результаты. Для оценки значимости влияния типа пролонгирующего компонента и его концентрации в таблетке на основе полученных значений прочности на сжатие и истирание опытных образцов таблеток провели двухфакторный дисперсионный анализ (с повторениями). Значимость факторов определяли по расчетным уровням значимости.

На основе того, что уровень значимости $P < \alpha$ заданного уровня значимости α (0,05) и, соответственно, расчетный F-фактор $> F$ критического для каждого из факторов отдельно и в комбинации, в ходе анализа установили, что оба фактора (тип пролонгирующего компонента и его концентрация в рамках исследуемых значений), а также их сочетание оказывают статистически значимое влияние на прочность на сжатие исследуемых таблеток, что подтверждается дисперсионным анализом, приведенным в таблице 1.

Таблица 1.

Пролонгатор	ГЭЦ	КМЦ	ГПМЦ	ФЦ	Итого	
Концентрация 0,35%						
	В 1	В 3	В 5	В 7		
Среднее значение, Н	141,13	108,87	122,67	116,97	122,41	
Концентрация 0,45%						
	В 2	В 4	В 6	В 8		
Среднее значение, Н	133,97	104,7	116,27	107,57	115,63	
Дисперсионный анализ						
Источник вариации	SS (сумма квадратов)	df (степень свободы)	MS (средний квадрат)	Критерий Фишера		Р-Значение
				F	F критич	
Между группами:						
Концентрация пролонгатора	276,08	1	276,08	255,24	4,49	2,95777E-11
Тип пролонгатора	3233,42	3	1077,81	996,43	3,24	2,1497E-18
Взаимодействие факторов	20,98	3	6,99	6,47	3,24	0,004496342
Внутри групп	17,31	16	1,08			
Итого	3547,79	23				



Также установлено, что максимальное значение прочности на сжатие достигнуто при использовании в качестве пролонгирующего компонента ГЭЦ в количестве 35% от содержания пентоксифиллина.

При оценке значимости влияния типа и концентрации пролонгирующего компонента на прочность на истирание исследуемых образцов установили, что концентрация и взаимодействие факторов статистически незначимо влияет на данный фармацевтико-технологический показатель (уровень значимости $P >$ заданного уровня значимости $\alpha (0,05)$ и, соответственно, расчетный F-фактор $<$ F критического). В свою очередь, тип пролонгатора оказывает статистически значимое влияние на прочность на истирание исследуемых таблеток (уровень значимости $P <$ заданного уровня значимости $\alpha (0,05)$ и, соответственно, расчетный F-фактор $>$ F критического), что указано в таблице 2.

Таблица 2.

Пролонгатор	ГЭЦ	КМЦ	ГПМЦ	ФЦ	Итого	
Концентрация 0,35%						
	В 1	В 3	В 5	В 7		
Среднее значение, %	0,13	0,16	0,2	0,36	0,21	
Концентрация 0,45%						
	В 2	В 4	В 6	В 8		
Среднее значение, %	0,13	0,16	0,22	0,37	0,22	
Дисперсионный анализ						
Источник вариации	SS (сумма квадратов)	df (степень свободы)	MS (средний квадрат)	Критерий Фишера		Р-Значение
				F	F критич	
Между группами:						
Концентрация пролонгатора	0,00042	1	0,00042	1,64	4,49	0,218666775
Тип пролонгатора	0,20	3	0,066	260,50	3,24	8,68397E-14
Взаимодействие факторов	0,00082	3	0,00027	1,07	3,24	0,389184711
Внутри групп	0,0041	16	0,00025			
Итого	0,20	23				

Минимальное значение истираемости достигнуто при использовании в качестве пролонгирующего компонента ГЭЦ независимо от выбранных значений концентраций. Наибольший эффект на показатель истираемости оказывает использование ФЦ в качестве пролонгатора независимо от выбранной концентрации в рамках исследуемых значений.

Заключение. В ходе исследований установлено статистически значимое влияние типа пролонгатора и его концентрации в заданных рамках значений на прочность на сжатие таблеток на основе пентоксифиллина, а также установлено статистически значимое влияние сочетания этих факторов, на прочность таблеток на истирание статистически значимое влияние оказывает только тип пролонгатора. Полученные данные можно использовать при разработке лекарственного препарата на основе пентоксифиллина пролонгированной формы, где в качестве матрицеобразующего компонента предлагается использование ГПМЦ, ГЭЦ и КМЦ, обеспечивающие получение таблеток с достаточными прочностными характеристиками.



ЛИТЕРАТУРА

1. Высокомолекулярные эфиры целлюлозы. механизмы действия в матричных таблетках пролонгирующего действия. зависимость профиля высвобождения активной субстанции от молекулярной массы и гидрофильных свойств полимера / С.В. Трофимов // Фармация и фармакология. – 2015. – Вып. 12, № 5. – С. 18-25.
2. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II): в 2 т. / под общ. ред.: А.А. Шерякова. – Молодечно: Победа, 2012. – Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств. – С. 432-433.

INFLUENCE TYPE EVALUATION OF THE PROLONGING COMPONENT AND ITS CONCENTRATION ON THE PHARMACEUTICAL AND TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PENTOXIFYLLINE-BASED TABLETS

Nasennikava K.E., Klimashevich V.B., Gudovich V.V., Yrkshtovich N.K.

State Enterprise «ACADEMPHARM», academician Kuprevich str., 5/3, 220084, Minsk, Republic of Belarus, info@academpharm.by

It was statistically evaluated the influence of the type of prolonging component and its concentration within the studied values on the hardness and friability of tablets based on pentoxifylline.

5-(2-MERCAPTOETHYL)TETRAZOLE AND SILVER NANOPARTICLES CAPPED WITH IT: ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND SOME OTHER PROPERTIES

Nichick M.N.^{1,2}, Zuraev A.V.^{1,2}, Voitekhovich S.V.², Kuzmenko S.¹

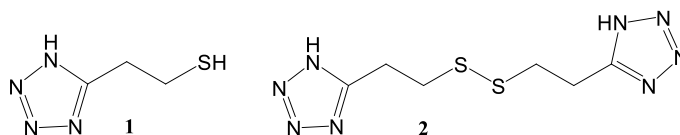
¹Belarusian State University, Minsk, Belarus, Nezaleznasty ave., 4, 220030

²Research Institute for Physical Chemical Problems, Minsk, Belarus, Leningradskaya str., 14, 220006, nichick@bsu.by

Biologically active nanocomposites, including those with silver nanoparticles (NPs), have a pronounced antimicrobial activity, which makes them an indispensable pharmaceutical tool in the fight against diseases caused by pathogenic and opportunistic microflora. In some cases, silver nanoparticles have an even more pronounced antibacterial effect than ions. NPs can be used both to modify traditional and to create new materials, coatings, cosmetics, disinfectants and detergents. The bactericidal properties of metallic silver are associated with its slow oxidation and release of Ag⁺ silver ions into the environment. NPs show high antibacterial efficiency due to their developed surface, which provides maximum contact with the environment. The method of preparation and the stabilizer used largely determine the properties of NPs. Recent studies have shown that tetrazole derivatives can be used as active pharmaceutical ingredients.

In continuation to our previous studies [1,2], we carried out the synthesis, studied the physicochemical and antibacterial properties of water-soluble silver NPs, stabilized by tetrazole derivative. In addition to the outstanding ability to act as a ligand and to stabilize metals NPs, tetrazole derivatives can often exhibit both antibacterial and antifungal activity.

Here we report synthesis and characterization of Ag NPs capped by 5-(2-mercaptoethyl)tetrazole (ligand **1**) *in situ* formed. It was found that stable aqueous Ag sols can be obtained by reduction of silver ions by NaBH₄ in presence of disulfide **2**. In this case, ligand **1** is generated *in situ* by splitting of the S–S bond of **2** upon the addition of reducing agent. At the same time, the direct use of ligand **1** as a stabilizer did not lead to the formation of silver NPs. The resulting solution was characterized by the absence of peaks in the studied region of the absorption spectrum (300–900 nm), which may indicate the formation of silver clusters.



The observed differences in the synthesis of nanoparticles using ligand **1** and ligand **2** may be due to differences in the complexing ability of these compounds. In the case of ligand **1**, chelation due to S, N-coordination can hinder the reduction of silver ions.

The obtained sol has been purified dialysis; zeta (ζ -) potential has been studied. Synthesized NPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM) scanning microscopy (SEM), FTIR and UV-visible spectroscopy, thermogravimetric analysis. The value of the ζ -potential, equal to -25.2 mV, indicates the formation of a stable silver sol, the absorption spectrum of which has a maximum at 420 nm. According to the TEM, formation of crystalline, spherical silver NPs with sizes of 5.2–6.3 nm, as well as particles with sizes not exceeding 2 nm, occurs. The resulting NPs are well dispersed in water and remain stable in solution for at least 9 months of storage at room temperature under dark conditions. Comparative analysis of the IR spectra of the powdered NPs and free ligand **1** indicates that the surface of the NPs is covered by thiolate anions.

Based on data of scanning microscopy, it was established that the thermal treatment of the obtained silver NPs stabilized by 5-(2-mercaptoethyl)tetrazole in an inert nitrogen atmosphere up to 500°C leads not only to the removal of the surface ligand, but also to a change in the shape of the nanoparticles. The presence of clearly defined edges in such particles can enhance the antibacterial and fungicidal properties compared to spherical NPs.

To study the antibacterial activity of the compounds, we used the method of diffusion into agar on a dense nutrient medium by comparing the sizes of the zones of inhibition of the growth of test microorganisms observed when testing solutions of certain concentrations of a standard sample and the test compound [3]. Pure cultures of the facultative anaerobic gram-positive microorganism *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and the facultative anaerobic gram-negative microorganism *Escherichia coli* (ATCC 25922) were selected as test objects, which were previously grown on slant beef agar. The standard bacterial suspension was prepared on the basis of a sterile 0.9% sodium chloride solution. To do this, a bacteriological loop was used to introduce the culture into a vial with sterile saline, and the concentration of microorganisms was adjusted to a value of 0.5 units of the McFarland turbidity standard [3].

The corresponding suspension of microorganisms (1.0 ml) was added to the frozen agar using an automatic dispenser under sterile conditions in Petri dishes. After uniform distribution of microorganisms over the entire agar surface, Petri dishes were incubated at room temperature for 15–20 min. Then, wells with a diameter of 6.0 mm were made on Petri dishes with microorganisms. Next, 20 μ l of the tested samples and a standard sample at a concentration of 1000 μ g/ml were added to the wells. The samples were incubated for 24 h, and then the diameter of the inhibition growth zone of microorganisms was assessed. An aqueous solution of the antibiotic Cefotaxime was used as a reference for a comparative assessment of the antimicrobial activity. As a standard, a sample of an antibiotic was chosen in the form of a lyophilized powder for injections of 1.0 g manufactured by «Belmedpreparaty» RUE.

The results were recorded by the presence or absence of bacterial growth around the wells by measuring the diameter of the zone around the well in millimeters. At the same time, it was believed that the continuous growth of colonies of microorganisms or the presence of an inhibition zone with a diameter of less than 10 mm indicate the absence of antimicrobial activity of the test sample against the test strain. The presence of an inhibition zone with a diameter of 10–15 mm indicates a weak



antimicrobial activity, 15–20 mm indicates a moderately pronounced activity, and more than 20 mm indicates a strongly pronounced activity.

A comparative analysis of the antimicrobial activity of pure ligand **1** and silver NPs led to rather unexpected results. Thus, in relation to the gram-negative strain *E. Coli* (ATCC 25922), the antimicrobial activity of the standard sample of the antibiotic was pronounced – the zone of inhibition is 24.0 ± 0.1 mm, at the same time, the antimicrobial efficacy of both the ligand **1** and silver NPs was absent. When studying the antimicrobial activity of the samples against the gram-positive strain *S. aureus* (ATCC 6538), it was found that the antimicrobial efficacy of both, the ligand **1** and NPs was quite high and was comparable to the activity of an antibiotic. The diameter of the strain growth inhibition zone for a standard antibiotic sample was 23.5 ± 0.1 mm; for a pure ligand – 26.3 ± 0.6 mm; and for NPs – 22.5 ± 0.5 mm. The data obtained indicate a pronounced antimicrobial activity of both the free ligand **1** and silver NPs stabilized by it against the gram-positive *S. aureus* strain. At the same time, taking into account the fact that the content of the surface ligand in the composition of NPs, according to TGA data, is no more than 13.5% by weight, it can be assumed that the antimicrobial activity of NPs is associated mainly with the action of silver ions and, to a small extent, with the activity of the ligand itself. A synergistic effect between the ligand and NPs is also possible.

Thus, a new stabilizer and a simple method for preparation of highly concentrated silver sols stable in the aqueous phase are proposed. As a stabilizer of silver nanoparticles, 5-(2-mercaptoethyl)tetrazole, generated *in situ* by the reduction of 1,2-bis(2-(1*H*-tetrazol-5-yl)ethyl)disulfan, was used. Crystalline, spherical silver NPs were obtained with sizes not exceed 6.3 nm. The results of the study of antibacterial activity indicate a pronounced antimicrobial activity of both the free ligand and the silver NPs, in relation to the gram-positive strain – *S. aureus*, comparable to the activity of the antibiotic Cefotaxime. Comparable antibacterial activity in stabilized silver NPs and pure tetrazole may be due to a synergistic effect between the ligand and NPs, since the content of the surface ligand in the composition of NPs, according to TGA data, is no more than 13.5% by weight.

REFERENCES

1. 1-Substituted Tetrazole-5-thiol-Capped Noble Metal Nanoparticles / Nichick M.N. [et al.] // J. Phys. Chem. C. – 2011. – Vol. 115. – P. 16928-16933.
2. 5-(2-Mercaptoethyl)-1*H*-tetrazole: Facile Synthesis and Application for the Preparation of Water Soluble Nanocrystals and Their Gels / Voitekhovich S.V. [et al.] // Chem. Eur. J. – 2016. – Vol. 22. – P. 14746-14752.
3. Testing activity of antibiotics by agar diffusion / Kuleshova S.I. // Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin. – 2015. – Vol. 3. – P.13-17.

Н-АЦЕТИЛЦИСТЕИН В РЕГУЛИРОВАНИИ Cu^{2+} (Fe^{2+})-ОПОСРЕДОВАННОЙ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ ГЛИЦЕРОФОСФАТА

Овсянникова Е.М.¹, Солонинкина И.О.¹, Юркова И.Л.^{1,2}

¹Белорусский государственный университет, Беларусь, Минск, 220050,
ул. Ленинградская, 14, oekaterina6666@gmail.com

²НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, 220030,
Беларусь, Минск, ул. Ленинградская, 14, yurkovail@bsu.by

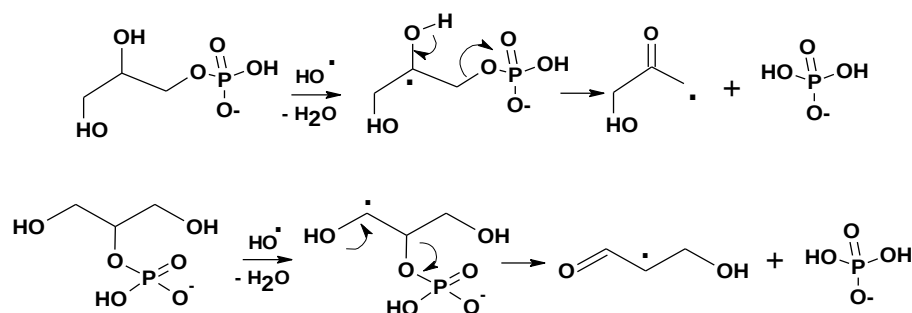
Введение. N-ацетил-L-цистеин (АЦЦ) широко используют в качестве муколитического средства, выявляют его возможности в терапии рака, психических и неврологических патологий [1,2]. АЦЦ обладает антиоксидантной активностью и может регулировать процессы с участием активных форм кислорода (АФК) ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HClO , $\text{HO}^{\cdot}$), избыточное образование которых ведет к развитию окислительного стресса. По этой причине терапевтический потенциал АЦЦ связывают с теми заболеваниями, патология которых обусловлена

прогрессированием окислительного стресса. Однако молекулярные механизмы, касающиеся радикал-регуляторных свойств АЦЦ при различных физиологических условиях, до конца не выяснены. Влияние АЦЦ на свободнорадикальные процессы не однозначно, оно может быть как анти-, так и прооксидантным [3,4].

Среди АФК гидроксильный радикал ($\text{HO}^\bullet$) – самая реакционно способная и токсичная частица из известных в настоящее время. Радикалы $\text{HO}^\bullet$ инициируют процессы деструкции важнейших биомолекул с высокой скоростью ($10^9\text{--}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) и играют решающую роль в развитии патологий [2]. В настоящее время нет никакой известной ферментативной реакции, способной детоксифицировать $\text{HO}^\bullet$ *in vivo*.

При выяснении антиоксидантной роли АЦЦ в регулировании свободнорадикальных процессов в клетках изучают его влияние на пероксидное окисление глицерофосфолипидов, протекающее в гидрофобном фрагменте биомембран [3]. В тоже время при взаимодействии радикалов $\text{HO}^\bullet$ с амфифильными молекулами гидроксилсодержащих глицерофосфолипидов (фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин, лизофосфатидилглицерин, кардиолипин) в их полярных фрагментах реализуется процесс свободнорадикальной фрагментации [5]. Он протекает через стадию образования первичных α -гидроксилсодержащих углеродцентрированных радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OR}_1)\text{--}\dot{\text{C}}(\text{OH})\text{--}\text{H}_2\text{C--OP}(\text{O})\text{O}_2\text{R}_2^-$ (где R_1, R_2 – остаток молекулы), которые распадаются с разрывом фосфоэфирной связи и элиминированием фосфатидной кислоты, вторичного мессенджера в биосистемах. Свободнорадикальная фрагментация глицерофосфолипидов реализуется *in vitro* и *in vivo* в условиях металл-опосредованного генерирования активных форм кислорода [5]. Роль АЦЦ в регулировании свободнорадикальной фрагментации глицерофосфолипидов в их полярной части не изучена.

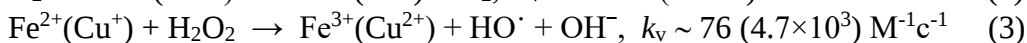
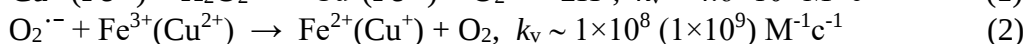
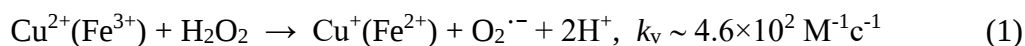
Процесс свободнорадикальной фрагментации характерен для фосфоэфиров глицерина (глицеро-1-фосфат, глицеро-2-фосфат), которые содержат в себе фрагменты структуры глицерофосфолипидов. При действии систем генерации $\text{HO}^\bullet$ на водные растворы глицерофосфатов разрыв фосфоэфирной связи в их молекулах происходит преимущественно за счет реакции фрагментации первичных α -гидроксилсодержащих углеродцентрированных радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{--}\dot{\text{C}}(\text{OH})\text{--}\text{H}_2\text{C--OP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2^-$ и $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{--}\text{HC}(\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2^-)\text{--}\dot{\text{C}}\text{H}(\text{OH})$ $\{\text{HC}^\bullet(\text{OH})\text{--}\text{HC}(\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2^-)\text{--}\text{CH}_2(\text{OH})\}$ [5]:



Свободнорадикальное дефосфорилирование глицерофосфатов протекает с высокой скоростью ($k_v > 10^6 \text{ c}^{-1}$) [5] и моделирует процесс деструкции глицерофосфолипидов с разрывом фосфоэфирной связи в полярной части биомембран.

Целью данной работы было изучение влияния АЦЦ на $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -опосредованную свободнорадикальную фрагментацию глицеро-2-фосфата (ГФ) с разрывом фосфоэфирной связи и его способности регулировать уровень радикалов $\text{HO}^\bullet$ в присутствии ионов $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$.

Ионы переходных металлов (Fe^{2+} , Cu^+ и др.) играют важную роль в развитии окислительного стресса в организме [2, 5]. Они катализируют разложение H_2O_2 с образованием $\text{HO}^\bullet$ (см. реакции ниже), которые вносят основной вклад в образование первичных радикалов ГФ (см. схему). Поэтому для индукции свободнорадикальной фрагментации ГФ были выбраны редокс-системы $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})\text{--}\text{H}_2\text{O}_2$.



Методика эксперимента. Свободнорадикальную фрагментацию ГФ оценивали по образованию молекулярного продукта – неорганического фосфата, который в растворах ГФ (рН 7.0) определяли фотоколориметрически. В основе анализа использована цветная реакция фосфат-аниона с молибдатом аммония. Способность АЦЦ (диапазон концентраций 0,005–1,0 мМ) акцептировать или опосредовать образование $\text{HO}^{\cdot}$ в системах $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})\text{-H}_2\text{O}_2$ оценивали методом флуоресцентных зондов. В качестве зонда использовали терефталевую кислоту (ТФК), реагирующую с $\text{HO}^{\cdot}$ с образованием флуоресцентного продукта (2-гидроксигидрокси-терефталат, $\lambda_{\text{воз}} = 315$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 418$ нм). В соответствии со стехиометрией реакции концентрация радикалов $\text{HO}^{\cdot}$ прямо пропорциональна интенсивности флуоресценции 2-гидроксигидрокси-терефталата.

Полученные результаты. При исследовании влияния АЦЦ (в диапазоне концентраций 0.25-10.0 мМ) на дефосфорилирование ГФ в условиях $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})$ -опосредованного генерирования радикалов $\text{HO}^{\cdot}$ выявлено, что действие АЦЦ может быть про- или антиоксидантным.

АЦЦ при соотношении АЦЦ: Cu^{2+} 1:1 действует нейтрально, от 1:2 до 20:1 активирует фрагментацию ГФ, индуцированную системой $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$. Реакция АЦЦ с H_2O_2 без участия ферментов при нейтральных значениях рН протекают крайне медленно, и не может вносить какой-то значимый вклад в действие АЦЦ. Однако АЦЦ обладает высокой реакционной способностью по отношению к радикалам $\text{HO}^{\cdot}$ ($k_v\text{HO}^{\cdot} = 1,36 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Можно было ожидать, что АЦЦ будет акцептировать $\text{HO}^{\cdot}$, образующиеся в системе $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$, и, тем самым, препятствовать их атаке на молекулы ГФ. Прооксидантный эффект АЦЦ можно объяснить его взаимодействием с ионами меди. АЦЦ вероятно координирует ионы Cu^{2+} (к. ч 4 или 6) таким образом, что это способствует их восстановлению до Cu^+ (к. ч 2 или 4). Это в свою очередь будет содействовать протеканию реакции (3) и повышению уровня $\text{HO}^{\cdot}$. Это согласуется с нашими результатами, полученными при исследовании $\text{HO}^{\cdot}$ -активности АЦЦ методом флуоресцентных зондов. АЦЦ повышает уровень $\text{HO}^{\cdot}$ в редокс-системе $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$ и только при соотношении АЦЦ: $\text{Cu}^{2+} > 3:1$ способствует его снижению. АЦЦ в качестве химиопрофилактического средства часто применяют в комбинации с аскорбиновой кислотой (Аск), которая также может обнаруживать как про-, так и антиоксидантные свойства в присутствии ионов переходных металлов. Изучение влияния АЦЦ на фрагментацию ГФ, индуцированную смесью Аск- $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$, показало, что его эффект претерпевает инверсию на антиоксидантный, который усиливается с ростом концентрации тиола. При выбранных условиях в системе $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$ с добавкой Аск, вероятно, доля АЦЦ, участвующая в восстановлении Cu^{2+} снижается, и в большей степени проявляются его $\text{HO}^{\cdot}$ -акцепторные свойства. Это подтверждается методом флуоресцентных зондов. В системе $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$ в присутствии Аск $\text{HO}^{\cdot}$ -активирующее действие АЦЦ в том же концентрационном диапазоне выражено значительно слабее, а антиоксидантный эффект наблюдается при его более низких количествах, при $[\text{АЦЦ}] = 0,1$ мМ процент гидроксилирования ТФК снижается со 150% (без Аск) до 75% (с Аск). Аскорбат также может восстанавливать тиольные радикалы $\text{RS}^{\cdot}$, образующиеся при взаимодействии тиола (RSH) с $\text{HO}^{\cdot}$ или ионами Cu^{2+} , и, тем самым, повышать антирадикальный потенциал системы.

В случае фрагментации ГФ, индуцированной системой $\text{Fe}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$, АЦЦ при соотношении АЦЦ: Fe^{2+} от 1:2 до 2:1, действует нейтрально, при от 10:1 до 20:1 оказывает активирующий (> 2 раза) эффект. При индуцировании гомолитического дефосфорилирования ГФ системой $\text{Fe}^{2+}/\text{ЭДТА}\text{-H}_2\text{O}_2$ АЦЦ при всех соотношениях АЦЦ: Fe^{2+} интенсифицирует фрагментацию ГФ. Результаты, полученные методом флуоресцентных зондов, и введение добавок азида натрия – эффективного акцептора радикалов $\text{HO}^{\cdot}$ – указывают на то, что прооксидантное действие АЦЦ



в присутствии ионов железа отчасти обусловлено его способностью повышать потенциал систем Fe^{2+} - H_2O_2 и Fe^{2+} /ЭДТА- H_2O_2 генерировать $\text{HO}^\cdot$. Активирующее действие АЦЦ может быть обусловлено его влиянием на соотношение $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Различия в эффектах можно объяснить разницей в величинах окислительно-восстановительных потенциалов.

Заключение. N-ацетилцистеин оказывает как про-, так и антиоксидантный эффект на $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -опосредованную фрагментацию глицерофосфата с разрывом фосфэфирной связи. Действие АЦЦ зависит от вида иона переходного металла M^{n+} , молярного соотношения АЦЦ: M^{n+} , присутствия различных БАВ (ЭДТА, аскорбат), в общем от баланса его $\text{HO}^\cdot$ -акцепторных, восстановительных и комплексообразующих свойств. Полученные результаты важны для понимания молекулярных механизмов действия АЦЦ в регулировании свободнорадикальных процессов в биомембране в присутствии ионов переходных металлов.

Работа поддержана ГПНИ Республики Беларусь «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганическая химия» (проект 2.2.03.04), Министерством образования РБ (грант 772/46).

ЛИТЕРАТУРА

1. N-Acetylcysteine (NAC): Impacts on Human Health / M.C.d.S. Tenório [et al.] // Antioxidants. – 2021. – Vol. 10. – P. 967-1001.
2. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine / Y. Samuni, S. Goldstein, O.M. Dean, M. Berk // BBA. – 2013. – Vol. 1830. – P. 4117-4129.
3. Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation / M. Sagrista, A. Garcia, M. De Madariaga, M. Mora // Free Radic. Res. – 2002. – Vol. 36. – P. 329-340.
4. N-acetyl-L-cysteine in the presence of Cu^{2+} induces oxidative stress and death of granule neurons in dissociated cultures of rat cerebellum / E.V. Stelmashook [et al.] // Biochemistry Moscow. – 2017. – Vol. 82. – P. 1176-1182.
5. Свободнорадикальные реакции глицеро- и сфинголипидов / И.Л. Юркова // Успехи химии. – 2012. – Т. 81, № 2. – С. 175-190.

N-ACETYL-CYSTEINE IN THE REGULATION OF $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -MEDIATED FREE RADICAL FRAGMENTATION OF GLYCEROPHOSPHATE

Ovsyannikova E.M.¹, Soloninkina I.O.¹, Yurkova I.L.^{1,2}

¹Belarusian State University, 220050, Belarus, Minsk, st. Leningradskaya, 14,
oekaterina6666@gmail.com

²Research Institute of Physical and Chemical Problems of the Belarusian State University,
220030, Belarus, Minsk, st. Leningradskaya, 14, yurkovail@bsu.by

The effect of N-acetylcysteine (NAC) (in the concentration range of 0.25-10.0 mM) on free radical fragmentation of glycerophosphate with the rupture of phosphoester bond under conditions of $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})$ -mediated generation of $\text{HO}^\cdot$ radicals has been studied. It was shown that NAC has two contradictory activities: it can be pro-oxidant and antioxidant. It depends on the type of Me^{n+} ion, the NAC: Me^{n+} molar ratio, and the presence of various biologically active substances (EDTA, ascorbate). The results obtained are important for understanding the mechanisms of molecular action of NAC in the regulation of free radical processes in the cell.

ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ, ПРОИЗВОДНЫХ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ, НА ИНДУКЦИЮ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И УРОВЕНЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ АФК

Панибрат О.В., Божок Т.С., Фарина А.В., Калиниченко Е.Н.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, kalinichenko@iboch.by

В настоящее время широкое распространение получила таргетная (направленная) терапия рака, а именно ингибирование протеинкиназ участвующих в фосфорилировании рецепторов факторов роста, которые непосредственно участвуют в запуске процессов деления клетки, а также других значимых сигнальных путях клетки.

Киназы играют перекрывающиеся и сложные роли в трансформации клеток, инициации опухоли, выживании опухолевых клеток и пролиферации. Цитоплазматические тирозинкиназы являются важными переносчиками внеклеточных сигналов, а мутации в генах киназ происходят при различных онкогенных состояниях. Представители семейства протеин/липидкиназ РІЗК с двойной специфичностью являются наиболее часто встречающимися мутантными киназами, вовлеченными в 30-50% раковых заболеваний человека, например, РІЗКСА, АКТ, Akt/PKB, BRAF, JAK2 и др. Точно так же генетические изменения других типов киназ, таких как ALK, IGF-1R, c-Kit, FGFR1-4, c-Met, c-Ret, c-SRC, EGFR регулируют фундаментальные молекулярные механизмы роста и развития опухолевых клеток [1]. Другим важным семейством киназ являются киназы Aurora A, B, C. Киназы Ауорога сверхэкспрессируются в опухолевых клетках и способствуют выживанию клеток, метастазированию и предотвращению апоптоза. Также выживанию опухолевых клеток способствуют киназы MEK1, MEK2, mTOR и S6. Еще одна категория киназ, участвующих в онкогенезе, включает киназы, сверхэкспрессированные в опухолях и окружающих раковых тканях, которые важны для поддержания опухолей в организме опухоленосителя. К ним относятся мутации рецептора нейротрофического фактора роста (NGFR), вовлеченные в пилоцитарную астроцитому, наиболее распространенную опухоль головного мозга у детей, мутации рецептора роста эндотелия сосудов (VEGFR) и рецептора фактора роста фибробластов (FGFR), протеинкиназы CK2 и TrkB [2]. В целом, онкогенные киназы лежат в основе и определяют множество признаков рака, включая быструю пролиферацию, выживаемость, рост и метастазирование, и поэтому синтез и изучение механизмов действия ингибиторов киназ имеет важное значение для онкологии.

Ранее нами проведена оценка влияния потенциальных ингибиторов протеинкиназ на основе изофталевой и терефталевой кислот на жизнеспособность опухолевых клеток различных линий: K562 (хроническая миелогенная лейкемия), HL-60 (промиелоцитарная лейкемия), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HepG2 (карцинома печени), A549 (рак легкого), OKP-GS (карцинома почек). Выявлено несколько кандидатов с высокой цитотоксичностью (рисунок 1).

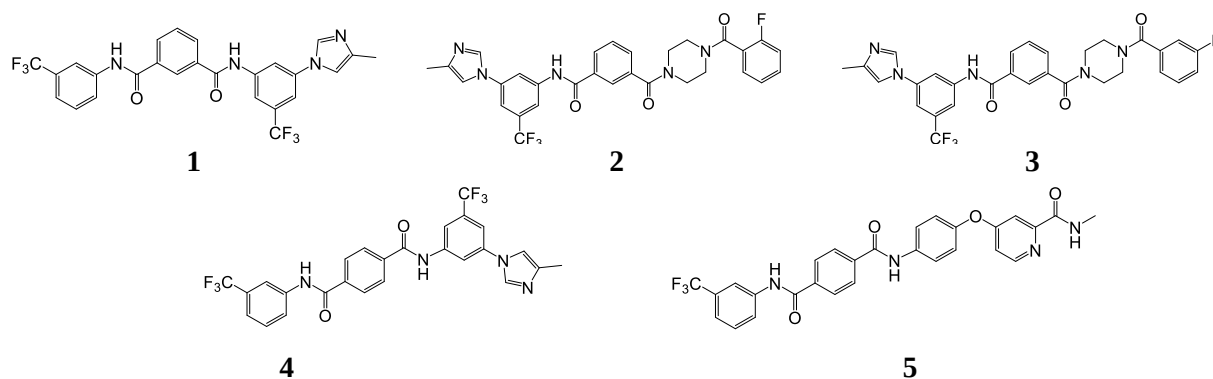


Рисунок 1. Структура исследуемых соединений

Цель данной работы – исследовать способность этих соединений вызывать апоптоз опухолевых клеток и изменять при этом уровень внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) на примере линии K562.

Апоптоз – универсальный и чрезвычайно эффективный путь гибели клеток, предназначен для удаления клеток из нормально развивающейся или функционирующей ткани, который не вызывает повреждения соседних клеток и не запускает воспалительный процесс. Некроз, напротив, является результатом физического повреждения клетки, а выделяющиеся при этом из клетки вещества провоцируют воспалительный процесс. Поэтому изучение процессов апоптоза и некроза в клетках под действием новых фармакологических препаратов является особенно важным [3].

Индукцию апоптоза изучали путем измерения транслокации фосфатидилсерина из цитоплазмы на наружную сторону плазматической мембраны. Клетки K562 обрабатывали соединениями 1-5 в концентрации 1, 5, 10 мкМ, а также стандартными ингибиторами протеинкиназ сорафенибом и лапатинибом в течение 48 часов, после чего связывание аннексина-V/йодида пропидия (PI) измеряли методом проточной цитометрии (рисунок 2).

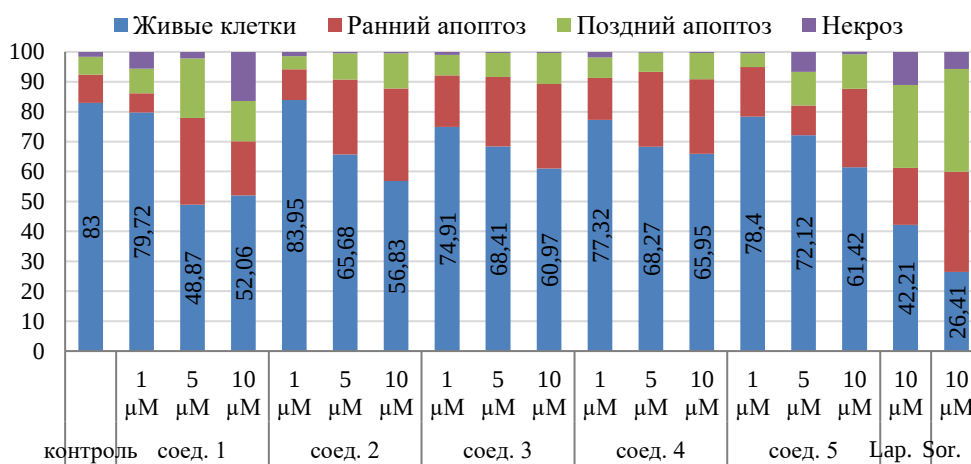


Рисунок 2. Анализ апоптоза в клетках K562 под действием исследуемых соединений

Полученные данные (рисунок 3) показывают, что соединение 1 обладает выраженным токсическим действием.

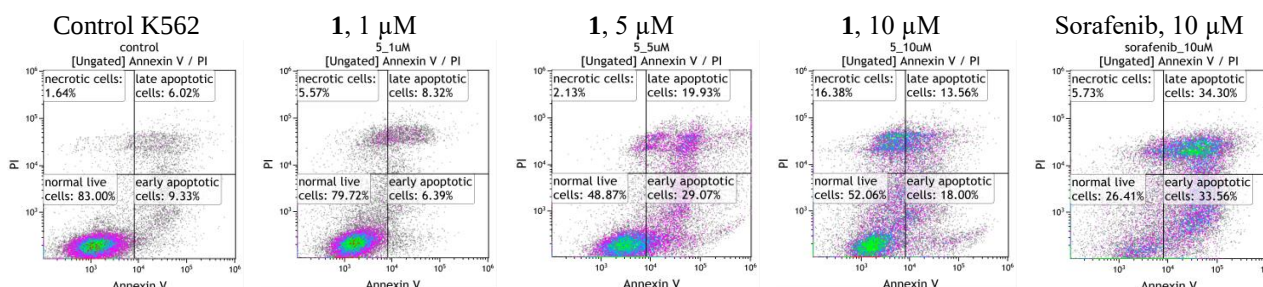


Рисунок 3. Дифференциальное окрашивание апоптотических и некротических клеток под действием изофталевого производного 1

При увеличении концентрации до 10,0 мкМ количество живых клеток составляло 52,06%, в то время как некроз достигал 16,38%. Производные изофталевой кислоты 2 и 3, содержащие фрагмент 2(3)-фторбензоилпиперазина, не вызывали некротического воздействия на K562 клетки, при этом число живых клеток незначительно уменьшалось в зависимости от концентрации и составляло не менее 56,83% против 42,21% и 26,41% для



лапатиниба и сорафениба, соответственно. Та же ситуация наблюдалась и в случае соединений **4** – 65,95% живых клеток и **5** – 61,42%. Значимое увеличение количества некротических клеток при действии соединений **2-5** не было выявлено, что указывает на преобладание апоптоза в механизме действия этих соединений (Рисунок 2).

Как при некрозе, так и при апоптозе, высокий уровень АФК способствует гибели опухолевых клеток [4,5].

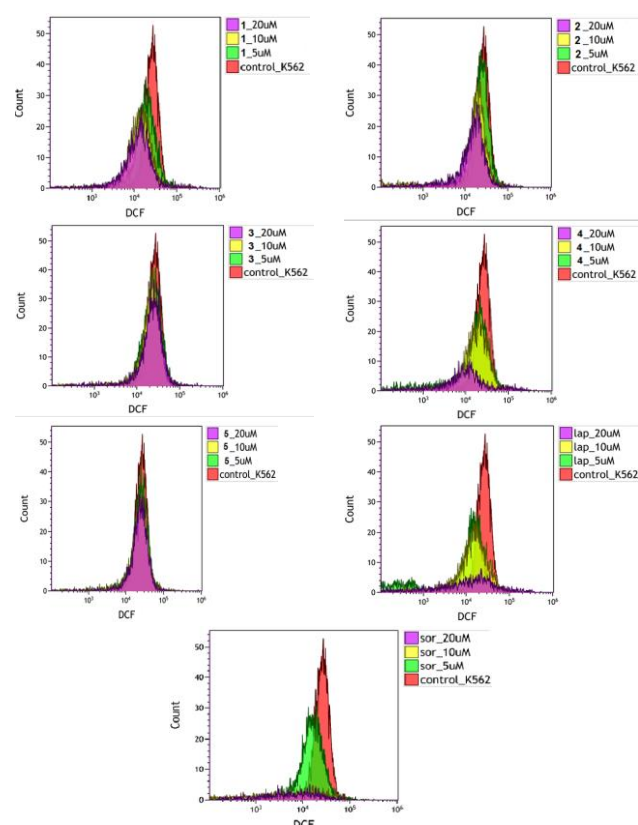
Оценка редокс-статуса выполнена на клетках линии K562 в присутствии соединений **1-5** в концентрации 5, 10 и 20 мкМ, а также лапатиниба и сорафениба. Внутриклеточный уровень АФК определяли с использованием флуоресцентного зонда – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата. Измерение проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 Beckman Coulter.

Полученные данные (таблица) в случае соединения **1** показали снижение АФК до 62,9% при 20 мкМ и одновременно снижение количества клеток; производное **2** демонстрировало дозозависимое снижение АФК до 71,90%, в то время как его изомерный аналог **3** показал лишь базовый уровень накопления АФК в присутствии аналогичных концентраций в этой клеточной линии.

Соединение **4** также вызывало дозозависимое снижение АФК до 64,75%, а соединение **5** не оказывало влияния на базовый уровень АФК клеток.

Таблица. Изменение уровня АФК под действием исследуемых соединений **1-5**

Проба	Концентрация, мкМ	Уровень АФК в % от контроля
Контр.	-	100%
1	5	76,76%
	10	64,66%
	20	62,90%
2	5	92,84%
	10	76,96%
	20	71,90%
3	5	92,89%
	10	87,87%
	20	94,07%
4	5	83,83%
	10	80,55%
	20	64,75%
5	5	96,75%
	10	95,59%
	20	94,18%
Lap	5	64,12%
	10	72,23%
	20	89,07%
Sor	5	69,20%
	10	79,03%
	20	71,59%



Так как 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат превращается в свою восстановленную форму только в живых клетках с целой мембраной, снижение АФК, вероятно, связано с достаточно высоким уровнем некроза в случае соединения **1**, либо интенсивным образованием апоптотических телец в случае соединений **2** и **4** при увеличении действующих концентраций этих соединений.



ЛИТЕРАТУРА

1. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions / Bhullar K.S. [et al.] // Mol. Cancer. – 2018. – Vol. 17. – Art. 48.
2. Importance of Protein Kinase and Its Inhibitor: A Review / Theivendren P. [et al.] // Protein Kinases – Promising Targets for Anticancer Drug Research. – IntechOpen, 2021. – Ch. 5. – Editor: Rajesh K. Singh Punjab, Miroslav Blumenberg. – 162 p.
3. Green D.R. Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms // Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011. – 220 p.
4. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy / Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.M. // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2000. – Vol. 32(2). – P. 157-170.
5. The tumorigenic roles of the cellular REDOX regulatory systems / Castaldo S.A. [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2016. – Art. ID 8413032.

EFFECT OF POTENTIAL PHTHALIC ACID PROTEIN KINASE INHIBITORS ON THE INDUCTION OF APOPTOSIS IN CANCER CELLS AND THE LEVEL OF INTRACELLULAR ROS

Panibrat O.V., Bozhok T.S., Farina A.V., Kalinichenko E.N.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, kalinichenko@iboch.by*

Inhibitors of protein kinases on the bases of phthalic acid have been synthesized; *in vitro* tests have revealed compounds that effectively reduce the growth of tumor cells. It was found that all the studied compounds cause dose-dependent apoptosis of the K562 cell line. Compounds **1**, **2**, **4** cause a dose-dependent decrease in ROS, compounds **3** and **5** do not affect the level of ROS.

ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ – ПРОИЗВОДНЫХ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Панибрат О.В., Божок Т.С., Фарина А.В., Калиниченко Е.Н.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, kalinichenko@iboch.by

В настоящее время в качестве широко изучаемой мишени в таргетной терапии рака выступают ферменты протеинкиназы, которые регулируют метаболические пути, а также пути сигнальной трансдукции внутри клетки. В том числе протеинкиназы регулируют клеточный цикл, рост и дифференцировку клеток, апоптоз. Нарушения работы протеинкиназ приводят к различным патологиям, в том числе к возникновению некоторых видов рака [1]. Для лечения опухолей такой этиологии разрабатывают лекарства, ингибирующие специфические протеинкиназы. С момента разработки первого ингибитора протеинкиназы в начале 1980-х годов 37 ингибиторов киназы получили одобрение FDA для лечения злокачественных новообразований, таких как рак груди и легких. Кроме того, около 150 препаратов, мишенями которых являются киназы, находятся на стадии клинических испытаний, а многие специфические ингибиторы киназ находятся на доклинической стадии разработки лекарств. Примерами мутантных протеинкиназ, играющих значимую роль в трансформации клеток, инициации опухоли, выживании опухолевых клеток и пролиферации, могут выступать цитоплазматические тирозинкиназы семейства PI3K: PI3KCA, AKT, Akt/PKB, BRAF JAK2, киназы семейства Auroга (Auroга A, B, C), киназы сигнальных путей MAPK, PI3K-Akt и EGFR: MEK1, MEK2, mTOR и S6, соответственно, киназы-рецепторы факторов роста (VEGFR, NGFR, FGFR) [2]. В связи с большим разнообразием киназ, участвующих в опухолевом процессе, актуален поиск новых ингибиторов протеинкиназ с высокой специфичностью.

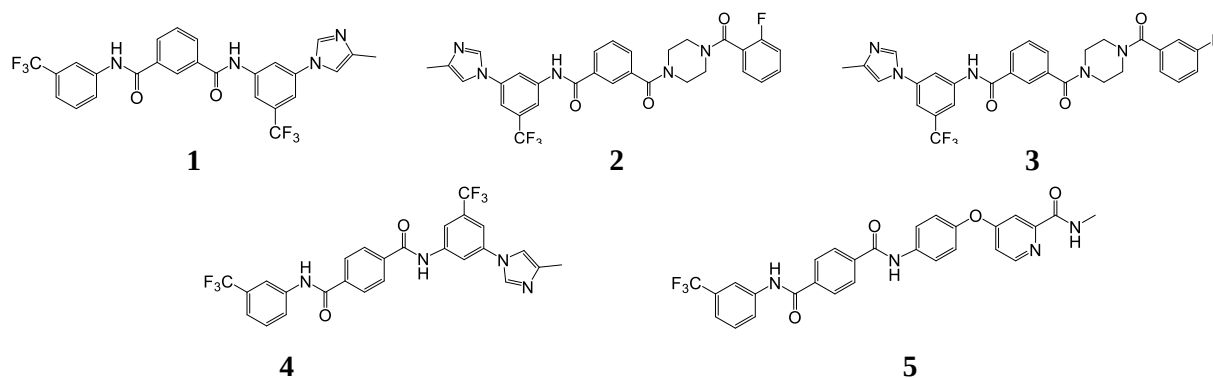


Рисунок 1. Структура исследуемых соединений

В данной работе проведена оценка влияния потенциальных ингибиторов протеинкиназ на основе изофталевой и терефталевой кислот на жизнеспособность опухолевых клеток различных линий и их клеточный цикл.

Соединения 1-5 ранее продемонстрировали наибольшую антипролиферативную активность и были отобраны для анализа клеточного цикла, чтобы понять механизм действия этих соединений. Эксперименты по анализу клеточного цикла проводили с клетками K562, обработанными 1, 5 и 10 мкМ соединений 1-5 и стандартными ингибиторами протеинкиназ лапатинибом (Lap) и сорафенибом (Sor) в течение 48 часов (Таблица 1). Для оценки распределения клеток по фазам клеточного цикла использовали метод окрашивания фиксированных образцов йодидом пропидия. Клетки фиксировали 70%-ным этанолом. Чтобы исключить связывание йодида пропидия с РНК, в раствор красителя добавляли 100 мкг/мл



РНКазы А. Клетки красили 50 мкг/мл PI в течении 40 мин в темноте и анализировали на проточном цитометре Cytomics FC500 Beckman Coulter (канал FL3 для PI) [3].

Анализ клеточного цикла показал снижение количества клеток K562 в S-фазе при обработке изофталевым аналогом **1** в концентрациях 1 мкМ и 5 мкМ с 23,27% в контроле до 17,0% и 18,14%, соответственно. При увеличении концентрации до 5 мкМ происходило увеличение количества клеток в G2/M-фазе с 45,6% до 50,09%, при этом уровень апоптоза увеличивался до 37,20% (таблица). При 10 мкМ концентрации уровень апоптоза составил 53,50%, а в зону анализа клеточного цикла попали живые клетки, не подвергшиеся влиянию соединения **1**, что видно по резкому перераспределению фаз и увеличению S-фазы.

Таблица. Распределение клеток линии K562 под действием соединений **1-5**

Проба		Апоптоз, %	Клеточный цикл, %		
			G1	S	G2/M
Контроль		14,80	31,11	23,27	45,62
1	1 мкМ	14,56	37,92	17,01	45,08
	5 мкМ	37,20	31,77	18,14	50,09
	10 мкМ	53,50	29,86	32,05	38,08
2	1 мкМ	14,28	32,65	20,41	46,95
	5 мкМ	25,10	27,58	17,25	55,16
	10 мкМ	38,02	31,21	17,71	51,08
3	1 мкМ	17,90	30,15	21,31	48,54
	5 мкМ	20,54	34,76	11,59	53,65
	10 мкМ	32,72	28,85	8,16	62,99
4	1 мкМ	14,76	34,83	18,94	46,23
	5 мкМ	17,42	32,84	17,04	50,12
	10 мкМ	19,46	27,06	25,49	47,45
5	1 мкМ	20,00	29,18	25,41	45,41
	5 мкМ	26,84	33,49	18,32	48,19
	10 мкМ	28,36	29,61	13,10	57,29
Sor	1 мкМ	22,60	36,50	7,72	55,78
	5 мкМ	44,20	33,87	30,14	35,99
	10 мкМ	78,40	не определено		
Lap	1 мкМ	14,74	34,47	13,31	52,23
	5 мкМ	28,92	31,31	13,02	55,68
	10 мкМ	66,72	37,14	9,63	53,23

В случае изомерных *орто*- и *пара*- изофталевых фторпроизводных **2** и **3**, для соединения **3** наблюдался выраженный дозозависимый эффект снижения количества клеток K562 в S-фазе с 23,3% в контроле до 11,59% (5,0 мкМ) и 8,16% (10,0 мкМ) через 48 ч. При практически неизменном количестве клеток в G1 фазе количество клеток в G2/M-фазе увеличивалось с 45,62% в контроле до 53,65% (5,0 мкМ) и 62,99% (10 мкМ) для соединения **3** и до 55,16% (5,0 мкМ) и 51,08% (10 мкМ) для изомера **2**. Для соединений **4** и **5** также наблюдалось дозозависимое увеличение уровня апоптоза и ингибирование S-фазы с увеличением количества клеток в G2/M-фазе.

В ряде случаев при концентрациях ≥ 5 мкМ наблюдалось резкое перераспределение фаз, близкое по значению к контролю, что может свидетельствовать, что клетки K562,

подвергшиеся действию вещества, ушли из зоны анализа и эффект вышел на плато. В целом, для всех соединений наблюдалась тенденция к снижению S-фазы и увеличению их в G2/M-фазе (рисунок 2).

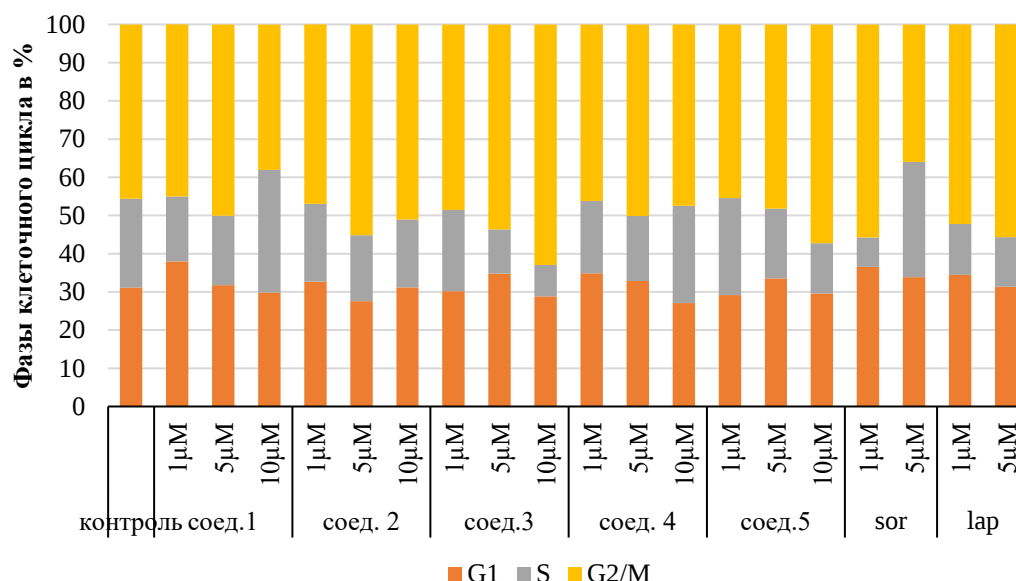


Рисунок 2. Распределение клеток K562 по фазам клеточного цикла под действием соединений 1-5

Остановка деления в G2/M-фазе – один из основных механизмов ответа на повреждение ДНК клетки, и молекулярные механизмы инициации этой остановки активно изучаются [4]. Вероятно, действие *орто*-аналога **3** может вызывать разрывы двухцепочечной ДНК и увеличивать пропорции клеток, которые задерживаются в G2/M-фазе дозозависимым образом. Одновременно линейно возрастает количество клеток, переходящих в апоптоз: с 17,90%, (1,0 мкМ) до 32,72% (10,0 мкМ). Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что часть клеток преодолевает блок в G2/M и переходит в G1-фазу, а оставшая часть подвергается апоптозу. В случае изомерного соединения **2** эта тенденция проявляется менее выражено. Следует отметить, что распределение по фазам клеточного цикла под действием соединения **3** подобно действию лапатиниба [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. / M. Capra [et al.] // Cancer research. – 2006. – Vol. 66(16). – P. 8147-8154.
2. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions / K.S. Bhullar [et al.] // Molecular Cancer. – 2018. – Vol. 17(48).
3. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry / C. Riccardi, I. Nicoletti // Nat. Protoc. – 2006. – Vol.1. – P. 1458-1461.
4. To Arrest or Not To G2-M Cell-Cycle Arrest / R.S. DiPaola // Clin. Cancer Res. – 2002. – Vol.8 (11). – P. 3311-3314.
5. The research on lapatinib in autophagy, cell cycle arrest and epithelial to mesenchymal transition via Wnt/ErK/PI3K-AKT signaling pathway in human cutaneous squamous cell carcinoma / Ming Yao [et al.] // Journal of Cancer. – 2017. – Vol. 8(2). – P. 220-226.



INFLUENCE OF POTENTIAL PROTEIN KINASE INHIBITORS, PHTHALIC ACID DERIVATIVES, ON THE VIABILITY AND CELL CYCLE OF TUMOR CELLS

Panibrat O.V., Bozhok T.S., Farina A.V., Kalinichenko E.N.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences, Belarus,
220084, Minsk, 5/2 Kuprevich Str., kalinichenko@iboch.by*

Inhibitors of protein kinases, were synthesized on the base of phthalic acid; and assay *in vitro* has revealed the most effective compounds **1-5** that have reduced the growth of tumor cells. It was found that all the studied compounds cause dose-dependent apoptosis of the K562 cell line, as well as inhibit the S phase of the cell cycle and the accumulation of cells in the G2/M phase.

ВЛИЯНИЕ МОНОКОНЬЮГАТОВ БРАССИНОСТЕРОИДОВ С САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Панибрат О.В., Савочка О.П., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, panibrat@iboch.by*

Брассиностероиды (БС) – стероидные растительные гормоны, играющие важную регулирующую роль в различных физиологических процессах, включая рост, дифференцировку, удлинение корней и стеблей растений, устойчивость к болезням, стрессоустойчивость и старение. В эту группу растительных стероидов входит более 70 соединений, повсеместно распространенных в царстве растений [1]. Из всех растительных гормонов они являются наиболее сходными по структуре со стероидными гормонами животных и, как и их аналоги у животных, БС регулируют экспрессию многочисленных генов, влияют на активность сложных метаболических путей и способствуют регуляции клеточного деления и дифференцировки. С момента открытия в 1978 году первого представителя этого класса, брассинолида, широко изучались эффекты БС и их метаболитов в растительных организмах. Что касается клеток млекопитающих, об эффектах БС на них по-прежнему известно мало. В последние годы были обнаружены некоторые потенциальные медицинские применения БС: противовирусное, противоопухолевое, ранозаживляющее, иммуномодулирующее и др. Было показано, что природные брассиностероиды и их аналоги могут ингибировать рост опухолевых клеток в микромолярной области концентраций, путем увеличения пропорции клеток в фазе G0/G1 и уменьшения доли клеток в S-фазе клеточного цикла. Причем более чувствительными к действию БС оказались гормонозависимые линии. В то же самое время природные брассиностероиды не влияли на рост нормальных клеток млекопитающих [2].

Известно, что БС влияют на баланс классических фитогормонов (ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота и этилен) [3,4]. Показан также синергизм действия брассиностероидов и других фитогормонов. В связи с этим были синтезированы моноконъюгаты брассиностероидов, эпибрассинолида и эпикастастерона, с салициловой кислотой (схема), рассматриваемой в настоящее время в качестве фитогормона. Синтезированные соединения показали значительные результаты по влиянию на стрессоустойчивость растений [5].

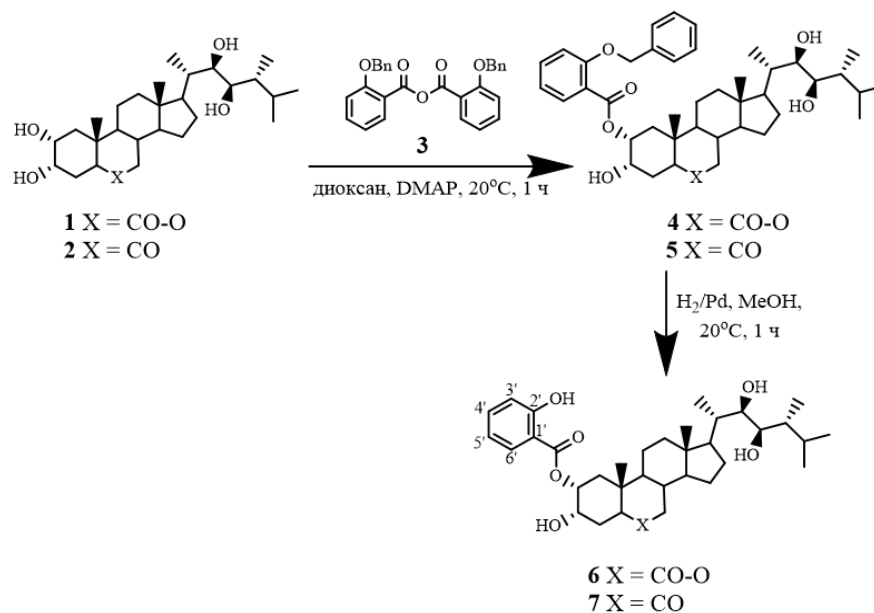


Схема. Синтез конъюгатов эпибрасинолида (**6**) и эпикастестерона (**7**) с салициловой кислотой

Целью настоящей работы явилось изучение влияния конъюгатов брасиностероидов на жизнеспособность опухолевых клеток линий A549 (карцинома легких человека), MCF-7 (карцинома молочной железы), Caco-2 (рак толстой кишки).

Клетки опухолевых линий высаживали на 96-луночный планшет в количестве 5000/лунку в 100 мкл среды DMEM+10% FBS+1% амоксициллина-стрептомицина. Через 24 ч добавляли исследуемые соединения в концентрациях 0,1, 1, 10, 50 мкМ. В контроль добавляли 0,25% ДМСО. Инкубировали клетки 72 ч при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Через указанное время в планшет добавляли флуоресцентную метку резазурин, который в митохондриях живых клеток превращается в резорурфин. Флуоресценцию измеряли при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 590 нм на планшетном спектрофлуориметре Tecan Infinite M200. Результаты представлены в таблице.

Таблица. IC₅₀ исследуемых соединений в отношении жизнеспособности опухолевых клеток

	A549	MCF-7	Caco-2
1	>50	>50	>50
2	>50	>50	>50
6	3,82 ± 0,31	3,06 ± 0,28	3,62 ± 0,25
7	4,03 ± 0,52	3,04 ± 0,49	3,40 ± 0,64
Салициловая к-та	>50	>50	>50

Как видно из таблицы, соединения **6** и **7** обладают значительной противоопухолевой активностью с IC₅₀ до 10 мкМ, практически одинаковой для всех испытанных линий клеток и у соединений между собой. Исходные соединения **1** и **2** не проявляют такого эффекта. В предыдущих работах установлено, что их IC₅₀ находится в пределах 50-100 мкМ. Салициловая кислота также не влияла на жизнеспособность опухолевых клеток.

Кроме того, нами было установлено, что соединения **6** и **7** влияют на клеточный цикл линии MCF-7, а именно ингибируют его в фазе S и вызывают накопление клеток в G0/G1 фазе (рисунок 1), тем самым останавливая удвоение ДНК и деление клеток. Таким образом, соединения **6** и **7** обладают выраженным цитостатическим действием в отношении линии MCF-7.

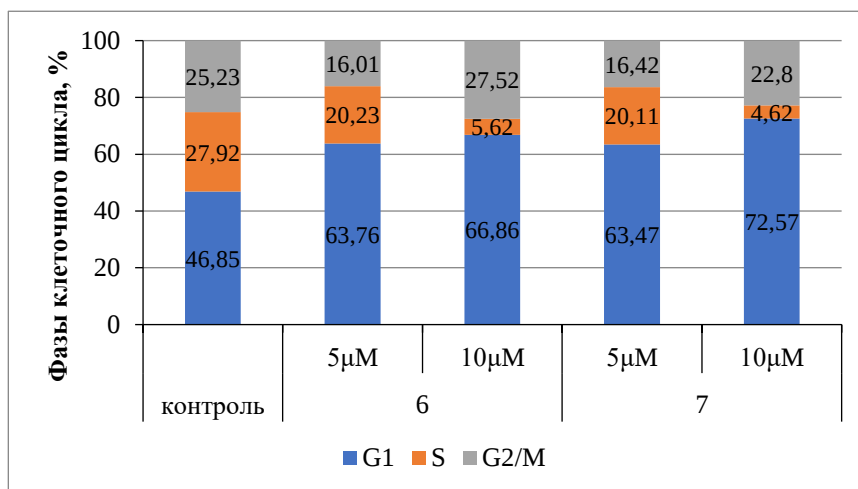


Рисунок 1. Распределение клеток линии MCF-7 по фазам клеточного цикла под действием соединений **6** и **7** в течение 24 часов.

Для определения типа клеточной гибели мы провели двойное окрашивание флуоресцентными красителями Annexin V (при апоптозе связывается с фосфотидилсерином на наружной мембране клетки) и PI (окрашивает ДНК клеток только с нарушенной целостностью мембраны, что является признаком некроза). Как видно на рисунке 2, с увеличением концентрации исследуемых соединений увеличивается количество мертвых клеток, и все они проходят через ранний (квадрант B4), а затем и поздний апоптоз (квадрант B2). Эти данные подтверждают цитостатическое действие соединений **6** и **7** в отношении клеток MCF-7.

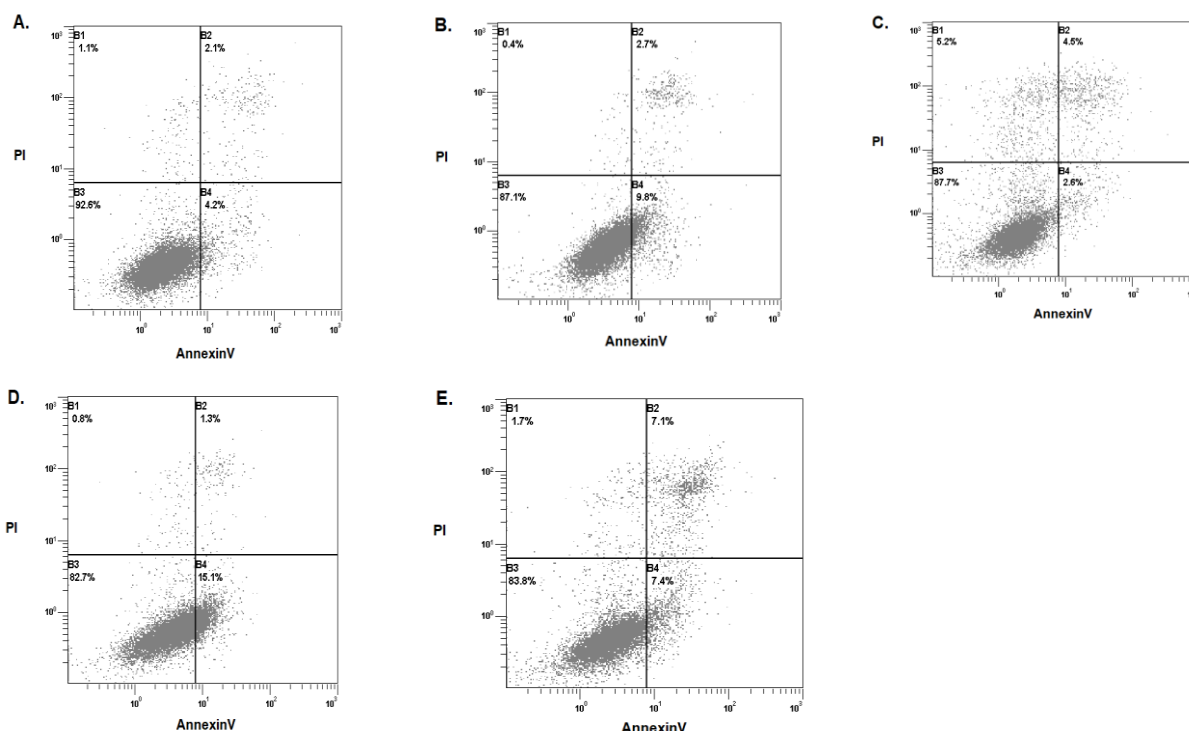


Рисунок 2. Дифференциальное окрашивание апоптотических и некротических клеток линии MCF-7 под действием исследуемых соединений в течение 24 ч: А – контроль+ ДМСО; В –соединение **6** (5 мкМ); С – соединение **6** (10 мкМ); D – соединение **7** (5 мкМ); Е – соединение **7** (10 мкМ). Квадрант B1– некроз, квадрант B2 – поздний апоптоз, квадрант B3 – живые клетки, квадрант B4 – ранний апоптоз



Для того чтобы сделать выводы о значимости салициловой кислоты, присоединенной по второму положению молекулы БС, а также других гидроксильных групп стероидной молекулы в ингибировании роста опухолевых клеток, необходимы дальнейшие исследования с использованием поликонъюгированных производных БС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brassinosteroids. A new class of plant hormones / V.A. Khripach, V.N. Zhabinskii A. de Groot. – San Diego: Academic Press, 1999.
2. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids / J. Malíková [et al.] // *Phytochemistry*. – 2008. – Vol. 69(2). – P. 418-426.
3. Индолил-3-ацетоксипроизводные брассиностероидов: синтез и росторегулирующая активность / Р.П. Литвиновская [и др.] // *Химия природных соединений*. – 2013. – Т.49, № 3. – С. 408-414.
4. CAN-Mediated oxidations for the synthesis of xanthenes and related products / M. M. Johnson [et al.] // *J. Org. Chem.* – 2010. – Vol. 75(24). – P. 8701-8704.
5. Синтез и стресс-протекторное действие на растения конъюгатов брассиностероидов с салициловой кислотой / Р.П. Литвиновская [и др.] // *Химия природных соединений*. – 2016. – Т.52, №3. – С. 394-398.

EFFECT OF MONOCONJUGATES OF BRASSINOSTEROIDS WITH SALICYLIC ACID ON THE GROWTH OF TUMOR CELLS

Panibrat O.V., Savachka A.P., Litvinovskaya R.P., Khripach V.A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084 Belarus, panibrat@iboch.by*

Monoconjugates of epibrassinolide and epicastasterone with salicylic acid were synthesized. In *in vitro* viability assay they showed high activity with $IC_{50} < 10 \mu M$. Both conjugates inhibited the S phase of the cell cycle and caused it arrest at G0/G1 phase. Using flow cytometry and AnnexinV/PI double staining, it was shown that the studied compounds induce apoptosis of tumor cells.



ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ФЛАВОНОИДОВ, ИЗОФЛАВОНОИДОВ И АЗАФЛАВОНОИДОВ

Пашковский Ф.С., Рубинов Д.Б., Лахвич Ф.А., Чукарина Т.В., Огурцова С.Э.,
Прокопович О.А

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, pashkovsky61@mail.ru*

Введение. После сердечно-сосудистых заболеваний рак является второй главной причиной смертности во всем мире и до сих пор остается серьезной проблемой здравоохранения. В поисках противоопухолевых препаратов убедительные данные лабораторных и эпидемиологических исследований, а также клинических испытаний на людях показали, что флавоноиды оказывают важное влияние на химиопрофилактику и химиотерапию рака. Идентифицировано множество механизмов лечебного и профилактического действия флавоноидов, в частности, их способность инактивировать канцерогены, подавлять рост и пролиферацию раковых клеток, индуцировать апоптоз и остановку клеточного цикла, ингибировать ангиогенез, проявлять антиоксидантное действие и устранять множественную лекарственную устойчивость [1-3]. В этой связи исследования по поиску эффективных противоопухолевых средств среди природных флавоноидов и их синтетических аналогов является актуальной проблемой современной биоорганической химии и медицины.

Целью настоящего исследования явилось изучение цитотоксичности новых аналогов флавоноидов, изофлавоноидов и азафлавоноидов, синтезированных в лаборатории химии простагландинов Института биоорганической химии НАН Беларуси, и отбор наиболее перспективных соединений для углубленных испытаний.

Материалы и методы. Цитотоксичность изучали при помощи МТТ-теста (набор CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega) на культуре клеток карциномы печени человека HepG2 и карциномы молочной железы человека MCF-7 с расчетом IC₅₀. Соединения растворяли в ДМСО до конечной концентрации 0,1, 1, 10, 100 мкМ. Пролиферативную активность клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывали по формуле: ОП опытных лунок / ОП контр. лунок × 100%, где ОП – оптическая плотность. Все эксперименты проведены в трех повторах.

Изучение противоопухолевой активности синтетических соединений ряда флавоноидов *in vivo* проводилось на половозрелых инбредных мышах-самцах линии ICR. Асцитная карцинома Эрлиха перевивалась лабораторным животным по стандартным общепринятым методикам [4]. Соединения Rub-581, Rub-611, Zel-133-2R и Zel-133-3 растворялись в 1% крахмальном геле и вводились внутривентрикулярно ежедневно однократно в течение 5 дней в дозах 250 и 350 мг/кг. Критерием оценки противоопухолевой активности служило торможение роста опухоли (ТРО, %).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Фишера–Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Проведен первичный отбор *in vitro* наиболее цитотоксических веществ среди новых синтетических соединений флавоноидного ряда.

Среди изученных соединений выявлены аналоги флавоноидов RUB-581, RUB-611, ZEL-133-2R, и ZEL-133-3 с выраженной цитотоксической активностью, проявившие достоверный цитотоксический эффект в концентрации 100 мкМ. Их структура отражена на рисунке 1. В указанной концентрации эти соединения ингибировали жизнеспособность клеток линии HepG2 на 95% и более. Максимальное ингибирование раковых клеток линии MCF-7 исследуемыми соединениями в концентрации 100 мкМ составило 70-73%. При этом выявлена

более высокая чувствительность клеток линии HepG2 к действию отобранных соединений флавоноидного ряда, по сравнению с клетками линии MCF-7 (таблица).

Цитотоксическая активность остальных соединений в исследуемой максимальной дозе 100 мкМ оказалась слабой.

Таблица. Значения IC_{50} соединений, проявивших наибольшую цитотоксическую активность в отношении раковых клеточных линий HepG2 и MCF-7 в концентрации 100 мкМ

Соединение	Жизнеспособность опухолевых клеток, % от контроля			
	HepG2	IC_{50} , мкМ	MCF-7	IC_{50} , мкМ
RUB-581	5,64±1,28	25,00	31,45±1,38	58,60
RUB-611	1,46±0,17	20,00	26,66±0,79	53,02
ZEL-133-2R	6,52±0,14	23,72	28,23±0,70	56,09
ZEL-133-3	5,05±0,18	22,38	48,99±0,72	93,84

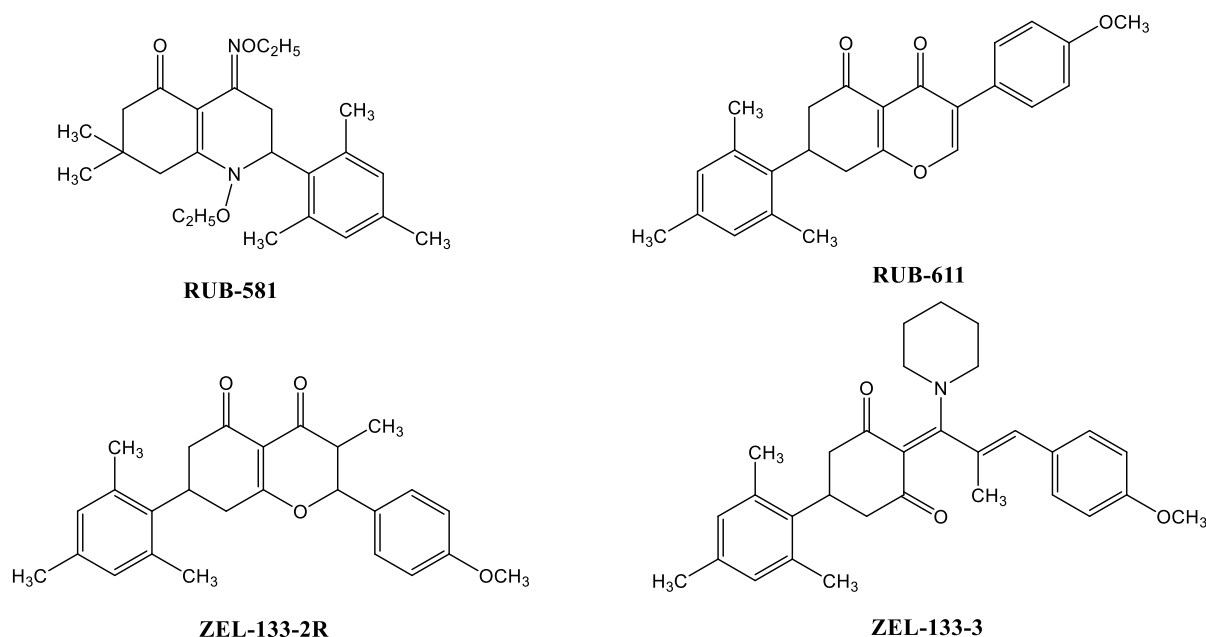


Рисунок 1. Структура синтетических соединений флавоноидного ряда, проявивших выраженную цитотоксическую активность

Отобранные соединения были использованы для изучения их противоопухолевых свойств на лабораторных животных.

При изучении противоопухолевой активности синтетических аналогов флавоноидов *in vivo* на модели перевиваемой опухоли асцитной карциномы Эрлиха мышей установлены наиболее эффективные дозы – 250 и 350 мг/кг. Среди четырех исследованных веществ RUB-581, RUB-611, ZEL-133-2R, ZEL-133-3 соединение Zel-133-2R показало наиболее высокую противоопухолевую активность с дозозависимым эффектом, постепенно возраставшим к 21 суткам наблюдения (рисунок 2). Значения ТРО, после внутрижелудочного пятикратного введения соединения Zel-133-2R в дозе 350 мг/кг составили к 1, 3, 7, 14 и 21 суткам – 32%, 35%, 53%, 61% и 72%, соответственно.

На асцитной карциноме Эрлиха соединения RUB-581, RUB-611, ZEL-133-3 проявили низкую противоопухолевую активность.

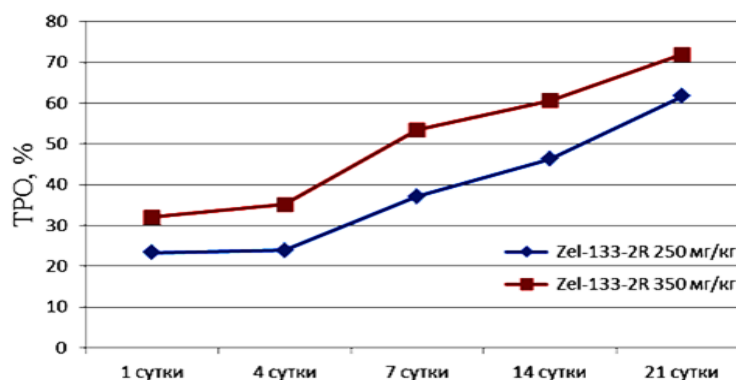


Рисунок 2. Кинетика ТРО у мышей ICR с привитой АКЭ после в/ж введения Zel-133-2R

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что применение соединений флавоноидного ряда RUB-581, RUB-611, ZEL-133-2R, ZEL-133-3 является эффективным в блокировании роста различных клеточных опухолевых культур, а на модели перевиваемой опухоли асцитной карциномы Эрлиха тормозит рост новообразования. Кроме того, необходимо провести оценку противоопухолевой активности новых соединений из класса флавоноидов в сравнительных экспериментах на других опухолевых моделях, изучить механизмы противоопухолевого действия лидерных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: A comprehensive review based on up to date knowledge / D.H. Baker // *Toxicol. Rep.* – 2022. – Vol. 9. – P. 445-469.
2. Chemical Structure, Sources and Role of Bioactive Flavonoids in Cancer Prevention: A Review / G.Dreţcanu [et al.] // *Plants.* – 2022. – Vol. 11(9). – Art. 1117.
3. Flavonoids: structure–function and mechanisms of action and opportunities for drug development (review) / S.Safe [et al.] // *Toxicol. Res.* – 2021. – Vol. 37(2). – P. 147-162.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева // – 2-е изд., перераб. и доп. – М: Медицина, 2005. – 832 с.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ СОРБЕНТОВ ПУТЕМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПО ЭДМАНУ

Пустюльга Е.С., Голубович В.П.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, pustylulga@iboch.by

Иммуноглобулины класса G (IgG) и их подклассы, могут проявлять аутоиммунную патогенность при таких заболеваниях как дилатационная кардиомиопатия, первичный синдром Шегрена, системный склероз [1,2].

В результате проведенных ранее исследований было выявлено, что соединения на основе пептидов, в структуре которых присутствуют остатки ароматических аминокислот фенилаланина, триптофана и тирозина проявляют высокую энергию связывания с молекулами Fc-фрагментов подклассов IgG [3]. Нами были разработаны варианты биоспецифических сорбентов на основе трипептидов, содержащих лиганды формулы Phe-Хaa-Tyr и обладающих высоким сродством к иммуноглобулинам класса G (IgG) и селективностью к их подклассам [4,5]. Важным аспектом в создании экспериментальных образцов сорбентов является подтверждение структуры синтезированных пептидов, служащих для них лигандами. Таким образом, целью наших исследований было проведение секвенирования пептидных соединений с целью подтверждения их первичной структуры.



В работе использовались ди- и трипептиды общей формулы Phe-Хаа-Тур, где Хаа – Asp(OBzl), Asn, Gln, Ala, Gly. Синтез пептидов осуществляли с использованием классических методов пептидного синтеза в растворе, путем последовательного присоединения трет-бутилоксикарбонил (Вос)-аминокислот к С-концевым фрагментам. С-концевой тирозин вводили в реакции в виде метилового эфира, который конденсировали с Вос-Хаа-ОН, где Хаа – Asp(OBzl), Asn, Gln, Ala, Gly соответственно. В качестве основного конденсирующего агента использовали дициклогексилкарбодиимид (DCC) с добавлением N-гидроксисбензотриазола (НОВт) в качестве противорацемической добавки. Отщепление Вос-защитной группы проводили обработкой пептидов 4,5 н раствором HCl в этилацетате в течение 40-50 мин. Практически все стадии синтеза проходили с высокими выходами, что позволило получить целевые ди- и трипептиды с суммарными выходами – 40-56%.

Первичную структуру подтверждали секвенированием по Эдману [6]. Деграция пептидов велась с использованием фенилизотиоцианата (ФИТЦ). Непосредственно секвенирование проводили в атмосфере аргона. Реакцию присоединения ФИТЦ к N-концевой α-аминогруппе пептида проводили в буфере, содержащем пиридин – ФИТЦ – dH₂O при pH 8.0 в соотношении 2.5:0.5:1. Реакцию проводили при температуре 45°C в течение 15 мин, затем сушили в вакууме. Для проведения реакции кислотного гидролиза по первой пептидной связи использовали трифторуксусную кислоту, реакцию проводили при температуре 45°C в течение 10-15 мин, затем сушили в вакууме и отбирали аликвоту для детектирования.

Масс-спектры аликвот регистрировали на масс-спектрометре Accela-LCQ Fleet (Thermo Scientific, США) в режиме ионизации распылением в электрическом поле (электроспрей, ESI) с детектированием положительных и отрицательных ионов.

Полученные результаты (Таблица) показывают, что на первом этапе расщепление трипептида происходило с образованием комплекса ФИТЦ-фенилаланин и дипептид (или тирозин в случае дипептидов), а на втором – расщепление дипептида с получением комплекса ФИТЦ-Хаа (где Хаа – Asp(OBzl), Asn, Gln, Ala, Gly соответственно) и тирозином.

Таблица. Пики молекулярных ионов, полученные в результате секвенирования пептидов

Пептид	Этап 1	Этап 2
Phe-DТур	ФИТЦ-Phe+H [283.0], Тур [181.0]	-
Trp-DТур	ФИТЦ-Trp [322.1], Тур [181.0]	-
Phe-Trp-DТур	ФИТЦ-Phe+H [283.0], Trp-DТур [283.0]	ФИТЦ-Trp [283.0], Тур [283.0]
Trp-Phe-DТур	ФИТЦ-Trp [322.1], Phe-DТур+Na [350.1]	ФИТЦ-Phe+H [283.1], Тур [181.1]
Phe-Asp(OBzl)-Тур-ОМе	ФИТЦ-Phe [282.0], Asp(OBzl)-Тур-ОМе [386.3]	ФИТЦ-Asp(OBzl) [340.3], Тур [181.1]
Phe-Gln-Тур-ОМе	ФИТЦ-Phe [283.1], Gln-Тур [309.2]	ФИТЦ-Gln+Na [288.2], Тур [181.0]
Phe-Ala-Тур-ОМе	ФИТЦ-Phe [283.1], Ala-Тур-ОМе [266.4]	ФИТЦ-Ala [229.0], Тур-ОМе [295.0]
Phe-Asn-Тур-ОМе	ФИТЦ-Phe+H [283.0], Asn-Тур [295.1]	ФИТЦ-Asn [249.2], Тур+Na [203.5]
Phe-Gly-Тур-ОМе	ФИТЦ-Phe+H [283.0], Gly-Тур [238.1]	ФИТЦ-Gly+H [193.5], Тур [181.0]

Таким образом, в результате проведенного секвенирования нами были подтверждены первичные структуры дипептидов Trp-DТур и Phe-DТур, а также трипептидов: Phe-Trp-DТур, Phe-Gln-Тур-ОМе, Phe-Ala-Тур, Phe-Asn-Тур, Trp-Phe-DТур, Phe-Gln-Тур-ОМе, Phe-Asp(OBzl)-Тур-ОМе.



ЛИТЕРАТУРА

1. Serum IgG subclasses in autoimmune diseases / H. Zhang [et al.] // Medicine. – 2015. – Vol. 1(2). – P. 387e-393.
2. Иммуносорбция в лечении дилатационной кардиомиопатии / К. И. Бардахивская [и др.] // Эфферентная и физ.-хим. терапия. – 2012. – №3. – С. 7-10.
3. Молекулярный докинг лигандов, перспективных для сорбции IgG из биологических жидкостей / Е.С. Пустюльга [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 1. – С. 88-95.
4. Тестирование экспериментальных образцов сорбентов на основе ароматических пептидов / Е.С. Пустюльга [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 465-472.
5. Оценка свойств селективности сорбентов для связывания IgG на основе трипептидных лигандов / Е. С. Пустюльга [и др.] // Доклады Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хим. наук. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 309-315.
6. Micro quantitative Edman manual sequencing / C. Zalut, W.J. Henzel, H.W. Harris // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. – 1980. – Vol. 3. – P. 11-30.

CONFIRMATION OF THE STRUCTURE OF PEPTIDE LIGANDS OF SORBENTS BY EDMAN SEQUENCING

Pustyulga Y.S., Golubovich V.P.

*Institute of Bioorganic Chemistry of the NAS of Belarus, Republic of Belarus,
220084, Minsk, st. Kuprevich, 5/2, pustyulga@iboch.by*

Edman sequencing of di- and tripeptides based on aromatic amino acids and peptides of the general formula Phe-Xaa-Tyr, where Xaa is Asp(OBzl), Asn, Gln, Ala, Gly. Mass spectroscopy data were obtained confirming the primary structure of the peptides.

АНТИГИПОКСИЧЕСКИЕ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗОХИНОНА

Рашкевич О.С., Волчек А.В.

*Белорусский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии
г. Минск, пр. Дзержинского 83, pharm@bsmu.by*

Введение. Ишемическая цереброваскулярная и коронарная патологии занимают ведущие позиции по заболеваемости во всем мире. Частота неотложных состояний, вызванных ими, и риск летальных осложнений чрезвычайно высоки, а эффективность фармакотерапии недостаточна. В целях коррекции ишемических нарушений очевидна потребность в цитопротекторах и средствах, восстанавливающих метаболические процессы. Подобным действием обладают так называемые антигипоксанта, применяемые в некоторых странах мира, однако, эффективность и универсальность имеющихся препаратов требует уточнения. Помимо ишемической патологии сердца и мозга, антигипоксические средства могут быть полезны в терапии респираторной гипоксии (например, при тяжелом течении COVID-19 инфекции) и других состояниях. Одно из перспективных направлений поиска потенциальных антигипоксантов – производные хинона, которые известны антиоксидантными свойствами и влиянием на процессы генерации энергии в клетке.

Целью настоящего исследования было изучение антигипоксической активности производных бензохинона – гидрохинона, 1,4 пара-бензохинона и тимохинона на модели гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме у мышей. Для выявления возможных механизмов антигипоксического действия, отобранных предварительным скринингом субстанций, для тимохинона и 1,4-бензохинона была определена противовоспалительная активность и эффективность на модели острого каррагенинового воспаления у мышей.



Материалы и методы. Исследование проведено в условиях экспериментальной лаборатории НИЧ БГМУ в соответствии с нормами биомедицинской этики и правилами гуманного обращения с животными, с соблюдением требований Европейской конвенции 86/609 ЕЕС. Фармакологическое действие субстанций изучали на 160 самцах мышей линии C57Bl/6 массой 28-38 г, подопытные и контрольные группы формировали методом рандомизации по массе тела в качестве ведущего признака. Испытуемые соединения вводили внутрибрюшинно однократно за 40 мин до эксперимента в объеме 0,1 мл / 10 г массы тела. Производные бензохинона назначали в дозе 5 мг/кг, составляющей по разным данным от 1/20 до 1/10 LD₅₀. Для растворения субстанций использовали изоосмолярный водный раствор хлорида натрия с добавлением 1% этанола и 1% диметилсульфоксида. Контрольным животным вводили эквивалентный объем растворителя. Производные бензохинона – гидрохинон, 1,4 пара-бензохинон и тимохинон предоставлены кафедрой радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета БГУ. В исследовании также использованы субстанция беметил (ИФОХ НАН РБ), мельдония (Grindex, Латвия), диклофенак (Берлин-Хеми АГ, Германия); ирритант лямбда-каррагенин приобретен в Sigma Aldrich.

Антигипоксические свойства производных бензохинона изучали на модели гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме [1]. Опытные группы по 8 мышей в каждой получали производные бензохинона и препарат сравнения беметил в дозе 100 мг/кг. В ходе эксперимента для оценки антигипоксического действия животных по одному помещали в стеклянные контейнеры объемом 270 см³, герметичность контролировали путем погружения в сосуд с водой. Время жизни мышей регистрировали секундомером.

Противовоспалительные свойства соединений определяли на модели острого отека, который вызывали введением 1% водного раствора λ (лямбда) каррагенина в объеме 0,03 мл, под плантарный апоневроз задней левой лапы [2]. Величину отека регистрировали в динамике ежедневно на протяжении 5 часов и спустя 24 часа по изменению толщины стопы, определяемой при помощи микрометрического устройства с точностью до 0,01 мм в условиях постоянного давления на область отека. Группы включали по 6 мышей, в качестве эталонного препарата использовали диклофенак в дозе 10 мг/кг. Противовоспалительный эффект соединений оценивали по индексам ингибирования (ИИ) различных фаз воспалительной реакции в сравнении с плацебо, которые рассчитывали по формуле: $100 \times (S_d - S_p) / S_p$, где S_d и S_p - средние значения отека лапы соответственно для групп, получавших испытуемые препараты или плацебо.

Полученные данные обрабатывали с использованием параметрического и непараметрического анализа по критериям U Уилкоксона-Манна-Уитни, Ньюмена-Келса и Дункана. Различия между группами признавали достоверными при p<0,05.

Результаты. На модели гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме 270 см³ продолжительность жизни мышей, получавших плацебо составила $19,9 \pm 1,2$ минут. Препарат сравнения беметил при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 100 мг/кг повышал устойчивость животных к гипоксии, типичные поведенческие проявления кислородного голодания у мышей появлялись значительно позже, а средняя продолжительность жизни была на 54% больше в сравнении с группой контроля ($30,5 \pm 3,6$ минут, p=0,003). Тимохинон в дозе 5 мг/кг увеличивал продолжительность жизни животных на 28% ($25,5 \pm 2,1$ минут, p=0,048). Гидрохинон дозе 5 мг/кг не влиял на показатель времени жизни животных (p = 0,970 в сравнении с плацебо). Установлено, что 1,4-бензохинон при однократном введении в дозе 5 мг/кг обладал существенным антигипоксическим эффектом на данной модели, увеличивая время жизни животных в среднем на 82% (p=0,00017), превосходя по этому показателю беметил в дозе 100 мг/кг. В другом эксперименте и аналогичных условиях проведения после 30-ти минутной экспозиции при гиперкапнической гипоксии в герметичном объеме животных, получавших 1,4-бензохинон в дозе 5 мг/кг (n=8), освобождали и определяли их общий неврологический статус. Показано, что защитное антигипоксическое действие



1,4-бензохинона на всем протяжении эксперимента не сопровождалось обнаруживаемыми неврологическими нарушениями. К моменту извлечения животных из гипоксических условий не зафиксировано поведенческих проявлений кислородного голодания, а дальнейшее наблюдение в течении 14 суток не выявило каких-либо отклонений либо гибели животных.

Таким образом, на экспериментальной модели гипоксии-гиперкапнии в герметичном объеме при однократном введении среди исследованных производных бензохинона в использованных дозах наибольшей антигипоксической активностью и эффективностью обладал 1,4-бензохинон, который статистически значимо увеличивал продолжительность жизни мышей по сравнению с плацебо на 83%. Действие тимохинона было существенно слабее, время жизни мышей в тех же условиях повышалось на 28% по отношению к контролю. Восстановленное соединение 1,4-бензохинона – гидрохинон в эквимоларной дозе при однократном применении не оказывал антигипоксического действия, а по показателю продолжительности жизни животные этой экспериментальной группы принадлежали к единой генеральной совокупности с группой плацебо с вероятностью более 97%. Установлено, что на данной экспериментальной модели антигипоксическим эффектом обладает именно окисленная форма бензохинона, различия показателей средней продолжительности жизни групп, получавших гидрохинон и 1,4-бензохинон достоверны, $p=0,000037$.

С целью определения противовоспалительной активности и эффективности 1,4-бензохинона и тимохинона, а также выявления возможной закономерности доза-противовоспалительный эффект, были проведены дополнительные исследования в расширенном диапазоне доз. Показано, что в дозах 1 и 2 мг/кг 1,4-бензохинон, испытанный на каррагениновой модели воспаления, не оказывал существенного влияния на величину экссудативного отека лапы у мышей, а в дозе 5 мг/кг препарат обладал значительным противовоспалительным действием, приближаясь к эффекту диклофенака в дозе 10 мг/кг. По выраженности действия на каждую фазу воспалительного отека в отдельности, продолжительности действия и по интегральному индексу ингибирования 1,4-бензохинон в дозе 5 мг/кг полностью соответствовал препарату сравнения. Регрессионный анализ показал стойкую зависимость доза-противовоспалительный эффект в изученном диапазоне доз, данная закономерность сохранялась на протяжении всего периода наблюдений. При высоком уровне качества аппроксимации данных (точность более 95%), рассчитанная среднеэффективная доза 1,4-бензохинона (ED_{50}) на данной модели – 4,47 мг/кг; ED_{16} и ED_{84} составили, соответственно, 2,7 мг/кг и 7,5 мг/кг. Постоянный на протяжении всего эксперимента наклон кривой логарифм дозы-эффект свидетельствует об едином механизме противовоспалительного действия препарата на все фазы каррагенинового отека. Тимохинон в дозах 5, 10 и 20 мг/кг в различные фазы острой воспалительной реакции угнетал отечную реакцию на флогоген на 18-24%, а его расчетная ED_{50} по противовоспалительному эффекту составила 56,9 мг/кг. Действие препарата заметно ослабилось на 3-й час после введения. Регрессионный анализ показал дозозависимый характер изменения величины воспалительного отека у мышей, получавших тимохинон. Гидрохинон в дозе 5 мг/кг и аналогичных условиях не оказывал влияния на каррагениновое воспаление ($p=0,81$ в сравнении с плацебо и $p=0,042$ в отношении диклофенака).

Заключение. Установлено, что 1,4-бензохинон и тимохинон в дозах 5 мг/кг обладают значительными антигипоксическим и противовоспалительным эффектами и могут представлять интерес для дальнейших исследований в качестве индивидуальных антигипоксических и противовоспалительных средств, а также возможных компонентов в составе синергичных комбинаций.



ЛИТЕРАТУРА

1. Potentiation of the hypoxic preconditioning effect by antihypoxants / V.E. Novikov, O.S. Levchenkova, E.I. Klimkina, K.N. Kulagin // Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2019. – Vol. 17. – P. 37-44.
2. Molecular mechanism of action responsible for carrageenan-induced inflammatory response / M.J. Myers, C.M. Deaver, A.J. Lewandowski // Mol. Immunol. – 2019. – № 109. – P. 38-42.

ANTIHYPOXIC AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF BENZOQUINONE DERIVATIVES

Rashkevich O.S., Vauchok A.U.

Department of Pharmacology, Belarusian State Medical University, Minsk, pharm@bsmu.by

It was found that 1,4-benzoquinone at a dose of 5 mg/kg has a significant antihypoxic effect, increasing the life time of animals by an average of 82%, surpassing the reference drug bemethyl at a dose of 100 mg/kg (54%) in this model. In our study, in the series hydroquinone – 1,4-benzoquinone, exactly oxidized form of benzoquinone had antihypoxic activity. A certain trend towards the antihypoxic effect of thymoquinone at a dose of 5 mg/kg was also established (an increase in life expectancy by 28%). In another series of experiments was shown that the protective antihypoxic effect of 1,4-benzoquinone is not accompanied by detectable neurological disorders and does not lead to delayed death of animals. Anti-inflammatory properties of 1,4-benzoquinone and thymoquinone after a single intraperitoneal injection in a model of carrageenan paw edema in mice were studied. Tested quinone derivatives have a significant dose-dependent anti-inflammatory effect. The average effective dose of 1,4-benzoquinone calculated by the method of regression analysis in this model is 4.47 mg/kg; the average effective dose of thymoquinone is 57 mg/kg. Thymoquinone and 1,4-benzoquinone may be of interest for further research as individual antihypoxic and anti-inflammatory agents, as well as possible components in synergetic antihypoxic and anti-inflammatory combinations.



ENRICHMENT OF SUPERCOILED CIRCULAR DNA IN PLASMID DNA PREPARATIONS FOR GENE-THERAPY APPLICATION BY LIQUID-LIQUID EXTRACTION

Rudovich M.I., Sachenko A.B., Shchur V.V., Usanov S.A., Yantsevich A.V.
*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, yantsevich@iboch.by*

Gene therapy is based on the delivery of DNA molecules into targeted cells. Transfer of DNA could be accomplished by two methods: by recombinant viral vectors and naked DNA.

Concerning efficacy of viral methods, naked DNA injection is characterized by low levels of transfection and target gene expression. Non-viral transfection has certain advantages: low immunogenicity of naked DNA and simple large-scale production [1]. Recent progress in delivery techniques allowed to achieve efficiencies compared to viral vectors. Most naked DNA approaches are based on plasmid DNA (pDNA), small circular molecule that can replicate independently in bacterial cell.

One application of pDNA in gene therapy is DNA vaccine. A DNA vaccine, usually referred as the third-generation vaccines, is a specific DNA sequence, that could induce immune response to pathogens and cancer cells. The basic principle behind modern DNA vaccine involves plasmid DNA, that contain pathogen coding protein gene and regulatory sequences that force its expressing after admission. The field of DNA vaccination is rapidly developing.

pDNA could be observed in five conformations, effectively resolved by agarose electrophoresis: nicked open-circular, relaxed circular, linear, supercoiled (sc) and supercoiled denatured. It is of common opinion that the linear and open-circular forms of pDNA are less-effective than the supercoiled isoform in expression after transfection/injection and therefore in inducing immune responses but the information is contradictory [2]. Some studies confirm that cell transfection is better with supercoiled than the relaxed open-circular isoform. Other publications indicate that the limit of supercoiled pDNA have to be more than 70% for potent *in vivo* responses to DNA vaccine. However, one of the arguments is clear from our experience: supercoiled pDNA is more stable to physical, biological and chemical factors.

There are many techniques of pDNA isolation, differing in cost, complexity and quality of the final product. In spite of toxicity and inconvenience phenol extraction is still widely used for preparation of some biomolecules, such as DNA, RNA. Phenol extraction is very effective approach during RNA isolation [3,4].

In the current work we carefully investigated pH-dependent distribution of different forms of pDNA during phenol extraction, and revealed conditions that allow simple isolation of pharmacologically active supercoiled pDNA from other forms, that considered by us as enzymatically or physically corrupted. Currently used methods of isolation of sc-pDNA mainly based on chromatographic purification.

In our study we used pcDNA3.1 as a model plasmid. Plasmid was transformed to NEB-DH5a competent *E. coli* cells. Crude plasmid isolation was performed by alkaline lysis with subsequent iPrOH precipitation and dissolution in water to final concentration of 300 µg/ml. Phenol and phenol-chlorophorm (1:1) was equilibration with 0.2 M sodium-acetate buffer of stated pH. 300 µl of plasmid solution was vortexed with 300 µl of corresponding organic phase for 30 min. Phases were separated by centrifugation, and 100 µl of upper phase was precipitated by iPrOH, washed by 70% EtOH, and dissolved in deionized water. 3 µl of resulting solution was loaded on agarose gel (Fig. 1).

Based on our study in the current work we demonstrated, that it is possible to separate sc-pDNA from other forms (relaxed/nicked, linear, denatured). Moreover, this strategy has useful additional effect: elimination of host genomic DNA.

The data obtained allows to propose effective, low cost and simple small-scale (up to 5 mg) pharmaceutical quality sc-pDNA isolation method for research purposes.

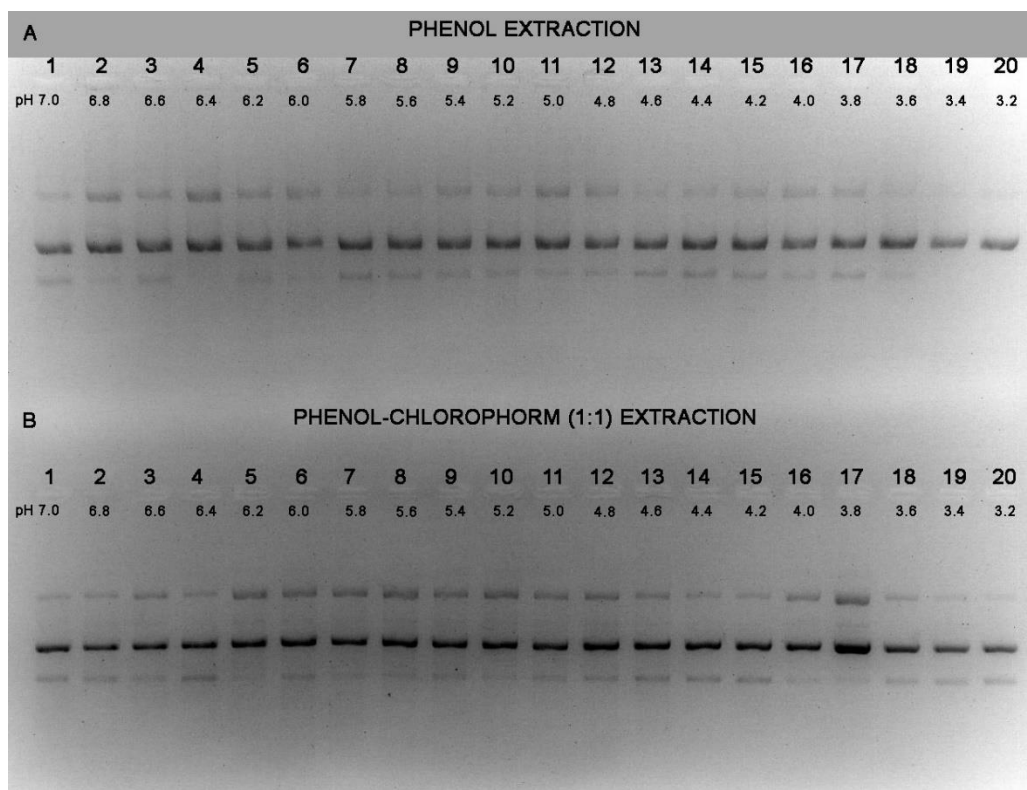


Figure 1. A. Agarose gel electrophoresis of upper (water) phase during phenol extraction. Lane 1 – Initial sample; lane 2–20 – pH gradient from 7.0 to 3.4 with step 0.2.
B. Agarose gel electrophoresis of upper (water) phase during phenol-chlorophorm extraction. Lane 1 – Initial sample; lane 2–20 – pH gradient from 7.0 to 3.4 with step 0.2.

REFERENCES

1. Large-scale plasmid DNA processing: evidence that cell harvesting and storage methods affect yield of supercoiled plasmid DNA / S. Kong [et al.] // Biotechnology and applied biochemistry. – 2008. – Vol. 51. – P. 43-51.
2. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats / L. Cupillard [et al.] // Vaccine. – 2005. – Vol. 23. – P. 1910-1916.
3. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Analytical biochemistry. – 1987. – Vol. 162. – P. 156-159.
4. Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination / P.D. Siebert, A. Chenchik // Nucleic acids research. – 1993. – Vol. 21. – P. 2019-2020.

ОЧИСТКА СУПЕРСКРУЧЕННЫХ ФОРМ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ГЕНОТЕРАПИИ

Рудович М.И., Саченко А.Б., Щур В.В., Усанов С.А., Янцевич А.В.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, yantsevich@iboch.by

Предложен эффективный и недорогой метод очистки небольших количеств суперскрученной формы плазмидной ДНК (до 5 мг) методом жидкость-жидкостной экстракции. Метод позволяет удалять из препаратов плазмидной ДНК остатки геномной ДНК бактерий, а также линейную и релаксированную формы. Качество полученной плазмидной



ДНК удовлетворяет требованиям безопасности, предъявляемым для генотерапевтических препаратов на основе плазмидных ДНК.

ОЦЕНКА ХРОНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

Саванец О.Н., Кравченко Е.В., Ольгомец Л.М., Бородина К.В., Голубович В.П.,
Зильберман Р.Д.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, oksana.savanez.96@mail.ru*

Введение. Подавляющее большинство значимых для организма физиологических и метаболических процессов контролируются циркадными ритмами [1]. Стресс влияет практически на все органы и системы живого организма. Следствием дезорганизации ритмической активности (нарушений цикла «сон-бодрствование») является стрессовая реакция, приводящая к психическим, неврологическим и метаболическим расстройствам [1]. Следует ожидать, что воздействие физических стрессирующих факторов, независимых от нарушений сна, будет агgravировать развивающийся десинхроноз. Соответствующая патология часто наблюдается у пациентов с хроническими болями, беспокоящими их в ночные часы, когда трудности засыпания усугубляются болевым синдромом. Схожие нарушения развиваются при необходимости выполнять задачи в условиях ночной работы, сочетающейся с ограниченной подвижностью и некомфортными условиями окружающей среды. Для коррекции подобных нарушений могут быть использованы соединения олигопептидной природы. По ранее полученным нами данным, дипептид Pro-Gly устранял 24-минутные ультрадианные ритмы двигательной активности мышей в условиях слабого стресса «новизны» [2]. Pro-Gly, N-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH₂ и N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ корректировали короткопериодные ритмы на фоне «острого» стресса (принудительное плавание) [3,4].

Цель работы – оценить хронофармакологическую активность пролинсодержащих олигопептидов в условиях модельной патологии в экспериментах на лабораторных крысах.

Материалы и методы. Экспериментальная работа проводилась с использованием 127 половозрелых крыс-самцов (111 – аутбредные Wistar, 16 – инбредные SHR) с массой тела 200-380 г, выращенных в питомнике Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Оценивали влияние пролинсодержащих олигопептидов на ультрадианные и циркадные ритмы горизонтальной (ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности (ДА) в условиях стрессирующего (-их) воздействия (-ий) и/или нарушений цикла «сон-бодрствование».

Нарушения цикла «сон-бодрствование» индуцировали 24-часовой депривацией парадоксальной фазы сна (ДПФС) по D. Jouvet и соавт.: животных помещали на 24 ч в бассейн, наполненный водой, оснащенный площадками диаметром 6 см, на которых крысы могли свободно сидеть. Площадки выступали на 1,5-2 см над поверхностью воды. При наступлении сна мышцы животного расслаблялись, и крыса падала в воду. В качестве агgravирующих факторов использовали 2 вида стрессовых воздействий, применявшихся изолированно или совместно. Первое из них осуществляли посредством нанесения электроболевого стимулов в оперантных камерах (5 сеансов по 50 ударов током). Второй вид стрессового воздействия включал сочетание группы факторов (переохлаждение, иммобилизация, отсутствие пищи и коммуникации) и моделировался 24-часовым помещением животного в бассейн, наполненный водой, с площадками вышеописанной конструкции. В случае наполнения бассейна на небольшую глубину животное могло спать, опершись о стенку, подвергаясь комплексу вышеперечисленных стрессоров без ДПФС. После указанных стрессирующих процедур (см. таблицу) животных на 24 ч помещали поодиночке в камеры многоканального актометра



«Универсал 22-32» (РБ), оснащённые кормушкой, поилкой, подстилкой. Эксперименты проводили летом (май-август) в режиме 12 ч «день»/12 ч «ночь» (освещение: 6 ламп дневного света SL 36/26-735 (серия А); лампы подсвета Я – 100 Л -12 В ($\lambda=670-680$ нм) (серии Б и В)).

В серии А и Б включали крыс Wistar, в серию В – особей SHR. Серия А. Животные групп КГ-А1 и ОГ-А1 не подвергались ДПФС и стрессирующим воздействиям. Крысы контрольной группы КГ-А1 ($n=7$) получали растворитель (здесь и далее – дистиллированную воду, ДВ) интраназально (и/н), животным основной группы ОГ-А1 ($n=7$) назначали N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ в дозе 1,0 мкг/кг с использованием того же способа введения. Крыс КГ-А2 и ОГ-А2 подвергали вышеописанному комплексному стрессирующему воздействию (переохлаждение и др.). Животным этих групп ($n=7$ в каждой) вводили растворитель и тот же тетрапептид вышеуказанным способом. Крыс групп КГ-А3 – КГ-А5 и ОГ-А3 – ОГ-А5 тестировали после сочетания ДПФС и комплексного стрессирующего воздействия. Особи групп КГ-А3 ($n=7$) и ОГ-А3 ($n=8$) получали ДВ и N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ соответственно после 24-часовой ДПФС и стресса. Животным КГ-А4 ($n=5$) в те же сроки вводили ДВ внутривентрально (в/б), а крысам основной группы ОГ-А4 ($n=5$) – дипептид Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б). Введение соединений животным подгрупп 1-4 осуществлялось за 60 мин до начала актометрии. Крысы группы КГ-А5 ($n=5$) получали растворитель (в/б), а животные группы ОГ-А5 ($n=5$) – дипептид Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б) перед ДПФС и стрессом, т.е. более чем за сутки до актометрии.

Серии Б и В. Актограммы крыс Wistar и SHR серий Б и В записывали дважды. Вначале регистрировали подвижность интактных особей, не получавших тестируемые образцы, объединённых в группы КГ-Б ($n=48$) и КГ-В ($n=16$) соответственно. Спустя 15-20 суток осуществляли повторную регистрацию ГДА и ВДА. Животным всех подгрупп указанных серий применяли электроболевое аверсивное воздействие – 4 ежедневных сеанса (50 ударов током в течение часа), а затем – 24-часовую ДПФС (в сочетании с комплексом стрессоров), непосредственно после которой проводили 5-й сеанс с электролевой стимуляцией той же продолжительности. Актометрию осуществляли спустя 20 мин по окончании сеанса 5. Грызуны серий Б и В получали образцы 6-кратно: 5 введений перед процедурой электролевой стимуляции, 6 введение – перед началом 24-часовой ДПФС.

Животные КГ-Б1 ($n=10$) и КГ-В1 ($n=7$) получали ДВ в/б, крысам ОГ-Б1 ($n=8$) и ОГ-В1 ($n=7$) вводили дипептид Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б). Крысам группы КГ-Б2 ($n=6$) назначали и/н ДВ, лабораторные грызуны группы ОГ-Б2 ($n=8$) и ОГ-Б3 ($n=8$) получали олигопептиды N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH₂ и N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ соответственно в дозе 1,0 мкг/кг и/н. Особям группы ОГ-Б4 ($n=8$) применяли мепантин в дозе 5,0 мг/кг (в/б).

Анализ хронограмм ГДА и ВДА для ультрадианных и циркадных ритмов проводился за первые 119 мин и 24 ч актометрии соответственно; посредством компьютерной программы методом косинор-анализа определяли амплитуду ритма (А) [1-3]. Анализировали гармоники с периодами 24 мин для ультрадианных и 24 ч – для циркадных ритмов ДА.

Результаты. Ультрадианные ритмы ГДА и ВДА у особей Wistar и SHR, в отсутствие и на фоне ДПФС и стрессирующих воздействий были статистически значимыми в контроле (за исключением КГ-Б2 – ГДА; КГ-А3 и КГ-Б2 – ВДА). Достоверные 24-минутные ритмы ВДА (но не ГДА) восстанавливались всеми пролинсодержащими олигопептидами (N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH₂, N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂, Pro-Gly), ультрадианные ритмы ГДА – мепантином (ОГ-Б4). Дипептид Pro-Gly препятствовал формированию 24-минутных ритмов ГДА (ОГ-А4 и ОГ-А5) и ВДА (ОГ-В1). У крыс Wistar тетрапептид N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (ОГ-А3), а у SHR – дипептид Pro-Gly (ОГ-В1) вызывали приближение А ГДА ($p<0,05$) и А ВДА к “норме” (уровень интактного контроля КГ-А1 и КГ-В).

Статистически значимые циркадные ритмы ГДА и ВДА отмечены у интактного контроля только при наличии большой выборки (КГ-Б, но не КГ-А1), то же относится и к ОГ-А1.

У крыс Wistar комплекс стрессирующих факторов вызывал формирование значимых 24-часовых ритмов ВДА (КГ-А2), тогда как сочетание ДПФС и комплекса стрессоров – биоритмов ВДА (КГ-А4, КГ-А5, КГ-Б2), ГДА (КГ-А5, КГ-В1) или ГДА и ВДА одновременно



(КГ-А3); это может расцениваться как процесс адаптации организма грызунов к изменяющимся условиям среды. В отсутствие опыта ознакомления с актометром (серия А) уровень А повышался, при наличии соответствующего опыта (серия Б) – снижался. Ритмическая организация усиливалась у крыс на фоне введения N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (ОГ-А2; А возрастала) и Pro-Gly (ОГ-Б1; А повышалась). Мемантин оказывал негативное влияние на 24-часовые ритмы - резко снижал А ВДА ($p<0,05$) и ГДА.

Таблица. Влияние пролинсодержащих олигопептидов на ультрадианные и циркадные ритмы ГДА и ВДА крыс Wistar и SHR на фоне ДПФС и стрессирующих воздействий

Группа/число животных	Условия эксперимента			Результаты							
	Стресс		ДПФС	Ультраничные (24 мин)				Циркадные (24 ч)			
	Электро-болевой шок	Комплекс стрессоров		ГДА		ВДА		ГДА		ВДА	
				А, %	р	А, %	р	А, %	р	А, %	р
Серия А (Wistar)											
КГ-А1 (n=7)	-	-	-	100	p<0,05	100	p<0,05	100	-	100	-
ОГ-А1 (n=7)	-	-	-	67,5	p<0,05	93	p<0,05	92,6	-	130,8	-
КГ-А2 (n=7)	-	+	-	67,2	p<0,05	79,8	p<0,05	137	-	138,5	p<0,05
ОГ-А2 (n=7)	-	+	-	62,2	p<0,05	76,5	p<0,05	155,6	p<0,05	173,1	p<0,05
КГ-А3 (n=7)	-	+	+	78,9	p<0,05	54,3	-	170,4	p<0,05	203,8	p<0,05
ОГ-А3 (n=8)	-	+	+	94,5	p<0,05	70,2	p<0,05	159,3	p<0,05	188,5	p<0,05
КГ-А4 (n=5)	-	+	+	54,1	p<0,05	77,8	p<0,05	285,2	-	211,5	p<0,05
ОГ-А4 (n=5)	-	+	+	37,3	-	44	p<0,05	196,3	-	184,6	-
КГ-А5 (n=5)	-	+	+	55,2	p<0,05	83,1	p<0,05	129,6	p<0,05	123,1	p<0,05
ОГ-А5 (n=5)	-	+	+	90	-	128,8	p<0,05	229,6	p<0,05	203,8	p<0,05
Серия Б (Wistar)											
КГ-Б (n=48)	-	-	-	100	p<0,05	100	p<0,05	100	p<0,05	100	p<0,05
КГ-Б1 (n=10)	+	+	+	262,6	p<0,05	305	p<0,05	90,5	p<0,05	97,1	-
ОГ-Б1(n=8)	+	+	+	230,3	p<0,05	299,4	p<0,05	127	p<0,05	129,4	p<0,05
КГ-Б2 (n=6)	+	+	+	64,1	-	93,8	-	57,1	-	63,2	p<0,05
ОГ-Б2 (n=8)	+	+	+	116,4	-	182,6	p<0,05	77,8	-	66,2	p<0,05
ОГ-Б3 (n=8)	+	+	+	94,9	-	103,7	p<0,05	149,2	-	63,2	p<0,05
ОГ-Б4 (n=8)	+	+	+	136,4	p<0,05	141,6	p<0,05	25,4	-	50	p<0,05
Серия В (SHR)											
КГ-В (n=16)	-	-	-	100	p<0,05	100	p<0,05	не регистрировали			
КГ-В1 (n=7)	+	+	+	179,1	p<0,05	190,8	p<0,05	100	p<0,05	100	p<0,05
ОГ-В1 (n=7)	+	+	+	114,5	p<0,05	93,9	-	135	p<0,05	146	p<0,05

Заключение. При сочетании ДПФС с комплексом стрессоров N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH₂ (ОГ-Б2), N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (ОГ-А3, ОГ-Б3), Pro-Gly и мемантин способствовали восстановлению достоверных 24-минутных ритмов ВДА. У крыс SHR Pro-Gly (ОГ-Б1) на фоне болевого стресса и ДПФС приближал значения амплитуды ГДА и ВДА к «норме», а также нивелировал короткопериодные ритмы ВДА с 24-минутной гармоникой. N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (ОГ-А2) на фоне комплекса стрессоров (переохлаждение и др.) нормализовал циркадные ритмы ГДА, а Pro-Gly (ОГ-Б1) в случае одновременного применения ДПФС с обоими стрессирующими воздействиями – циркадные ритмы ВДА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stress and Circadian Rhythms / М.-J. Sun [et al.] // Oxidative Stress. –. 2021. – Р. 193-212.
2. Регуляция ультрадианных ритмов двигательной активности олигопептидами, структурно родственными окситоцину / Е.В.Кравченко, Н.А.Бизунок, Б.В. Дубовик / Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т.65, № 2. – С. 191-198.



3. Pro-Gly модифицирует ритмы локомоторной активности крыс Wistar, подвергшихся неизбежному стрессу / О.Н. Саванец, Е.В. Кравченко // Новости медико-биологических наук. – 2022. – Т. 22, № 2. – С. 11-16.
4. Влияние синтетических аналогов фрагмента аргинин-вазопрессина на ультрадианные ритмы активности крыс / О.Н. Саванец [и др.] // Молодежь в науке – 2021: тез. докл. XVIII Междунар. науч. конф. молодых ученых (Минск, 27–30 сентября 2021 г.). В 2 ч. Ч. 2. Мед., физ.-мат., физ.-тех. науки, химии и науки о Земле / Нац. акад. наук Беларуси, Совет молодых ученых ; редкол.: В. Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2021. – С 70-72.

**ASSESSMENT OF CHRONOPHARMACOLOGICAL ACTIVITY
OF PROLINE-CONTAINING OLIGOPEPTIDES UNDER MODEL CONDITIONS
PATHOLOGIES IN LABORATORY RATS**

Savanets O.N., Kravchenko E.V., Olgomets L.M., Borodina K.V., Golubovich V.P.,
Zilberman R.D.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences, Belarus, 220084,
Minsk, 5/2 Kuprevich Str., oksana.savanez.96@mail.ru*

Most of the physiological and metabolic processes that are important for the body are controlled by circadian rhythms. Stress affects almost all organs and systems of a living organism. The result of the disorganization of rhythmic activity (disturbances in the sleep-wake cycle) is a stress reaction, leading to mental, neurological and metabolic disorders. When combined with paradoxical sleep phase deprivation with a complex of stressors N-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH₂, N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂, Pro-Gly and memantine contributed to the restoration of significant 24-minute vertical activity rhythms. In rats SHR Pro-Gly on the background of pain stress and paradoxical sleep phase deprivation brought the values of the amplitude of horizontal activity and vertical activity closer to the «norm», and also leveled the short-period vertical activity rhythms with a 24-minute harmonic. N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ against the background of a complex of stressors (hypothermia, etc.) normalized the circadian rhythms of the horizontal activity. Pro-Gly, in the case of simultaneous use of paradoxical sleep phase deprivation with both stressful effects, normalized the circadian rhythms of the vertical activity.

**РЕГИОСПЕЦИФИЧНЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ
АНОМАЛЬНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ ПУРИНОВОГО РЯДА**

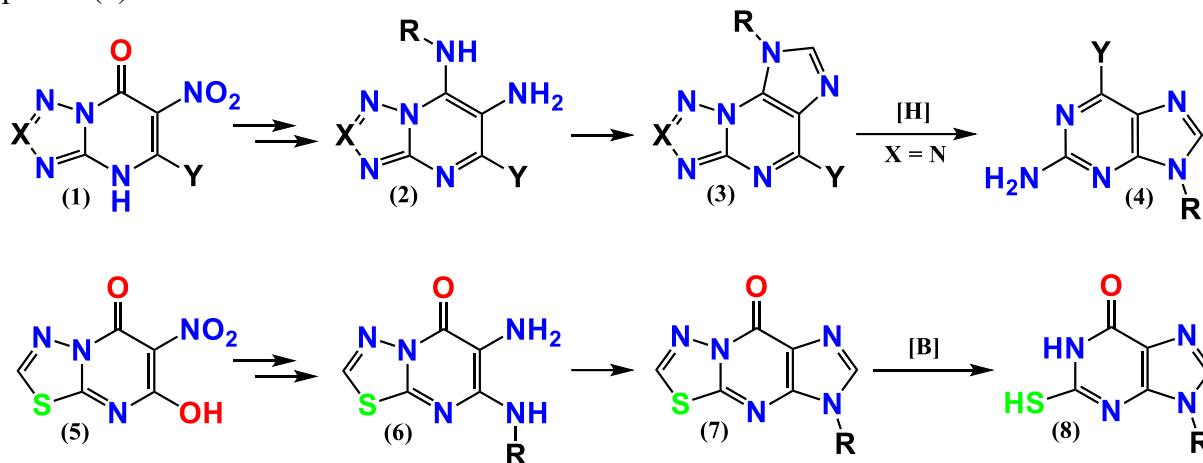
Саватеев К.В., Федотов В.В., Уломский Е.Н., Русинов В.Л.

*Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, i-krafttt@yandex.ru*

Аномальные нуклеозиды пуринового ряда и родственные им структуры занимают особое место в медицинской химии, благодаря близкому родству с природными пуринами, входящими в ключевые энергетические и информационные внутриклеточные процессы. Благодаря такому структурному подобию аномальные нуклеозиды встраиваются в ключевые процессы жизнедеятельности вирусов или опухолевых клеток вместо природных пуринов, приводя, таким образом, к деградации патогена. Одной из основных групп аномальных нуклеозидов, применяемых в качестве лекарственных средств, являются N⁹-алкилпурины, синтез которых основан на введении псевдо-рибозидного остатка в положение N⁹ с помощью реакции алкилирования [1]. При этом, вне зависимости от метода ведения данного процесса, всегда образуется и N⁷-изомер, который необходимо отделять от целевого N⁹-алкилпурина, что является существенным недостатком данного подхода [2].

Нами была предложена региоспецифичная схема синтеза аномальных нуклеозидов ряда N⁹-алкилпуринов, в основе которой положена деструктивная методология. Исходя из

доступных нитротетразоло- (1) и нитротиадiazоло-пиримидинов (5), возможен синтез соответствующих вицинальных диаминопроизводных (2) и (6). Аннелирование имидазольного цикла в подобных структурах приводит к трициклическим азолопуринам (3) и (7). При этом в основных условиях наблюдается деструкция тиадiazольного фрагмента с образованием тиоксантинов (8), а восстановление тетразольного цикла ведет к образованию пуринов (4).



Таким региоспецифичным способом нами были получены соответствующие N9-алкилпурины (4) и новый класс аномальных нуклеозидов – N9-алкилтиоксантины (8) [3]. Стоит отметить, что данная методология не имеет аналогов в научной литературе, а синтезированные гетероциклы представляют собой соединения с потенциальной противовирусной и противоопухолевой активностью.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Государственный контракт № FEUZ-2020-0058 (H687/42Б.223/20).

ЛИТЕРАТУРА

1. The Sugar Ring of the Nucleoside Is Required for Productive Substrate Positioning in the Active Site of Human Deoxycytidine Kinase (dCK): Implications for the Development of dCK-Activated Acyclic Guanine Analogues / Hazra S., Konrad M., Lavie A. // Journal of Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 53(15). – P. 5792.
2. Transglycosylation Reactions of Purine Nucleosides. A Review / Boryski J. // Nucleosides and Nucleotides. – 1996. – Vol. 15(1-3). – P. 771.
3. Regiospecific route to N9-alkylated thioxanthines / Savateev K.V. [et al.]. // New Journal of Chemistry. – 2022. – Vol. 46. – P. 17145.

REGIOSPECIFIC APPROACH FOR THE SYNTHESIS OF ABNORMAL PURINE NUCLEOSIDES

Savateev K.V., Fedotov V.V., Ulomsky E.N., Rusinov V.L.

Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Eltsin, Mira st. 19,
Yekaterinburg, 620002, Russian Federation, i-krafttt@yandex.ru

A regiospecific route to N9-alkylated purines as novel acyclic nucleoside analogues has been developed. This approach is based on a cleavage methodology involving the construction of a target heterocyclic scaffold based on a 1,3,4-2H-thiadiazole or tetrazole moiety, which is subsequently cleaved under basic or reductive conditions. The procedure is performed from readily available precursors, under mild scalable conditions excluding column chromatography purification, and the target purines were prepared with excellent yields.

СОДЕРЖАНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ В *LASER TRILOBUM*Савчук А.Л.¹, Литвиновская Р.П.¹, Драшар П.², Хрипач В.А.¹¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, alina_kyrtikova@mail.ru²Высшая химико-технологическая школа, Техника 5, 166 28 Прага 6, Прага, Чешская Республика, drasar@scitech.cz

Laser trilobum (Лазурник трехлопастный) представляет собой многолетнее травянистое растение, наделенное ценными целебными свойствами [1]. Плоды (семена) данного растения рекомендовано использовать при респираторных инфекциях, болезнях кишечника, для стимуляции центральной нервной системы. Известно, что лазурник является источником сесквитерпеновых лактонов (лазеролида, изолазеролида, лазолида, трилоболида, изотрилоболида), причем наибольшее содержание трилоболида отмечено в корнях *L. Trilobum* [2]. В литературе имеются данные по изучению экстрактов *Laser trilobum* на антиоксидантную, антигемолитическую [3], антимикробную [4] активность.

Целью данной работы является изучение содержания брассиностероидов в различных органах *L. trilobum*, а именно в листьях, стеблях, корнях и семенах. Лиофилизированные растительные образцы были предоставлены Высшей химико-технологической школой (Чехия, г. Прага), где проводятся работы по изучению данного вида растения и его активных ингредиентов. Количественную оценку проводили методом двухстадийного иммуноферментного анализа с использованием пяти иммуноферментных тест-систем для следующих групп брассиностероидов: 24-эпи-, 24S-метил-, 28-гомо-, В-лактон- и 6-кетобрассиностероидов. Предварительно лиофилизированные растительные образцы гомогенизировали в буферном растворе (0,05 М Трис, pH 7,4), для дальнейшей экстракции гомогенаты выдержали в течение 24 ч при -20°C. Затем образцы центрифугировали и полученный супернатант анализировали методом иммуноферментного анализа [5]. Полученные данные представлены в Таблице.

Таблица.

№	Детектируемая группа брассиностероидов	Содержание БС, нг/г лиоф.веса в соответствующей части растения <i>Laser trilobum</i>			
		Листья	Стебли	Корни	Семена
1	24-эпиБС	1,71±0,188	3,73±0,754	3,00±0,443	5,00±0,014
2	24S-метилБС	28,7±1,36	7,70±1,36	1,75±0,158	6,29±0,213
3	28-гомоБС	8,44±0,585	4,23±0,694	1,32±0,063	7,75±0,117
4	В-лактонБС	4,25±0,969	11,0±1,60	6,27±0,345	110,2±17,0
5	6-кетоБС	49,3±11,0	6,52±1,16	1,84±0,101	23,4±5,15

24-эпиБС – 24-эпибрассиностероиды (24-эпибрасинолид и 24-эпикастастерон)

24S-метилБС – 24S-метилбрассиностероиды (брасинолид и кастастерон)

28-гомоБС – 28-гомобрассиностероиды (28-гомобрасинолид и 28-гомокастастерон)

В-лактон-БС – В-лактон-брассиностероиды (24-эпибрасинолид, брасинолид, 28-гомобрасинолид, 28-норбрасинолид)

6-кетоБС – 6-кетобрассиностероидов (24-эпикастастерон, кастастерон, 28-гомокастастерон, 28-норкастастерон)

Результаты исследования показали, что наибольшее содержание брассинстероидных лактонов (В-лактон-БС) было обнаружено в семенах *L. Trilobum* (110 нг/г лиоф.веса), а их содержание в остальных частях растения составило в пределах 4-11 нг/г лиоф.веса. В листьях отмечено наибольшее содержание 6-кетоБС (49 нг/г лиоф.веса), в семенах – в 2 раза меньше (23 нг/г лиоф.веса), а в стеблях и корнях содержание сопоставимо с количеством В-лактон-БС. Содержание 24-эпиБС, 24S-метилБС и 28-гомоБС во всех изученных частях растения



варьировалось от 1 до 8 нг/г лиоф. веса, за исключением содержания 24S-метилБС в листьях, которое составило 29 нг/г лиоф.веса.

Таким образом, возможно, что ценные целебные свойства данного растения обусловлены не только содержанием сесквитерпеновых лактонов, но и наличием brassinosterоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. К химическому изучению *Laser trilobum* (L.) BORKH. флоры Айзербайджана / Азизов Ю.М. [и др.] // Химия растительного сырья. – 2011. – № 4. – P. 169-172.
2. Trilobolide and related sesquiterpene lactones from *Laser trilobum* possessing immunobiological properties / Harmatha J. [et al.] // Fitoterapia. – 2013. – Vol. 89. – P. 157-166.
3. Antioxidant and Antihaemolytic Activities of the Leaves of *Kefe cumin* (*Laser trilobum* L) Umbelliferae / Ebrahimzadeh, M.A. [et al.] // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. – 2010. – Vol. 9(5). – P. 441-449.
4. Chemical composition and antimicrobial activity of the extracts of Kefe cumin (*Laser trilobum* L.) fruits from different regions / Parlattan Ah. [et al.] // International Journal of Food Sciences and Nutrition. – 2009. – Vol. 60(7). – P. 606-617.
5. A new ELISA for quantification of brassinosteroids in plants / Pradko A.G. [et al.] // Steroids – 2015. – Vol. 97. – P. 78-86.

CONTENT OF BRASSINOSTEROIDS IN *LASER TRILOBUM*

Sauchuk A.L.¹, Litvinovskaya R.P.¹, Drašar P.², Khripach V.A.¹

¹Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Kuprevich st., 5/2, 220084, Minsk, Belarus, alina_kyrtikova@mail.ru

²Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic, drasar@scitech.cz

The endogenous content of brassinosteroids in various parts of the *Laser trilobum* was studied by enzyme immunoassay. The highest content of brassinosteroids was noted in the seeds, the lowest did in the roots and stems. Probably valuable healing properties of the *Laser trilobum* are caused not only by the content of sesquiterpene lactones, but also by the presence of brassinosteroids.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ И ФОТОЛОНА

Самцов М.П.¹, Тарасов Д.С.¹, Луговский А.П.¹, Зильберман Р.Д.², Савин А.О.²,
Винникова О.В.²

¹НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А.Н.Севченко» БГУ, ул. Курчатова, 7, 220045, Минск, Беларусь, dmitrij-tarasov@list.ru

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, 220084, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2

Фотодинамическая терапия (ФДТ) занимает одну из ведущих позиций среди современных методов лечения злокачественных новообразований. Дальнейшее развитие метода ФДТ связывают с созданием фотосенсибилизаторов (ФС) нового поколения, требования к которым не ограничиваются только высоким терапевтическим эффектом. Научным сообществом ведется разработка новых ФС, которые активируются световым излучением в окне прозрачности биотканей (700-900 нм). Это позволяет повысить глубину как повреждения, так и диагностики новообразований. По результатам комплексных исследований фотофизических свойств ряда индотрикарбоцианиновых красителей в модельных средах и опухолевых моделях на экспериментальных животных *in vivo* выделен краситель с оптимальными свойствами для тераностики злокачественных



новообразований [1]. На данном этапе разработки отработана схема синтеза и лабораторный регламент получения нового ФС, разработан прототип лекарственной формы препарата на основе глюкозы, определены оптимальные условия проведения сеанса фотодинамической терапии в экспериментах с перевиваемыми на лабораторных животных опухолями. Цель работы – провести сравнительную оценку противоопухолевой активности ФС на основе индотрикарбоцианинового красителя и разрешенного к применению в клинической практике ФС Фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь).

Исследование противоопухолевой активности фотосенсибилизаторов проводились на половозрелых инбредных мышах-самках линии C57BL/6 массой 18-20 г (получены в виварии ИБОХ НАНБ). В качестве модели опухолевого роста использовали аденокарциному Эрлиха (АКЭ), инокулированную подкожно на наружную поверхность бедра. Поддержание опухолевой линии осуществлялось на мышах линии ICR путем перевивки неразведенного асцита опухоли от животного-донора животному-реципиенту каждые 9-11 дней. Для перевивки опухоли мышам подкожно вводился разведенный в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида АКЭ до концентрации 1×10^6 клеток на 0,1 мл. Подсчет количества клеток проводили с помощью камеры Горяева в 100 больших квадратах. Эксперимент для двух фотосенсибилизаторов проводили через 10 дней после перевивки животным в одном эксперименте. Опытные и контрольные группы формировались из животных с опухолями, объем которых достиг 30-40 мм³ (линейные размеры опухолевого узла порядка 4-6 мм).

Доза препарата, время начала фотовоздействия, длина волны излучения, энергия и плотность мощности облучения для обоих ФС выбирались в соответствии с протоколом его использования. Для нового фотосенсибилизатора исходили из результатов собственных исследований. Так индотрикарбоцианиновый ФС использовался в виде прототипа лекарственной формы: смесь хроматографически чистого красителя с безводной глюкозой в соотношении 1:30. Начало фотовоздействия осуществлялось в соответствии с его фармакокинетикой через час после введения ФС. Для облучения использовался полупроводниковый лазерный источник света собственной разработки.

Для Фотолон ориентировались на протокол и результаты исследования его противоопухолевой активности, выполненные разработчиками. Облучение проводилось с помощью лазерного терапевтического аппарата «ФДТ-лазер» (Институт физики НАНБ), который разрешен к применению в медицинской практике и предназначен для ФДТ с использованием ФС Фотолон.

При этом параметры проведения ФДТ были идентичными по следующим пунктам (таблица): одинаковая опухолевая модель, способ введения препарата, параметры светового пятна на поверхности опухолевого узла. Животные во время эксперимента находились под общим тиопенталовым наркозом, дополнительно обездвигивались на специальной площадке с помощью фиксаторов. С целью обеспечения одинаковых условий фотовоздействия на образцы подвод светового излучения от разных лазеров осуществлялся с помощью одного и того же световода и линзового растрового рассеивателя.

Противоопухолевая активность фотосенсибилизаторов оценивалась согласно рекомендациям Фармкомитета по доклиническим исследованиям лекарственных средств [2]. Для объективной оценки противоопухолевой активности рассчитывался коэффициент торможения роста опухоли (ТРО):

$$TPO, \% = \frac{V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}}{V_{\text{контроль}}} \times 100\%,$$

где $V_{\text{контроль}}$ – средний объем опухоли (мм³) контрольной группы; $V_{\text{опыт}}$ – средний объем опухоли (мм³) опытной группы.



Таблица. Параметры исследования противоопухолевой активности ФДТ при использовании нового ФС и Фотолон

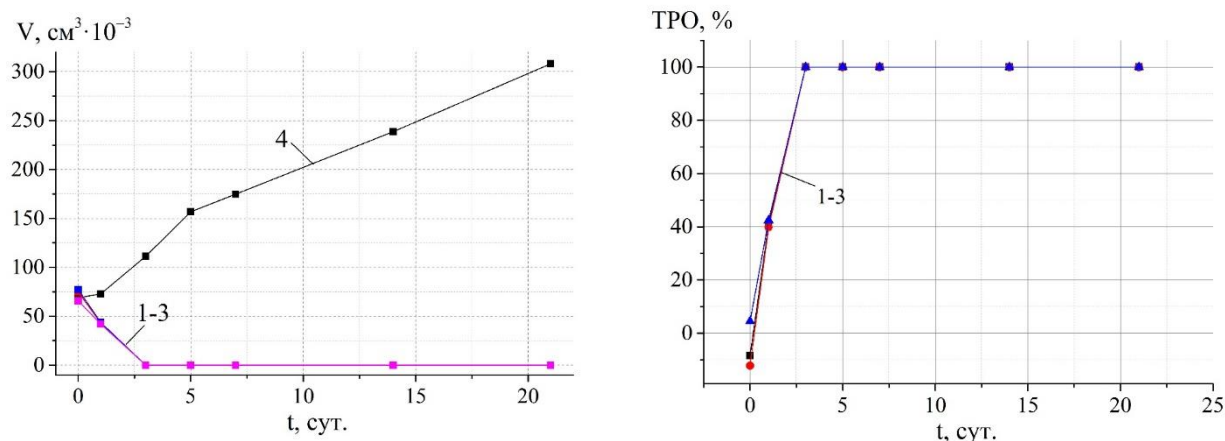
	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Опухолевая модель	Аденокарцинома Эрлиха на мышцах линии С57В1/6		
Фотосенсибилизатор	Фотолон (РУП «Белмедпрепараты»)		Индотрикарбоциан иновый ФС
Кол-во животных	10		
Источник фотовоздействия	660 нм	660 нм	750 нм
Световая доза ФДТ	50 Дж/см ²	100 Дж/см ²	140 Дж/см ²
Плотность мощности	150 мВт/см ²	150 мВт/см ²	100 мВт/см ²
Доза ФС	5 мг/кг	5 мг/кг	10,7 мг/кг
Введение	внутривенно		
Начало облучения после введения	60 минут		
Длительность облучения	5,5 минут	11 минут	23 минут
Длительность наблюдения после ФДТ	21 сутки		

В течение 21 суток проводилось наблюдение за состоянием животных и динамикой роста опухолей в опытных и контрольных группах. Для обоих исследованных ФС наблюдается одинаковая динамика роста опухоли после ФДТ. На 3-5 сутки после проведения ФДТ у животных испытываемых группах 1-3 на месте локализации опухоли наблюдались ожоги с формированием струпа, наблюдалось нарушение функционирования лапы (особенно в группе 2). Нормализация состояния лапы происходит через 7-14 суток после облучения.

На 3 сутки у животных опытных групп среди пораженных ожогом тканей опухолевые узлы не выявлялись. Заживление ран у животных протекало достаточно быстро, однако неравномерно для разных опытных групп. Наиболее медленно этот процесс протекал у животных, которым вводился ФС Фотолон и проводилось облучение при энергетической экспозиции 100 Дж/см².

На 14 и 21 сутки после проведения ФДТ опухоли не выявлялись ни в одной из испытываемых групп. В контрольных группах рост опухоли продолжается, на 21 сутки объем опухоли увеличился в 6-8 раз. Анализ динамики роста опухоли и ТРО позволяет заключить, что при обеспечении оптимальных условий фотодинамической терапии ФС Фотолон и новый ФС демонстрируют одинаковую противоопухолевую активность на модели АКЭ (рисунок).

Фотолон относится к фотосенсибилизаторам второго поколения, в то время как индотрикарбоцианиновый краситель по многим параметрам соответствует третьему и четвертому поколению ФС [3-5]. Новый ФС характеризуется интенсивным поглощением и флуоресценцией в области 700-800 нм, где максимально пропускание биологических тканей. Использование источников возбуждения с длиной волны в этом диапазоне повышает глубину повреждения опухолевых тканей (до 20-30 мм) и глубину регистрации флуоресценции (до 15 мм), что расширяет терапевтический и диагностический потенциал нового ФС [6]. Индекс контрастности накопления индотрикарбоцианинового красителя в зависимости от опухолевого штамма лежит в диапазоне 4-7, тогда как для ФС Фотолон этот параметр составляет ~2. В экспериментах с лабораторными животными для индотрикарбоцианинового красителя выявлена высокая скорость выведения: через сутки после сеанса ФДТ его концентрация в тканях снижается на порядок. Для него установлена низкая общая токсичность и низкий уровень светобоязни после терапии.



1 – индотрикарбоцианиновый ФС 10,7 мг/кг + облучение 750 нм, 140 Дж/см²;
 2 – ФС Фотолон 5 мг/кг + облучение 660 нм, 50 Дж/см²;
 3 – ФС Фотолон 5 мг/кг + облучение 660 нм, 100 Дж/см²;
 4 – контроль.

Рисунок. Динамика роста опухоли и ТРО у мышей С57BL/6 с привитой АКЭ после в/в введения индотрикарбоцианинового ФС или ФС Фотолон и проведения ФДТ

Таким образом, установлено, что новый фотосенсибилизатор обладает противоопухолевой фотодинамической активностью не хуже, чем для применяемого в клинической практике Фотолона, а по некоторым важным для фотосенсибилизаторов параметрам превосходит его.

ЛИТЕРАТУРА

1. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / Lugovski A.A. [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2016. – Vol. 316. – P. 31-36.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / М-во здравоохранения и соц. развития Рос. Федерации; ред. кол.: А.Н. Миронов [и др.]. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – С. 655-669.
3. The potential of photodynamic therapy (PDT) – Experimental investigations and clinical use / Oniszczyk A. [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2016. – Vol. 83. – P. 912-929.
4. New photosensitizers for photodynamic therapy / Abrahamse H., Hamblin M.R. // Biochemical Journal. – 2016. – Vol. 473(4). – P. 347-364.
5. Potential of cyanine derived dyes in photodynamic therapy / Lange N. [et al.] // Pharmaceutics. – 2021. – Т. 13. – №. 6. – P. 818.
6. Оптимизация параметров фантома для диффузионной флуоресцентной томографии биотканей *in vivo* / Самцов М.П. [и др.] // Журн. Белорус. гос. ун-та. Физика. – 2018. – № 1. – С. 33-40.



ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗАМИДНОГО РЯДА

Сечко О.Г.¹, Калиниченко Е.Н.², Божок Т.С.², Царенков В.М.¹

¹Белорусский государственный медицинский университет, 220083, г. Минск, пр.

Дзержинского, 83, pharmteh@bsmu.by

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,

220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, tbozhok@iboch.by

Введение. Необходимость разработки и исследования новых соединений с противотуберкулезной активностью обусловлена увеличением количества пациентов с резистентной формой туберкулеза [1]. В предыдущих исследованиях нами установлено, что производное бензамида – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляло рост штамма *Mycobacterium terrae* 15755, который является модельным для определения противотуберкулезной активности [2], причем в такой же концентрации, как и противотуберкулезный препарат I ряда рифампицин в условиях эксперимента [3]. После положительного результата нами принято решение исследовать противотуберкулезную активность изомерных аналогов 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида.

Цель работы – исследовать противотуберкулезную активность новых синтетических изомерных производных бензамидного ряда.

Материалы и методы. Объекты исследования – новые синтетические конъюгаты бензамида, полученные из изомерных фталевых кислот и содержащие остатки гетероциклических соединений, в частности 3-(трифторметил)анилина и 2(3)-фторбензоилпиперазина. Исследуемые соединения синтезированы в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Исследование противотуберкулезной активности проводили на штамме *Mycobacterium terrae* 15755 с использованием метода разведений в плотной питательной среде в чашках Петри. Для оценки противотуберкулезной активности использовали визуальную оценку роста *Mycobacterium terrae* в плотной питательной среде в чашках Петри. В нашем эксперименте концентрация изучаемых соединений в ряду серийных разведений убывала в геометрической прогрессии с коэффициентом 2. Для этого был приготовлен исходный раствор исследуемого соединения в диметилсульфоксиде (ДМСО) с концентрацией 2000 мкг/мл, который затем добавляли в питательную среду Миддлбрука 7Н9 с глицерином (Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol) для получения требуемых концентраций (200 и 100 мкг/мл). Для получения концентрации изучаемого соединения 200 мкг/мл исходный раствор изучаемого соединения в ДМСО объемом 2 мл с концентрацией 2000 мкг/мл смешивали с питательной средой Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 18 мл, то есть в объемном соотношении 1:9. Для получения концентрации изучаемого соединения 100 мкг/мл исходный раствор изучаемого соединения в ДМСО объемом 1 мл с концентрацией 2000 мкг/мл смешивали с питательной средой Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 19 мл, то есть в объемном соотношении 1:19. Раствор рифампицина в ДМСО готовили в таких же концентрациях как растворы исследуемых веществ (200 мкг/мл и 100 мкг/мл). Затем культуру *Mycobacterium terrae* 15755 высевали во все анализируемые растворы. Для того чтобы установить, оказывает ли влияние, используемый нами в опытных растворах растворитель на рост культуры *Mycobacterium terrae* 15755, выполняли контрольный опыт. Для контрольного опыта использовали ДМСО объемом 2 мл, который добавляли в питательную среду Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 18 мл. Затем культуру *Mycobacterium terrae* 15755 высевали в анализируемый раствор. Еще один контрольный опыт выполнялся для контроля роста культуры – для этого в питательную среду



Миддлбука 7Н9 с глицерином объемом 20 мл высевали культуру *Mycobacterium terrae*. Все образцы выдерживали в термостате при 37°C в течение трех недель. Для оценки противотуберкулезной активности определяли ингибирующую концентрацию (мкг/мл), которая соответствует концентрации анализируемого вещества, при которой роста микобактерий в чашке Петри не наблюдалось. Для каждого соединения эксперимент выполнен в трех повторях.

Результаты исследований. Результаты исследования противотуберкулезной активности – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]-бензамида и его новых синтетических изомерных аналогов представлены в таблице 1, где показан наблюдаемый рост *Mycobacterium terrae* 15755 в присутствии исследуемых соединений в концентрациях – 200 мкг/мл и 100 мкг/мл, в присутствии положительного контроля – рифампицина и в присутствии только растворителя (ДМСО).

Таблица 1. Динамика роста *Mycobacterium terrae* 15755 в присутствии 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида и его новых синтетических изомеров *in vitro* (среда Миддлбука 7Н9 с глицерином)

№	Химическое название	Структурная формула	Исследуемая концентрация, мкг/мл	
			200	100
1	3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид		-	±
			-	±
			-	±
2	3-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид		-	-
			-	-
			-	-
3	4-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид		-	++
			-	++
			-	++
4	4-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид		+	+++
			+	+++
			+	+++
5	рифампицин		-	-
			-	-
			-	-
6	ДМСО (растворитель)		++++	
7	Контроль роста культуры <i>Mycobacterium terrae</i> 15755		++++	

Примечание: «++++» – обильный рост, «+++» – сильный рост, «++» – слабый рост, «+» – незначительный рост, «±» – единичные колонии, «-» – отсутствие роста.

Заключение. В ходе исследования противотуберкулезной активности *in vitro* новых синтетических изомерных производных бензамида обнаружено, что три из четырех исследуемых соединений подавляют рост *Mycobacterium terrae* в такой же концентрации, как и противотуберкулезный препарат I ряда рифампицин в условиях эксперимента.

Установлено, что изомерные производные, полученные из изофталевой кислоты и содержащие 3-(трифторметил)анилиновый заместитель (соединения №1 и №2), показали значительную противотуберкулезную активность, сравнимую с активностью рифампицина, в отличие от изомерных терефталевых аналогов (соединения №3 и №4), причем положение атома фтора в остатке бензоилпиперазина не оказывало существенного влияния на активность



данных соединений. Соединения, противотуберкулезная активность которых установлена на штамме *Mycobacterium terrae* 15755 *in vitro*, требуют дальнейшего исследования их противотуберкулезной активности на патогенных штаммах *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

ЛИТЕРАТУРА

1. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017(WHO/EMP/IAU/2017.12). License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. *Mycobacterium terrae*: a potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test / P.A. Griffiths, J.R. Babb, A.P. Fraiese // *Journal of Hospital Infection*. – 1998. – Vol. 38(3). – P. 183-192.
3. Противотуберкулезная активность производных бензамида и бензойной кислоты / О.Г. Сечко, И.Н. Слабко, В.М. Царенков // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики. – 2021. – Т. 11. – С. 540-546.

ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY OF OF NEW SYNTHETIC ISOMERIC BENZAMIDE DERIVATIVES

Sechko O.G.¹, Kalinichenko E.N.², Bozhok T.S.², Tsarenkov V.M.¹

¹Belarusian State Medical University, pharmteh@bsmu.by

²Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084 Belarus, tbozhok@iboch.by

The aim of the study is to investigate the antituberculosis activity of new synthetic structural isomers of a benzamide derivative – 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide. The study of the antituberculosis activity of the compounds was carried out on the *Mycobacterium terrae* 15755 strain using the dilution method in a dense nutrient medium in Petri's dishes. According to the results of the study of antituberculosis activity *in vitro*, it was found that 3 out of 4 studied new synthetic isomers inhibit the growth of *Mycobacterium terrae* at the same concentration as the antituberculosis drug rifampicin in experimental conditions. Structural features of compounds influencing antituberculosis activity were revealed.

СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО МОДИФИЦИРОВАННОГО ПУРИНОВОГО НУКЛЕОЗИДА АЛЛОФУРАНОЗЫ

Сивец А.В.¹, Ханчевский М.А.^{1,2}, Жуковец Т.А.³, Сивец Г.Г.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, 220084,
г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, alsiv@iboch.by

²Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь

³Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Беларусь

Введение. Комплексные исследования в области химии, биологии и фармакологии синтетических нуклеозидных аналогов в течение нескольких десятилетий привели к разработке и внедрению в клиническую практику ряда противоопухолевых и противовирусных лекарственных препаратов, что демонстрирует огромный химиотерапевтический потенциал этого успешного класса соединений в фармацевтической химии. Принимая во внимание тот факт, что модифицированные пуриновые нуклеозиды являются интересным объектом для поиска цитостатических агентов, во многих работах были описаны синтез и изучение цитостатической активности производных пуриновых нуклеозидов [1-3].

Пуриновые нуклеозиды, модифицированные в гетероосновании, в целом, могут действовать как антиметаболиты после их метаболического фосфорилирования в



соответствующие 5'-трифосфаты, которые конкурируют с физиологическими нуклеозидами и взаимодействуют с рядом клеточных мишеней, индуцируя цитотоксические эффекты в опухолевых клетках. В частности, кладрибин, неларабин и флударабин фосфат используются в онкологии для лечения как гематологических злокачественных заболеваний, так и некоторых видов опухолей.

Большинство из изученных ранее пуриновых нуклеозидов содержат алкокси- или аминогруппу в шестом положении и атом хлора либо фтора во втором положении гетероциклического основания, что, по-видимому, является важным фактором для образования водородных связей с полимеразам и другими ключевыми ферментами, участвующими в метаболизме нуклеиновых кислот. В то же время, пуриновые нуклеозиды, содержащие углеродные заместители (алкильные, арильные, бензильные или гетероарильные) при С-6 гетерооснования, также проявляют значительные цитотоксичные эффекты [1,4].

Производные аденина (цитокнины), содержащие ароматические либо изопренильные заместители по 6-аминогруппе гетерооснования, являются фитогормонами, причём ряд модифицированных в углеводной части и гетероциклическом основании рибофуранозилнуклеозидов аденина, в частности, N⁶-замещенных, также проявляют выраженные противоопухолевые свойства [2,3]. В связи с этим, в настоящее время представляют интерес пуриновые аналоги гексофуранозилнуклеозидов, главным образом – по причине их значительного структурного подобия с рибонуклеозидами. Главное различие между обоими типами нуклеозидов – присутствие этиленгликольного фрагмента в положении 4'-углеводной части нуклеозидного аналога, замещающего обычную для природного нуклеозида гидроксиметильную группу [4]. Стоит отметить, что производные пуриновых нуклеозидов гексофураноз встречаются также и в природных источниках, в которых они играют роль эндогенных гормонов, причём соединения этого ряда обладают противоопухолевой активностью [5].

Таким образом, исследования по синтезу новых пуриновых гексофуранозилнуклеозидов представляют несомненный интерес для оценки их биологических свойств и выявления потенциальных противоопухолевых и антивирусных агентов.

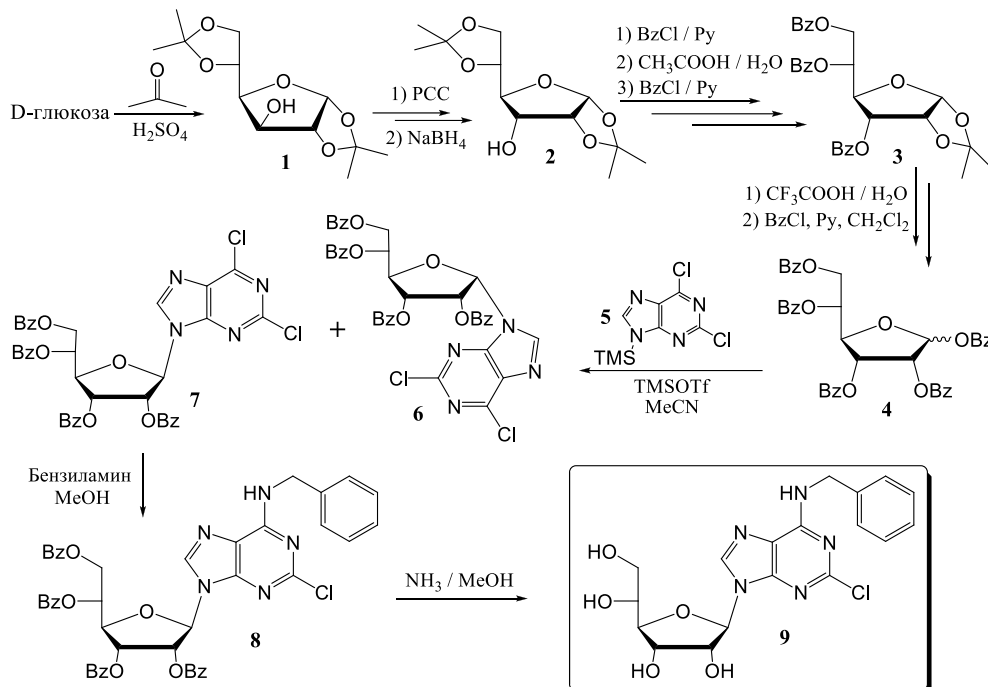
Цель исследования. Целью настоящего исследования являлась: разработка из легкодоступной D-глюкозы многостадийного подхода для синтеза ацилированной D-аллофуранозы в качестве универсального гликозилирующего агента; получение модифицированных пуриновых D-аллофуранозилнуклеозидов через реакции гликозилирования производных пурина; оценка противоопухолевой активности *in vitro* новых модифицированных нуклеозидов.

Материалы и методы. В качестве методов, применявшихся в ходе исследований, выступали современные методы тонкого и препаративного органического синтеза. Реагенты, полученные из коммерческих источников, использовались без дополнительной очистки. Очистка продуктов реакций осуществлялась разделением веществ колоночной хроматографией на силикагеле Silica gel 60 (40-63 мкм, Merck). Структуры полученных неприродных сахаров и нуклеозидов подтверждены методами ЯМР-спектроскопии (¹H, ¹³C) и масс-спектрометрии. Биологические испытания проводились на культурах опухолевых клеток HerG2 и K-562. Все манипуляции с клетками выполняли с соблюдением правил стерильности в ламинарном боксе II класса защиты (ОДО «Белаквилон», РБ). Измерения флуоресценции проводили на мультипланшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH).

Результаты и их обсуждение. В настоящей работе нами осуществлен синтез пуриновых D-аллофуранозилнуклеозидов, исходя из углеводного предшественника (Схема). Диацетонглюкоза (**1**) была получена из D-глюкозы в результате реакции ацетонирования с использованием известного метода. Синтез три-О-бензоил-1,2-О-изопропилиден-α-D-аллофуранозы **3** был осуществлён из ацетонида D-аллофуранозы **2** в три стадии с суммарным выходом 55%. Новое перацильное производное аллофуранозы **4** получено в результате удаления 1,2-О-изопропилиденовой защиты ацетонида **3** трифторуксусной кислотой с

образованием смеси селективно блокированных аномерных сахаров, бензоилирование которых давало пербензойное производное аллофуранозы **4** в виде смеси α и β -аномеров с выходом 83%.

Схема



Гликозилирование триметилсилильного производного 2,6-дихлорпурина в ацетонитриле перацильным производным аллофуранозы **4** при кипячении в присутствии TMSOTf протекало с образованием блокированных изомерных N⁹- α - и N⁹- β -нуклеозидов 2,6-дихлорпурина **6** и **7**. Реакция приводила к преимущественному образованию защищённого β -аномера нуклеозида 2,6-дихлорпурина **7** (70%) и побочного α -аномера **6** (10%) после колоночной хроматографии на силикагеле. Модифицированный пуриновый β -D-аллофуранозилнуклеозид **8** был получен с использованием реакции нуклеофильного замещения 6-атома хлора ацилированного β -D-нуклеозида **7** бензиламином. Деацилированием бензойного производного нуклеозида N⁶-замещенного 2-хлораденина **8** был получен 9- β -D-аллофуранозил-2-хлор-N⁶-бензилпурин (**9**) (66%).

Для оценки антипролиферативной активности полученного модифицированного нуклеозида **9** были использованы две культуры опухолевых клеток: клетки гепатокарциномы человека (HepG2) и клетки хронического миелогенного лейкоза (K-562). Клетки культивировали в концентрации 3×10^5 клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете в полной культуральной среде на основе DMEM. Действие исследуемого вещества оценивали спустя 48 часов после внесения в лунки. Оценку эффективности ингибирующего действия (IC₅₀, мкМ) нуклеозида проводили при помощи резазурина. В лунки вносили по 20 мкл резазурина и инкубировали в течение 3 часов. Результаты оценки *in vitro* противоопухолевой активности в сравнении с известными противоопухолевыми нуклеозидами – неларабином и флударабином – представлены в таблице.



Таблица. Результаты оценки *in vitro* противоопухолевой активности 9-β-D-аллофуранозил-2-хлор-N⁶-бензилпурина (9) (значения IC₅₀, мкМ)

Соединение	Культуры клеток	
	HepG2	K-562
9-β-D-аллофуранозил-2-хлор-N ⁶ -бензилпурин (9)	5,8	31,7
Неларабин	23,0	62,2
Флударабин	4,1	9,0

Закключение. Разработан многостадийный подход к синтезу модифицированных в гетероосновании пуриновых β-D-аллофуранозилнуклеозидов с использованием перацилированной D-аллофуранозы. Результаты исследований биологической активности и выявление цитотоксичности аллофуранозилнуклеозида 2-хлор-N⁶-бензиладенина дают основание предполагать, что модифицированные пуриновые β-нуклеозиды аллофуранозы представляют интерес для дальнейшего изучения их потенциальной противоопухолевой активности на клеточных культурах.

ЛИТЕРАТУРА

1. N⁶-alkyladenosines: Synthesis and evaluation of *in vitro* anticancer activity / R. Ottria [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 18. – P. 8396-8402.
2. Synthesis and biological activity of novel N⁶-substituted and 2,N⁶-disubstituted adenine ribo- and 3'-C-methyl-ribonucleosides as antitumor agents / L. Cappellacci [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 45. – P. 1499-1504.
3. Synthesis of novel 6-substituted amino-9-(β-D-ribofuranosyl)purine analogs and their bioactivities on human epithelial cancer cells / M. Tuncbilek [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 28. – P. 235-239.
4. Synthesis and cytostatic activity of purine nucleosides derivatives of allofuranose / P. Besada [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 45. – P. 6114-6119.
5. Anticancer activity of natural cytokinins / J. Voller [et al.] // *Phytochemistry.* – 2010. – Vol. 71. – P.1350-1359.

SYNTHESIS AND ANTITUMOR ACTIVITY OF A NEW MODIFIED PURINE NUCLEOSIDE OF ALLOFURANOSE

Sivets A.V.¹, Khanchevsky M.A.^{1,2}, Zhukovets T.A.³, Sivets G.G.¹

¹*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, 220084, Kuprevich str., 5/2, Minsk, Republic of Belarus, alsiv@iboch.by*

²*International Sakharov Environmental State Institute Belarusian State University, Minsk, Belarus*

³*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus*

A multi-step synthetic approach has been developed for the preparation of heterobase-modified purine β-D-allofuranosyl nucleosides using peracylated D-allofuranose. The results of studies of biological activity and the reveal of cytotoxicity of allofuranosyl 2-chloro-N⁶-benzyladenine nucleoside suggest that modified purine β-nucleosides of allofuranose are of interest for the further study of their potential antitumor activity on various cell cultures.



СИНТЕЗ МОЛНУПИРАВИРА ИЗ ЦИТИДИНА

Сивец Г.Г.

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, sivets@iboch.by

Молнупиравир (5'-О-изопропиловый эфир β -D-N4-гидроксицитидина, МК-4482) используется в клинической практике в качестве противовирусного препарата для лечения COVID-19 [1]. Он обладает широким спектром противовирусной активности в отношении ряда РНК вирусов, таких как гепатит С, Эбола, норовирус и коронавирус (SARS-CoV-2). После ускоренной программы клинических испытаний молнупиравир (Lagevrio®) применяется с 2021 года для терапии коронавирусных инфекций в ряде стран [2].

Молнупиравир, как и другие лекарственные препараты, например, ремдесивир, обладает способностью ингибировать РНК зависимую РНК-полимеразу и репликацию коронавируса [1]. Установлено, что 5'-О-трифосфат N4-гидроксицитидина образуется после превращения пролекарства с участием эстераз в β -D-N4-гидроксицитидин и последующего фосфорилирования рибонуклеозида клеточными киназами, и выступает эффективным ингибитором коронавируса через механизм летального мутагенеза [3]. В результате биологической оценки *in vitro* ряда различных 4-ННОН пиримидиновых нуклеозидных аналогов, модифицированных в углеводной части, было показано, что наибольшей антикоронавирусной активностью обладает N4-гидроксицитидин [4].

Целью настоящей работы являлось исследование способа синтеза известного противовирусного нуклеозида – молнупиравира для разработки практического метода его получения из доступного цитидина. На основании анализа известных химических и химико-энзиматических подходов [5,6] нами исследован способ получения молнупиравира из 1,2-О-ацетонида цитидина (**2**), синтезированного из легкодоступного цитидина с использованием ацетона и серной кислоты. 5'-О-Ацилпроизводное 1,2-О-изопропилиден- β -D-цитидина **3** синтезировано в качестве ключевого полупродукта в две стадии из ацетонида **2**. Трансаминирование по гетерооснованию селективно блокированного в углеводной части цитидина **3** с использованием гидроксиламина в изопропанол давало производное N-4-гидроксицитидина **4**. 5'-О-Изобутирил- β -D-N4-гидроксицитидин **5** был получен в результате удаления 1,2-О-изопропилиденовой группы промежуточного нуклеозида **4** муравьиной кислотой и последующей колоночной хроматографией на силикагеле. Структуры синтезированных цитозиновых нуклеозидов и целевого рибонуклеозида подтверждены данными ¹H, ¹³C ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Использование легкодоступных реагентов, исследование региоселективных реакций ацилирования и деацилирования промежуточных нуклеозидов в мягких условиях и получение селективно блокированного ацетонида цитидина после хроматографии на силикагеле позволили синтезировать целевой нуклеозид с суммарным выходом 30-35% из цитидина. Таким образом, изучен модифицированный четырехстадийный метод синтеза известного противовирусного нуклеозида – 5'-О-изобутирил- β -D-N4-гидроксицитидина, включающий трансформации доступного 1,2-О-изопропилиден- β -D-цитидина в 5'-О-ацильное производное, последующее гидроксиаминирование по гетерооснованию промежуточного блокированного в углеводной части нуклеозида и удаление изопропилиденовой защитной группы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Discovery, and Patent Trends on Molnupiravir: A Prospective Oral Treatment for COVID-19 / M. Imram [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – P. 5795
2. Molnupiravir: First Approval / Y.Y. Syed // *Drugs*. – 2022. – Vol. 82. – P. 455-460.
3. Lethal mutagenesis as an antiviral strategy / R. Swanstrom, R.F. Schinazi // *Science*. – 2022. – Vol. 375. – P. 497-498.



4. Synthesis of Novel N-4-Hydroxy Cytidine Analogues as Potential Anti-SARS-CoV-2 Agents / F. Amblard [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Vol. 15. – Art. 1144.
5. A concise route to MK-4482 (EID-2801) / N. Vasudevan [et al.] // *Chem. Commun.* – 2020. – Vol. 56. – P. 13363-13364.
6. Progress Toward a Large-Scale Synthesis of Molnupiravir (MK-4482, EID-2801) from Cytidine / J.P. Henschke [et al.] // *ACS Omega*. – 2021. – Vol. 6. – P. 10396-10402.

SYNTHESIS OF MOLNUPIRAVIR FROM CYTIDINE

Sivets G.G.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084 Belarus, sivets@iboch.by*

Modified method for preparation of the known antiviral nucleoside, molnupiravir (5'-O-isobutyryl ester prodrug form of N4-hydroxycytidine), was explored starting from cytidine which includes four steps: transformations of available 1,2-O-isopropylidene- β -D-cytidine to prepare its 5'-O-isobutyryl derivative, followed by hydroxyamination of the intermediate protected in carbohydrate moiety nucleoside with hydroxylamine sulfate, and the acidic removal of acetonide group on the final step.

ФАРМАКОГЕНОМИКА ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Синявская М.Г.¹, Голоенко И.М.¹, Бобр С.Л.¹, Левданский О.Д.¹, Шулинский Р.С.¹,
Грищенко Л.Н.², Ревтович М.Ю.²

¹*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220141 Минск, ул. Скорины 34,
cytoplasmic@mail.ru*

²*Белорусская медицинская академия последипломного образования, 220013 г. Минск,
ул. П. Бровки, 3, mi hail_revtovich@yahoo.com*

Адъювантная и периоперационная химиотерапия является на сегодняшний день неотъемлемыми компонентами противоопухолевого лечения у радикально оперированных по поводу рака желудка пациентов. Эффективность химиотерапии во многом определяются генетически обусловленными особенностями метаболизма цитостатиков. Терапевтический ответ и токсические реакции, развивающиеся в результате применения препаратов, могут сильно варьировать от умеренных проявлений до крайне тяжелых [1], что оправдывает разработку подходов к их прогнозированию.

Официальных рекомендаций по рутинному тестированию большинства SNP (single nucleotide polymorphism) нет (PharmGKB), что определяет актуальность данной проблемы.

С целью изучения распространения у жителей Беларуси полиморфных аллелей генов, участвующих в метаболизме препаратов химиотерапии – *DPD* (фторурацил); *ERCC1*, *GSTP1* (производные платины); *ABCB1*, *CYP3A5* (таксаны) были проанализированы данные секвенирования клинического экзема полученные ранее в лаборатории нехромосомной наследственности ИГиЦ НАН Беларуси, а также проведено генотипирование образцов ДНК белорусов для отдельных маркеров.

Результаты:

Выявлено 24 полиморфных варианта по гену *DPYD*. Для пяти полиморфных локусов гена – rs746718279, rs3918290, rs370707404, rs45589337, rs141726921 частоты встречаемости достоверно отличались от общеевропейских.

По 3 из 5 выявленных полиморфных локусов гена *ERCC1* – rs11615, rs2229918, rs3212976 также наблюдались отличия в соотношении аллельных вариантов по сравнению с наблюдаемыми в Европе.



Ген *GSTP1* в исследуемой выборке жителей был представлен 5 полиморфными вариантами для двух из которых наблюдались отличия в частотах встречаемости аллелей – rs192307201, rs200701643.

Для *ABCB1* гена идентифицировано 18 полиморфных локусов, из которых для восьми наблюдались отличия в распределении редких аллелей в исследуемой выборке жителей.

CYP3A5 в исследуемой группе был представлен 8 полиморфными вариантами, для четырех из которых наблюдались достоверные отличия в частотах встречаемости аллелей от общеевропейских.

Заключение:

1. Частота встречаемости некоторых полиморфных аллелей проанализированных генов, участвующих в метаболизме химиопрепаратов отличается у жителей Беларуси в сравнении с европейской популяцией.

2. Функциональная значимость ряда обнаруженных полиморфных вариантов генов нуждается в уточнении.

Данные исследования являются отправной точкой для дальнейшего поиска и разработки панели маркеров для прогнозирования возможности развития тяжелых токсических осложнений химиотерапии у радикально оперированных по поводу рака желудка пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. FOLFIRINOX for the Treatment of Advanced Gastroesophageal Cancers: A Phase 2 Nonrandomized Clinical Trial / Park H. [et al.] // JAMA Oncol. – 2020. – Vol. 6(8). – P. 1231-1240.

PHARMACOGENOMICS OF CHEMOTHERAPY FOR GASTRIC CANCER

Siniauskaya M.G.¹, Goloenko I.M.¹, Bobr S.L.¹, Liaudanski A.D.¹, Shulinsky R.S.¹,
Grishenkova L.N., Revtovich M.Yu.²

¹*Institute of genetics and cytology NAS Belarus, 220141, Minsk, Skoriny 34,
cytoplasmic@mail.ru*

²*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, 220013, Minsk, P. Brovki, 3,
mihail_revtovich@yahoo.com*

Adjuvant and perioperative chemotherapy is the essential component of anticancer treatments in patients radically operated for gastric cancer. The efficiency of chemotherapy is largely depends on the genetically determined characteristics of the cytostatics metabolism. Therapeutic response and toxic reactions, developing as the results of the prescribed preparation can strongly vary from moderate to severe.

There are no official recommendations for routine testing of most SNPs (single nucleotide polymorphism of genes) (PharmGKB), what determine the importance of this problem.

In order to study the distribution of polymorphic alleles of genes involved in the metabolism of chemotherapy drugs in Belarus population – *DPD* (fluorouracil); *ERCC1*, *GSTP1* (platinum derivatives); *ABCB1*, *CYP3A5* (taxanes) the data of clinical exome sequencing and genotyping of DNA samples of Belarusians were analyzed.

The frequency of occurrence of some polymorphic alleles of genes involved in the chemotherapy drugs metabolism differs in the inhabitants of Belarus in comparison with the European population. The functional significance of detected SNP needs to be clarified.

This study is the starting point for development of the gene marker panel for predicting the possibility of developing severe toxic complications of chemotherapy in patients radically operated on for gastric cancer.



РАЗРАБОТКА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ СОРАФЕНИБА ТОЗИЛАТА

Синявский В.В., Сергей А.В., Будько Е.В., Калининченко Е.Н.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, kalinichenko@iboch.by*

Сорафениба тозилат является мультикиназным ингибитором, обладающим антипролиферативной и антиангиогенной активностью [1]. Оригинальным лекарственным препаратом, содержащим сорафениба тозилат, является Nexavar® 200 мг производства Bayer Health Care, Германия.

Целью исследования являлась разработка фармацевтической композиции на основе сорафениба тозилата, отличной от оригинального лекарственного препарата Nexavar® 200 мг производства Bayer Health Care, Германия, но обладающей сопоставимым профилем растворения.

Материалы и методы. Для производства фармацевтической композиции использовали субстанцию сорафениба тозилат производства НПЦ «ХимФармСинтез» с размером частиц сопоставимым с размером частиц оригинального препарата Nexavar® 200 мг производства Bayer Health Care, Германия. Для получения оптимального профиля растворения в состав композиции включили следующие вспомогательные вещества: в качестве наполнителя была выбрана микрокристаллическая целлюлоза, в качестве дезинтегранта – кроскармеллоза натрия, в качестве связующего – гипромеллоза, в качестве солюбилизатора – лаурилсульфат натрия, а в качестве лубриканта – стеарат магния. В качестве пленочной оболочки использовали Opadry® Pink.

Производство готового продукта включало в себя смешивание компонентов внутренней фазы, влажную грануляцию для оптимизации фармацевтических свойств смеси (текучесть, сыпучесть, насыпная плотность) с последующей калибровкой и сушкой гранулята, опудривание компонентами внешней фазы, прессование таблеток-ядер и нанесение пленочной оболочки. В ходе разработки и масштабирования процесса были подобраны технологические параметры на всех стадиях процесса, обеспечивающие необходимые характеристики продукта.

Результаты и их обсуждение. Составы фармацевтических композиций, полученных описанным выше методом, и референтного лекарственного препарата Nexavar® 200 мг производства Bayer Health Care, Германия приведены в таблице 1.

Таблица 1. Состав фармацевтических композиций

Компонент	Количество, мг			
	Комп. 1	Комп. 2	Комп. 3	Референт
Сорафениба тозилат	274,00	274,00	274,00	274,00
Кроскармеллоза натрия	58,85	33,70	18,90	36,40
Микрокристаллическая целлюлоза	192,40	293,95	311,60	16,00
Лаурилсульфат натрия	5,50	6,30	3,40	1,70
Гипромеллоза	16,50	18,90	18,90	10,20
Магния стеарат	2,75	3,15	3,20	1,7
Opadry pink	17,50	20,00	20,00	10,00
Итого	567,50	650,00	650,00	350,00



Степень высвобождения ДВ определяли с использованием автоматизированной системы растворения Cary 60 Multicell UV Dissolution System в режиме реального времени. Установили следующие параметры для проведения испытания: объем среды растворения – 900 мл, температура – $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, общее время растворения – 30 минут, скорость вращения лопастей мешалки – 75 об/мин, длина волны – 265 нм. В качестве среды растворения использовали 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с 1% лаурилсульфата натрия (рН 1,0). Для проведения испытания использовали 12 образцов каждой композиции. Полученные результаты представляли в виде среднего арифметического (таблица 2).

Таблица 2. Результаты высвобождения действующего вещества разработанных фармацевтических композиций и референтного лекарственного препарата Nexavar® 200 мг производства Bayer Health Care, Германия

Степень высвобождения действующего вещества, масс. %	t, мин				
	5	10	15	20	30
Композиция 1	39,23	91,75	97,55	99,68	100,42
Композиция 2	32,40	90,10	98,40	99,70	100,05
Композиция 3	37,90	88,70	93,80	98,50	100,20
Референт	36,60	84,68	94,38	96,90	100,30

Из разработанных фармацевтических композиций наиболее близкий профиль высвобождения действующего вещества к профилю высвобождения референтного препарата имеет фармацевтическая композиция 3.

Заключение. В результате фармацевтической разработки, которая заключалась в оптимизации количественного состава вспомогательных компонентов лекарственной формы, была получена фармацевтическая композиция, обладающая профилем растворения сопоставимым с профилем растворения оригинального лекарственного препарата Nexavar® 200 мг производства Bayer Health Care, Германия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer / S. Wilhelm [et al.] // J. Nature Reviews Drug Discovery. – 2006. – Vol. 10. – P. 835-844.

DEVELOPMENT OF A PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF SORAFENIB TOSYLATE

Siniauski U.V., Sergei A.U., Budko E.V., Kalinichenko E.N.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084 Belarus, kalinichenko@iboch.by*

As a result of pharmaceutical development, dosage forms of sorafenib tosylate y were obtained. The release of the active substance was evaluated using a dissolution test with UV detector.



A METHOD FOR OBTAINING FINE PAZOPANIB HYDROCHLORIDE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT

Siniauski U.V., Farina A.V., Sergei A.U., Kalinichenko E.N.

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,

Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, kalinichenko@iboch.by

Introduction. Pazopanib is a multikinase inhibitor, including tyrosine kinases of endothelial growth factor receptor (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), platelet growth factor receptor (PDGFR- α and PDGFR- β), fibroblast growth factor receptor (FGFR-1, FGFR-3), and c-Kit tyrosine kinases [1].

Since the pazopanib base is poorly soluble in water [2], its salt pazopanib hydrochloride is used in pharmaceutical manufacture. The substance of pazopanib hydrochloride can be categorized as a Class II active pharmaceutical ingredient (API) (high permeability, low solubility) according to the Biopharmaceutics Classification System (BCS). This means that particle size is expected to greatly impact dissolution and permeability. Therefore, the original drug manufacturer (Glaxo Operations Limited, United Kingdom) uses microionization in order to improve API solubility and to provide a more consistent particle size input to the granulation process. Nevertheless, using of microionization methods increases the cost of the API and losses of the product.

The purpose of the study was to develop a method for obtaining the pharmaceutical substance pazopanib hydrochloride, which has a smaller particle size and is characterized by a more uniform particle size distribution without using complex grinding methods.

Materials and methods. The pazopanib hydrochloride produced by Xi'an Natural Bio-Technique Co., Ltd, China was used for the study as Sample 1. Sample 2 was obtained using following method: an aprotic solvent was added to Sample 1 and stirred at 30-50°C. The suspension changed the color from albescent-yellow to white. The mixture was cooled to 15°C, stirred for 1 hour, filtered, and the filter cake was washed with 2 ml of pure acetone. The remnant was dried under vacuum at 55°C within 15 hours to remove the residual amount of acetone. The yield was 97%.

Results and their discussions. The molecular structure of Sample 1 and Sample 2 has been determined by XRD method (Table 1). The obtained results reflect the identity of their polymorphic forms.

Table 1. XRD measurement results

Sample 1	Sample 2	Referent meaning [3]
2 θ (°)	2 θ (°)	2 θ (°)
10.29, 11.46, 14.43, 15.33, 16.45, 18.09, 19.52, 20.44, 21.88, 24.19, 26.94, 27.78, 28.67, 29.19, 30.69, 33.24, 34.48	10.51, 11.47, 14.59, 15.51, 16.41, 17.85, 19.53, 20.45, 22.20, 23.85, 27.27, 27.83, 28.69, 29.21, 30.38, 33.20, 34.45	10,4 $\pm$ 0,2, 11,5 $\pm$ 0,2, 14,4 $\pm$ 0,2, 15,5 $\pm$ 0,2, 16,3 $\pm$ 0,2, 17,9 $\pm$ 0,2, 19,7 $\pm$ 0,2, 20,3 $\pm$ 0,2, 22,0 $\pm$ 0,2, 24,0 $\pm$ 0,2, 27,1 $\pm$ 0,2, 27,8 $\pm$ 0,2, 28,8 $\pm$ 0,2, 29,1 $\pm$ 0,2, 30,5 $\pm$ 0,2, 33,4 $\pm$ 0,2, 34,3 $\pm$ 0,2

Particle size was determined by laser diffraction [4] using the Malvern Mastersizer 3000 installation. 1 ml of each sample was loaded into the unit and then the particle size was measured automatically via two-laser method using quartz cuvette (Figure 1, Table 2).

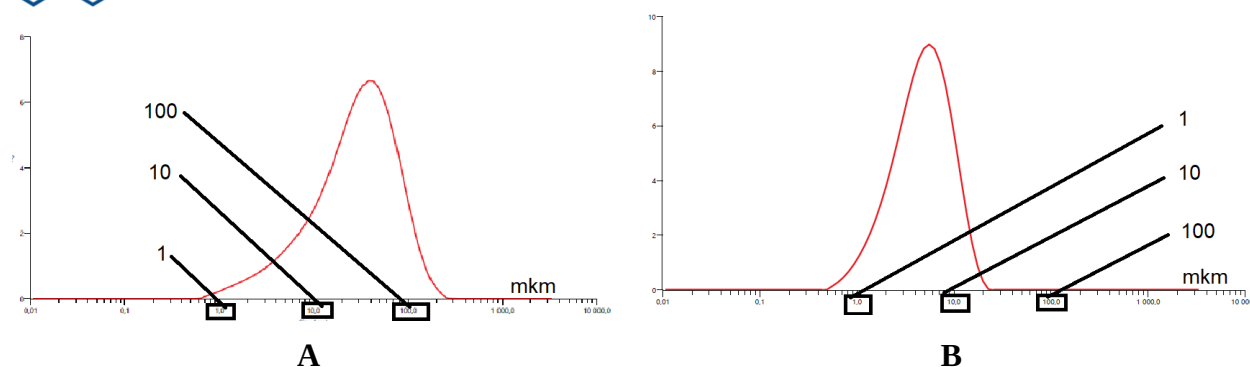


Figure 1. Particle size distribution of Sample 1 (A) and Sample 2 (B)

Table 2. Particle size measurement results

Sample 1			Sample 2		
<d10>*	<d50>	<d90>	<d10>	<d50>	<d90>
5.95	30.3	85.1	1.80	4.84	10.5

*<d10>, <d50> and <d90> are percentile values that indicate the size below which 10%, 50% or 90% of all particles are.

Conclusion. As a result of the investigation, method to obtain fine pazopanib hydrochloride API without using complex grinding was developed. The method provides a microionized-like particle size of pazopanib hydrochloride with a high yield providing the necessary bioavailability and the claimed pharmacological effect.

REFERENCES

1. Pazopanib for the treatment of renal cancer / B. Rini [et al.] // Expert Opin Pharmacother. – 2011. – Vol. 17. – P. 1171-1189.
2. Pazopanib film-coated tablet 200 mg and 400 mg product-specific bioequivalence guidance. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/pazopanib-film-coated-tablet-200-mg-400-mg-product-specific-bioequivalence-guidance_en.pdf.
3. Powder X-ray diffraction of pazopanib hydrochloride / J. Kaduk [et al.] // J. Cambridge University Press. – 2021. – Vol. 36. – P. 205-207.
4. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus II, 2.9.33.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ, В ФАРМАЦЕВТИКЕ, ЛЕЧЕБНОЙ КОСМЕТИКЕ И ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Соколова С.В., Шамцян А.М.

Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет), Санкт-Петербург, 198013, Московский проспект, 26,
rsokolova@rambler.ru

Грибы являются источником большого количества разнообразных биологически активных соединений. Царство грибов включает в себя по разным оценкам от 100 до 250 тысяч видов, однако, только малая их часть изучена в качестве источника различных ценных веществ. С древнейших времён грибы использовались не только в пищу, но и в лечебных целях. Ещё шаманы эпохи палеолита использовали грибы для исцеления различных болезней. В течение длительного времени человечество накапливало и ассимилировало традиции народной медицины, связанные с грибами. Большинство традиционных знаний о



биологически-активных свойствах грибов пришло к нам из Восточной Азии. Так, китайские фармакопеи хранят информацию о более чем 100 видах грибов, используемых специалистами в области традиционной китайской медицины для широкого круга заболеваний.

В настоящее время уже известны сотни видов грибов, для которых установлены различные терапевтические свойства и которые можно использовать как в производстве фармацевтических препаратов, так и для обогащения пищевых продуктов и придания им функциональных свойств, или в производстве биологически-активных пищевых добавок. Соединения, содержащиеся в грибах, могут обладать не только биологической, но также и высокой поверхностной активностью. Однако, учитывая, что высших грибов насчитывается более 14 000 видов, то можно сказать, что на сегодняшний день изучена лишь малая их толика.

На мировых фармацевтических и продовольственных рынках существует большое количество грибных соединений, представляющих новый класс лекарств, нутрицевтических или функциональных пищевых добавок.

В настоящее время довольно много внимания сосредоточено на различных иммунологических и противоопухолевых свойствах грибов. Использование грибов для лечения различных иммунных расстройств практиковалось ещё в Древнем Китае, однако, исследования иммуностимулирующих свойств грибов было начато только полвека назад.

Исторически сложилось так, что грибы собирали в дикой природе для употребления в пищу и в лечебных целях. И только во второй половине XX века технологии выращивания грибов стали активно развиваться.

Промышленное культивирование грибов в настоящее время налажено во многих странах. Однако, «классический» способ выращивания грибов на твёрдом субстрате в виде плодовых тел имеет ряд существенных недостатков. Процесс выращивания плодовых тел сложно контролировать, субстрат требует серьёзной подготовки, а само культивирование занимает довольно длительное время – до нескольких недель. К тому же, если выращиваемый гриб рассматривается в качестве источника БАВ, возникают сложности при выделении целевого продукта.

Культивирование грибов в объёме жидкой фазы (глубинное культивирование) лишено этих недостатков и позволяет получить грибную биомассу, по своим свойствам не уступающую плодовым телам. Процесс глубинного культивирования относительно короткий по времени, а использование специального оборудования позволяет контролировать процесс и поддерживать условия культивирования на заданном уровне. Нативный раствор культуральной жидкости грибов содержит в себе большое количество биологически-активных веществ и работа с ним значительно облегчает возможность их получения и выделения.

В результате многочисленных исследований *in vitro* и *in vivo* доказаны иммуномодулирующие, противоопухолевые, гипохолестериновые, гиполипидемические, антидиабетические и других свойства различных грибов. Помимо этих эффектов, многие биологически-активные вещества, получаемые из грибов, обладают и другими ценными свойствами, включая антиоксидантные, антигипертензивные, гепатопротекторные, противовоспалительные, противомикробные, противовирусные, и некоторые другие.

Грибы также могут быть источником различных ферментов, полезных в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности, такие как коллагенолитические, для лечения рубцов и ожогов, а также, для использования отходов мясоперерабатывающих производств, фибрино- и тромболитические, для лечения различных тромбозов.

Высшие грибы имеют огромный, хотя и ещё недостаточно изученный потенциал, для применения в фармацевтической и пищевой промышленности.



POSSIBILITIES OF USING BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS OBTAINED FROM HIGHER MUSHROOMS IN PHARMACEUTICALS, MEDICAL COSMETICS AND FOR CREATING FUNCTIONAL FOOD PRODUCTS

Sokolova S.V., Shamtsyan A.M.

St. Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, 198013, Moskovsky prospect, 26, rsokolova@rambler.ru

Mushrooms are a source of a wide variety of biologically active compounds. The kingdom of fungi includes, according to various estimates, from 100 to 250 thousand species, however, only a small part of them has been studied as a source of various valuable substances. Since ancient times, mushrooms have been used not only for food, but also for medicinal purposes.

Hundreds of species of mushrooms are already known, for which various therapeutic properties have been established and which can be used both in the production of pharmaceuticals, and for enriching food products and imparting functional properties to them, or in the production of biologically active food additives.

As a result of numerous studies in vitro and in vivo, immunomodulatory, antitumor, hypocholesterol, hypolipidemic, antidiabetic and other properties of various mushrooms have been proven. In addition to these effects, many biologically active substances derived from mushrooms have other valuable properties, including antioxidant, antihypertensive, hepatoprotective, anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral, and some others. Mushrooms can also be a source of various enzymes useful in the food, cosmetic and pharmaceutical industries, such as collagenolytic, for the treatment of scars and burns, as well as for the use of meat processing waste, fibrino- and thrombolytic, for the treatment of various thromboembolism.

Higher fungi have a huge, although not yet well understood, potential for use in the pharmaceutical and food industries.

ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАЗИДИОМИЦЕТОВ

COPRINUS LAGOPIDES И FUNALIA TROGII

Сорокин С.С., Колесников Б.А., Шамцян М.М.

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, 198013, Московский проспект, 26, mark.shamtsyan@yandex.ru

В настоящее время широкое распространение сердечно-сосудистых заболеваний становится причиной смертности и инвалидности во многих странах мира. Такие заболевания часто сопровождаются тромбоэмболическими осложнениями, представляющими опасность для здоровья человека. По данным Всемирной организации здравоохранения, ишемическая болезнь сердца и инсульт были наиболее частыми причинами смерти в 2015 году. На протяжении последних 15 лет сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущими причинами смертности в мире. В связи с этим одной из важнейших задач современной биотехнологии и медицины является увеличение альтернативных источников антитромботических средств, поиск новых биологически активных соединений и производство препаратов, растворяющих тромбы, препятствующих их образованию, а также позволяющих быстро и точно диагностировать нарушения системы гемостаза человека.

Фибринолитические ферменты, представляющие собой важнейшую категорию протеолитической группы ферментов, имеют большое медицинское значение. В 60-х годах исследователи обратили внимание на грибофибринолитические ферменты, которые можно было бы использовать для консервативного лечения тромбоэмболических и других заболеваний, связанных со свертываемостью крови.



Протеолитические ферменты некоторых базидиомицетов могут представлять интерес как фибринолитические и тромболитические средства. Это протеиназы из *Flammulina velutipes*, *Coprinus domesticus*, *C. Cinereus*, *Cerrena unicolor*. Высокая протеолитическая активность обнаружена у ферментов *Pleurotus ostreatus*, *Armillaria mellea*, *Panus tigrinus*, *Lyophyllum ulmarium* и др.

В связи с этим возникает задача разработки препаратов на основе фибрино- и тромболитических ферментов и совершенствования методов их получения. Это направление достаточно перспективно, и может дать толчок к разработке препаратов на основе ферментов базидиомицетов. Поэтому исследования по этой теме представляют особый интерес и практическое значение. Образцы базидиомицетов *Coprinus lagopides* и *Funalia trogii* были взяты из музея культур микроорганизмов кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института.

Культивирование проводили при 28°C на глюкозо-пептонной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 10, пептон – 2,5, NaCl – 0,5, K₂HPO₄ – 0,6, K₂HPO₄ – 0,4, MgSO₄ – 0,5, CaCl₂ – 0,05, дрожжевой экстракт – 2. После культивирования культуральную жидкость отделяли от биомассы фильтрованием через бумажный фильтр. Затем фильтрат подвергали ультрафильтрации. Мы использовали ультрафильтрационную ячейку непроточного типа марки «ФК 01 – 1000» объемом 200 мл, а также ультрафильтрационную мембрану «МИФИЛ ПА – 20».

Определение фибринолитической активности проводили с использованием набора реактивов для определения количества плазминогена ХромоТех-Плазминоген. Количественное определение белка, образующегося при культивировании, проводили по методу Лоури. Активность полученных экстрактов культуральной жидкости грибов сравнивали с активностью коммерческого тромболитического препарата «Актилизе» – альтеплазы – одноцепочечного рекомбинантного тканевого активатора плазминогена. Результаты сравнения удельной фибринолитической активности с коммерческим препаратом представлены в таблице.

Таблица. Удельная фибринолитическая активность испытуемых растворов

Испытуемый раствор	Удельная фибринолитическая активность, Ед/мг
Ультрафильтрат нативного раствора культуры <i>C. lagopides</i>	62,5 ± 1,4
Ультрафильтрат нативного раствора культуры <i>F. trogii</i>	89,3 ± 1,5
Препарат Актилизе (Boeringer Ingelheim, Германия)	33,9 ± 1,2

В результате нашей работы было показано наличие фибринолитической активности у таких сапрофитных базидиомицетов, как *Funalia trogii* и *Coprinus lagopides*. При сравнении с коммерческим фибринолитическим препаратом «Актилизе» установлено, что фибринолитическая активность культуральных жидкостей исследуемых грибов почти в два раза выше, чем у коммерческого препарата. Такая высокая активность может быть обусловлена неселективным действием препаратов в отношении фибрина, в отличие от селективного в отношении фибрина действия альтеплазы, являющейся активным компонентом Актилизе.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-00785.



FIBRINOLITIC PROPERTIES OF BASIDIOMYCETES *COPRINUS LAGOPIDES* AND *FUNALIA TROGII*

Sorokin S.S., Kolesnikov B.A., Shamtsyan M.M.

St. Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, 198013, Moskovsky prospect, 26,
mark.shamtsyan@yandex.ru

At present, the widespread occurrence of cardiovascular diseases causes death and disability in many countries of the world. Such diseases are often accompanied by thromboembolic complications that pose a danger to human health.

The proteolytic enzymes of some basidiomycetes may be of interest as fibrinolytic and thrombolytic agents. In this regard, the problem arises of developing preparations based on fibrinolytic and thrombolytic enzymes and improving methods for their preparation. This direction is quite promising and can give impetus to the development of drugs based on basidiomycete enzymes.

As a result of our work, the presence of fibrinolytic activity was shown in such saprophytic basidiomycetes as *Funalia trogii* and *Coprinus lagopides*.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ВИТАМИНА В₁, ПОЛУЧЕННЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕРОКСИДАЗ РАСТЕНИЙ

Степура И.И.¹, Агейко С.А.¹, Степура В.И.²

¹Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, бульвар
Ленинского комсомола, 50, г. Гродно, 230030, Республика Беларусь, scepura@gmail.com

²Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, ул. Ожешко, 22,
г. Гродно, 230023, Республика Беларусь, stsiapura@gmail.com

Резюме. Показано, что после инкубации тиамин (Т) с пероксидом водорода и с водными экстрактами, например, редиса, дайкона, хрена, имбиря, чеснока наблюдается окисление Т в тиохром (TChr) и оксидигидротиохром (ODTChr), а также происходит образование дисульфида тиамин (TSST). В присутствии парацетамола (РА), тирозина (Тур) и других монофенолов выход TChr возрастает, а концентрация образовавшихся соответствующих димеров фенола снижается.

Концентрацию TChr определяли спектрально-флуоресцентным методом, концентрацию ODTChr и (TSST) – методом ВЭЖХ. TChr, ODTChr обладают антиоксидантными свойствами, эффективно окисляются синглетным кислородом, гипохлорной кислотой, гидроксильными радикалами, генерируемые в реакции Фентона, а также при взаимодействии гипохлорной кислоты с супероксиданионом. Мы предполагаем, что использование метаболитов и окисленных форм производных Т, полученных под действием пероксидаз растений на Т, может явиться важным фактором нейтрализации последствий окислительного стресса, а также в профилактике образования катаракты, вызываемой неблагоприятными факторами внешней среды (ультрафиолет, ионизирующее излучение).

Введение. Тиаминдифосфат (ТРР) является кофактором таких важнейших ферментов энергетического метаболизма как пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа. Под действием пируватдегидрогеназы происходит окислительное декарбоксилирование пирувата, который образуется из глюкозы в цикле Эмбдена-Меерхофа. ТРР также является кофактором транскетолазы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла.

Хорошо известно, что снижение уровня Т снижает активность тиаминзависимых ферментов, нарушает метаболизм углеводов в мозге, в сердечно-сосудистой системе. Следствием дефицита Т является развитие неврологических заболеваний, таких как бери-бери, синдром Корсакова-Вернике. В последнее время в научной литературе появилось много

сообщений о благоприятном действии свободного нефосфорилированного Т на организм при различных заболеваниях.

Цель работы. Изучить возможность использования пероксидаз растений для окислительной трансформации Т в продукты, обладающие антиоксидантной активностью (TChr, ODTChr, TSST), с целью разработки биологически активных добавок и лекарств, способных к нейтрализации последствий окислительного стресса, а также в профилактике образования катаракты, вызываемой неблагоприятными факторами внешней среды (ультрафиолет, ионизирующее излучение).

Методы исследования. В работе использовали TSST, TPSST, фирмы Fluka (США), а также Т и TChr фирмы Sigma (США). Разделение продуктов трансформации Т, образовавшихся после воздействия ультрафиолета на его водные растворы, проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent-1100 с колонкой ZORBAX-Extend-C18, с использованием соединений стандартов (TChr и ODTChr, TSST – $R_t=23,16$ мин $R_t=27,52$ мин и $R_t=36,38$ мин соответственно), а идентификацию проводили методами абсорбционной спектроскопии на спектрофотометре Cary-100 (США). Измерения флуоресценции проводили, используя спектрофлуориметр Solar CM2203 (Беларусь). Измерения пероксидазной активности проводили в водных экстрактах с использованием гваякола и TChr в качестве субстратов. Активность выражали в единицах Е (мкМ/мин/г сырья). Концентрацию гемсодержащего белка определяли, используя коэффициент молярной экстинкции, равным $100\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ на длине волны 400 нм.

Результаты. Показано, что в присутствии пероксидазы хрена, редиса, имбиря, а также ряда других пероксидаз растений первоначально наблюдается окисление Т в TChr, который обладает интенсивным, поглощением в области 300-400 нм с максимумом 365 нм. TChr обладает также интенсивной флуоресценцией с максимумом при 450 нм при возбуждении длиной волны 365 нм. Однако выход флуоресцирующих продуктов окисления Т был низок. Для получения большего выхода продуктов окисления Т использовали высокие концентрации пероксида водорода, а также в раствор добавляли монофенолы. В присутствии монофенолов выход продуктов окисления Т возрастал в 10-20 раз.

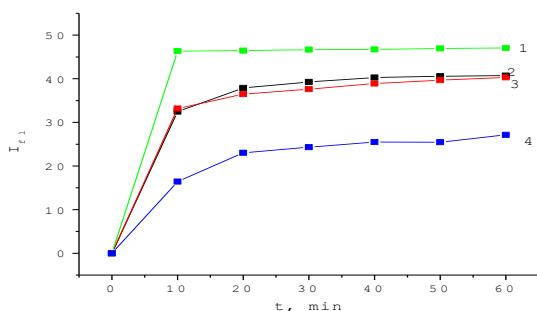


Рисунок 1. Изменение интенсивности флуоресценции TChr в зависимости от времени инкубации смесей: 1 – 0,5 мл экстракта дайкона+Т + РА + H₂O₂, 2 – 0,5 мл экстракта редиса+Т+РА+H₂O₂, 3 – 0,5 мл экстракта хрена +Т+РА+ H₂O₂, 4 – 0,5 мл экстракта чеснока +Т+ РА+H₂O₂. Концентрация Т, пероксида водорода 1,0 мМ, концентрация РА 0,1 мМ.

Как видно из результатов, представленных на рисунке 1, основная масса продукта, обладающего флуоресценцией образуется в первые 10 минут. Затем наблюдается ингибирование скорости реакции и в растворе устанавливается фактически стационарное состояние. Это позволяет предположить, что в растворе происходит дальнейшее окисление TChr.

После инкубации пероксидазы хрена в смеси с Т и пероксидом водорода в течение нескольких часов в растворе происходит полное расходование пероксида водорода и максимум поглощения продуктов окисления Т смещается в коротковолновую сторону до 340 нм. Как известно, максимум поглощения ODTChr лежит при 340 нм. Поэтому можно предположить, что первоначально Т окисляется пероксидазой хрена с образованием TChr, который затем окисляется пероксидазой хрена до ODTChr. Результаты, полученные спектрально-флуоресцентными методами, также подтверждаются данными полученными методами ВЭЖХ с использованием соединений стандартов (тиохром, оксодигидротиохром и

дисульфид тиамин). На рисунке 2 представлена хроматограмма водных растворов Т после инкубации в смеси с экстрактом корня хрена, РА и пероксидом водорода.

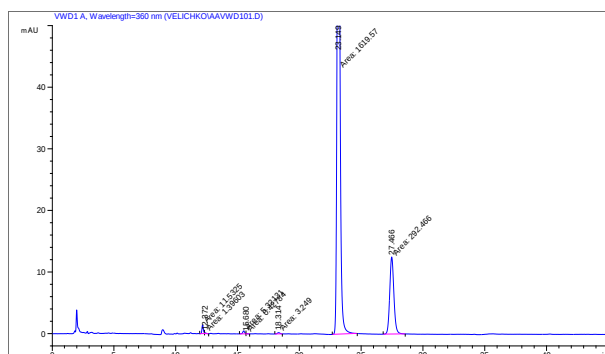


Рисунок 2. Хроматограмма водных растворов Т в смеси с экстрактом корня хрена, РА и пероксидом водорода, полученная на Agilent-1100. Пик TChr Rt=23,149 мин, пик ODTChr Rt=27,466. Концентрация Т и пероксида водорода 1,0 мМ, концентрация РА 0,1 мМ. Время инкубации растворов 4 часа. Регистрацию оптической плотности пиков выхода продуктов окисления тиамин, проводили на волне 360 нм.

TChr, ODTChr обладают антиоксидантными свойствами, эффективно окисляются синглетным кислородом, гипохлорной кислотой, гидроксильными радикалами, генерируемые в реакции Фентона. TChr под действием синглетного кислорода, генерируемого рибофлавином (RF), окисляется с образованием ODTChr. Азид натрия, который является тушителем синглетного кислорода, а также ловушки синглетного кислорода (His, Met) ингибируют фотосенсибилизированное RF окисление TChr в ODTChr [3]. Т, тиаминзависимые ферменты играют важную роль в защите роговицы и хрусталика глаза. Поэтому разрушение ультрафиолетом UVB диапазона молекул Т и особенно TPP [4], который является кофактором тиаминзависимых ферментов, вызывает их инактивацию и, вероятно, способствует развитию дегенеративных процессов в клеточных структурах глаза.

Ультрафиолетовое излучение UVA диапазона вызывает освобождение Т (без его разрушения) из физиологического депо, состоящего из TSST и смешанных дисульфидов тиамин с алифатическими тиолами. Эти фотохимические реакции, вероятно, важны для доставки молекул Т и их замены вместо разрушенных, в местах подвергнутых действию ультрафиолетового излучения UVB диапазона.

Заключение. Изучена пероксидазная активность экстрактов корней хрена, имбиря, редиса и других источников растительного сырья с использованием Т и ТРР в качестве субстратов. В присутствии РА, Тут, и других монофенолов выход TChr и TChr-PP возрастает, а концентрация образовавшихся димеров фенола снижается. Эти результаты свидетельствуют о сопряжении реакции окисления фенолов с реакцией окисления Т в TChr. Показано, спектрально-флуоресцентными методами, что в водном растворе Т при добавлении экстрактов растений окисляется пероксидазами в TChr и ODTChr, а тиольная форма Т трансформируется в TSST.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oxidized thiamine derivatives / Stepuro I.I., Stepuro V.I. // LAP LAMBERT Academic Publishing. – 2014. – 280 p.
2. Фотосенсибилизированное рибофлавином окисление тиаминa в водных растворах при воздействии ультрафиолета и видимого излучения / И.И. Степура [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 199-211.
3. Действие ультрафиолетового излучения на дисульфиды тиаминa / С.А. Агейко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 1. – С. 70-86.



ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THIAMINE OXIDATIVE TRANSFORMATION PRODUCTS OBTAINED BY THE ACTION OF PLANT PEROXIDASES

Stepuro I.I.¹, Aheika S.A.¹, Stepuro V.I.²

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus, bulvar Leninskogo Komsomola ,50, Grodno, 230030, Republic of Belarus, scepura@gmail.com*

²*Yanka Kupala State University of Grodno, ul.Ozheshko, 22, Grodno, 23023, Republic of Belarus, stsiapura@gmail.com*

It was shown that the incubation of thiamine with hydrogen peroxide and aqueous extracts such as those of radish, oriental radish, horse radish, ginger and garlic caused oxidation of thiamine to thiochrome and oxodihydrothiochrome as well as production of thiamine disulfide. In the presence of paracetamol, tyrosine and other monophenols, the yield of thiochrome increased, whereas the concentration of the corresponding phenol dimers decreased. The concentration of thiochrome was determined by a fluorescence spectral method, whereas those of oxodihydrothiochrome and thiamine disulfide were measured by HPLC. Thiochrome and oxodihydrothiochrome possess antioxidant properties and are effectively oxidized by singlet oxygen, hypochlorous acid and hydroxyl radicals generated in the Fenton reaction as well as on the interaction of hypochlorous acid with the superoxide anion. We suggest that the use of the metabolites and the oxidized forms of derivatives of thiamine produced by the action of plant peroxidases on thiamine may be an important factor in neutralization of oxidative stress consequences as well as in prevention of cataract caused by adverse environmental factors (ultraviolet, ionizing radiation).

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АЛЛОХОЛА, ФЕНИБУТА, КАПТОПРИЛА, БРОМГЕКСИНА ГИДРОХЛОРИДА, АМИАДАРОНА ГИДРОХЛОРИДА, ГЛИБЕНКЛАМИДА В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Стрелец Е.А., Фенько Л.А., Леончикова Е.Г., Семашко И.В., Вершинина Г.А., Хилько Е.Б.

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр ЛОТИОС»,

Республика Беларусь, 220034, г. Минск, ул. 3. Бядули, 10; lotios@yandex.ru

Введение. Промышленный прогресс – явление, безусловно, благоприятное в экономическом и социальном плане. Однако очевидно и другое: широкое использование химических веществ в производственной среде и быту связано с риском для человека. Значительная часть химических соединений является ксенобиотиками – чужеродными веществами для биологических структур и объектов, которые, находясь в окружающей среде даже в количестве, не вызывающем выраженных токсических эффектов, оказывают хроническое действие, приводящее к дезадаптации организма, в первую очередь у людей с повышенной чувствительностью.

Современные представления о гигиеническом регламентировании содержания вредных веществ в окружающей среде базируются на принципиальных положениях о том, что их воздействие на человека не должно вызывать даже временных нарушений гомеостаза (включая репродуктивную функцию), а также напряжения защитных и адаптационных механизмов ни в ближайшей, ни в отдаленной перспективе.

Производство лекарственных препаратов (ЛП) в современных условиях требует всестороннего исследования возможного неблагоприятного влияния на организм работающих активных фармацевтических субстанций (АФС), оценки реальной опасности с обязательным установлением их предельных уровней воздействия: предельно допустимых концентраций (ПДК), ориентировочного безопасного уровня воздействия (ОБУВ), что обеспечивает безопасные условия труда и проживания человека. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать ПДК [1], используемых при проектировании



производственных зданий, технологических процессов, оборудования, систем вентиляции, для контроля за качеством производственной среды и профилактики неблагоприятного воздействия на здоровье работающих. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны подлежит систематическому контролю для предупреждения возможности превышения предельно допустимых концентраций, с целью чего постоянно осуществляется разработка адекватных методик измерения (МИ) их концентрации.

В соответствии с потребностями фармацевтических предприятий Республики Беларусь в рамках выполнения задания подпрограммы 2 Государственной научно-технической программы «Разработка фармацевтических субстанций, лекарственных средств и нормативно-правового обеспечения фармацевтической отрасли», 2021-2025 годы (далее – ГНТП 2021-2025) аналитической лабораторией государственного предприятия «НПЦ ЛОТИОС» были разработаны МИ ряда АФС в воздухе рабочей зоны.

Цель исследования. Разработать МИ массовой концентрации АФС аллахол (ПДК=0,10 мг/м³, класс опасности – 2), фенибут (ПДК=1,00 мг/м³, класс опасности – 2), каптоприл (ПДК=0,020 мг/м³, класс опасности – 1), бромгексина гидрохлорида (ПДК=1,00 мг/м³, класс опасности – 2), амиадарона гидрохлорида (ПДК=0,20 мг/м³, класс опасности – 2), глибенкламида (ОБУВ=0,010 мг/м³, класс опасности – 1) в воздухе рабочей зоны, удовлетворяющие установленным критериям.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись образцы фармацевтических субстанций, предоставленных производителями (РУП «Белмедпрепараты», ОАО «БЗМП»). Метод анализа – адсорбционная спектрофотометрия. Исследования выполнены на спектрофотометре СФ-2000 с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 10 мм.

Методология исследования включала следующие операции: отбор проб воздуха на фильтр с последующей экстракцией определяемого вещества, подготовка образцов для последующих манипуляций, измерение оптических плотностей растворов, расчет концентрации субстанции в воздухе рабочей зоны.

В качестве образцов для исследования рабочих характеристик МИ использованы:

- 1) градуировочные растворы с различной массовой концентрацией анализируемых веществ;
- 2) пробы воздуха, отобранные при распылении субстанций, для оценки показателей прецизионности;
- 3) модельные пробы, полученные при нанесении на фильтры раствора точной массовой концентрации анализируемых веществ и продувкой соответствующим объемом чистого воздуха, имитирующей процедуру отбора проб, для оценки показателя правильности;
- 4) растворы плацебо и растворы активного вещества в растворе плацебо, для подтверждения избирательности.

Результаты. Для разработанных МИ установлены следующие рабочие характеристики:

- 1) МИ «Массовая концентрация аллохола в воздухе рабочей зоны».

Диапазон определяемых массовых концентраций аллохола по сумме массовых концентраций желчных кислот в пересчете на холевую кислоту: от 0,05 до 0,30 мг/м³.

Линейность подтверждена в диапазоне градуировки от 10,0 до 60,0 мкг/см³.

Предел обнаружения – 0,02 мг/м³ при отборе 1000 дм³ воздуха.

Предел количественного обнаружения – 0,05 мг/м³ при отборе 1000 дм³ воздуха.

Методика является избирательной, устойчивой.

- 2) МИ «Массовая концентрация фенибута в воздухе рабочей зоны».

Диапазон определяемых массовых концентраций: от 0,50 до 10,00 мг/м³.

Линейность подтверждена в диапазоне градуировки от 25,0 до 500,0 мкг/см³.

Предел обнаружения – 0,05 мг/м³ при отборе 500 дм³ воздуха.

Предел количественного обнаружения – 0,16 мг/м³ при отборе 500 дм³ воздуха.



Методика является избирательной, устойчивой.

3) МИ «Массовая концентрация каптоприла в воздухе рабочей зоны»

Диапазон определяемых массовых концентраций: от 0,01 до 0,32 мг/м³.

Линейность подтверждена в диапазоне градуировки от 1,0 до 16,0 мкг/см³.

Предел обнаружения – 0,003 мг/м³ при отборе 500 дм³ воздуха.

Предел количественного обнаружения – 0,010 мг/м³ при отборе 500 дм³ воздуха.

Методика является избирательной, устойчивой.

4) МИ «Массовая концентрация бромгексина гидрохлорида в воздухе рабочей зоны»

Диапазон определяемых массовых концентраций: от 0,50 до 16,00 мг/м³.

Предел обнаружения – 0,63 мкг/см³.

Предел количественного определения – 0,10 мг/дм³ при отборе 200 дм³ воздуха.

Методика является избирательной, устойчивой.

5) МИ «Массовая концентрация амиодарона гидрохлорида в воздухе рабочей зоны»

Диапазон определяемых массовых концентраций: от 0,10 до 3,00 мг/м³.

Предел обнаружения – 0,017 мкг/см³.

Предел количественного определения – 0,053 мкг/см³.

Методика является избирательной, устойчивой.

6) МИ «Массовая концентрация глибенкламида в воздухе рабочей зоны»

Диапазон определяемых массовых концентраций: от 0,005 мг/м³ до 0,100 мг/м³.

Линейность подтверждена в диапазоне градуировки от 0,5 до 10,0 мкг/см³.

Предел обнаружения – 0,0002 мг/м³ при отборе 500 дм³ воздуха.

Предел количественного обнаружения – 0,0005 мг/м³ при отборе 500 дм³ воздуха.

Методика является избирательной, устойчивой.

Заключение. В рамках выполнения задания ГНТП 2021-2025 был научно обоснован выбор методов количественного определения фенибута, глибенкламида, аллохола (сумма желчных кислот), амиодарона гидрохлорида, бромгексина гидрохлорида, каптоприла, в воздухе рабочей зоны, установлены диапазоны измерения массовых концентраций определяемых веществ, подтверждена линейность градуировочных графиков в диапазоне применения, подтверждена избирательность (сопутствующие вещества при их максимально возможных содержаниях не оказывают значимого влияния на результаты измерений).

Разработанные МИ соответствуют установленным требованиям по показателям «точность», «повторяемость» и «прецизионность». Доказана их устойчивость при незначительных колебаниях параметров окружающей среды, устанавливаемых при проведении измерений и пробоподготовке. Расширенная неопределенность – менее 25% в соответствии с ГОСТ 12.1.005 [2].

МИ метрологически аттестованы, согласованы и утверждены в установленном порядке.

Внедрение МИ в лабораторную практику позволит с высокой степенью достоверности контролировать содержание вышеуказанных фармацевтических субстанций в воздухе рабочей зоны и проводить мероприятия, необходимые для минимизации риска их воздействия на здоровье человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гигиенический норматив «Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны», утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 11.10.2017 г. № 92. – 269 с.
2. ГОСТ 12.1.005 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны». – 52 с.



DEVELOPMENT OF METHODS FOR MEASURING THE MASS CONCENTRATION OF ALLOHOL, PHENIBUT, CAPTOPRIL, BROMHEXINE HYDROCHLORIDE, AMIADARONE HYDROCHLORIDE, GLIBENCLAMIDE IN THE AIR OF THE WORKING AREA BY SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

Strelec E.A., Fenko L.A., Leonchikova E.G., Semashko I.V., Vershinina G.A., Hilko E.B.
*Republican Unitary Enterprise «Scientific and Practical Center LOTIOS», Republic of Belarus,
220034, Minsk, Z. Byaduli str., 10; lotios@yandex.ru*

The analytical laboratory of the state enterprise «SPC LOTIOS» has developed methods for measuring (MM) the concentration of phenibut, glibenclamide, allohol (the sum of bile acids), amiodarone hydrochloride, bromhexine hydrochloride, captopril, in the air of the working area.

The developed MM meet the established requirements in terms of «accuracy», «repeatability» and «precision». Their stability has been proved with insignificant fluctuations in environmental parameters established during measurements and sample preparation. Extended uncertainty – less than 25% in accordance with GOST 12.1.005.

MM was metrologically certified, agreed and approved in the prescribed order.

The introduction of MM into laboratory practice will allow to control with a high degree of reliability the content of the above mentioned pharmaceutical substances in the air of the working zone and to carry out the measures necessary to minimize the risk of their impact on human health.

ВЫБОР ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИДКОГО ЭКСТРАКТА ПОЛЫНИ

Сушинская О.А., Голяк Н.С.

*Белорусский государственный медицинский университет, 220116, Республика Беларусь,
г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, sushinskayaoa@gmail.com*

Резюме. Предложена технология получения жидкого экстракта полыни. Для получения жидкого экстракта использовали метод реперколяции с делением сырья на равные части и метод ускоренной дробной мацерации. Для оценки выхода биологически активных веществ в готовый экстракт проводили количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом. Выход флавоноидов в жидких экстрактах, полученных методом реперколяции, составил $0,142 \pm 0,011\%$, в экстрактах, полученных методом ускоренной дробной мацерации – $0,073 \pm 0,002\%$. По результатам количественного определения оптимальной технологией для получения жидкого экстракта полыни в лабораторных условиях является реперколяция с делением сырья на равные части с законченным циклом.

Актуальность. Большое количество лекарственных растений обладает противовоспалительным действием и могут быть использованы в разработке наружных лекарственных форм. Перспективным противовоспалительным лекарственным растением является полынь горькая (*Artemisia absinthium* L.), терапевтическая активность которой была подтверждена многочисленными исследованиями *in vitro* и *in vivo*. На сегодняшний день экстракционные препараты из полыни горькой травы на рынке Республики Беларусь отсутствуют, в Российской Федерации зарегистрирована настойка полыни горькой для внутреннего применения, поэтому разработка получения экстракционных препаратов из данного вида сырья является перспективным научным направлением [1,2].

Цель работы – выбор оптимальной технологии получения жидкого экстракта травы полыни горькой 1:1.

Материалы и методы. Объектом исследования была выбрана трава полыни горькой производства ООО «Калина» (серия 010720, влажность 10%, радиационный контроль по РДУ/ЛТС-2004). Для получения жидкого экстракта были определены оптимальные условия для проведения экстрагирования. Оптимальной концентрацией спирта этилового для



извлечения комплекса флавоноидов и их гликозидов, эфирных масел из лекарственного растительного сырья является 50-70%, поэтому в качестве экстрагента для получения жидкого экстракта полыни выбран 70% спирт этиловый (ОАО «Бобруйский завод биотехнологий», марка «Экстра М», ТУ ВУ 700068910.014-2005). Степень измельчения сырья определялась согласно общепринятым требованиям к измельчению растительного сырья, так как сырьем полыни горькой является трава, то была выбрана степень измельчения в диапазоне от 1-3 мм. Поскольку полынь горькая относится к сырью, содержащему достаточно большое количество эфирных масел, нами были исключены методы экстрагирования с использованием упаривания. Для получения экстрактов был предложен метод реперколяции как основной и наиболее эффективный способ получения экстракционных препаратов и метод ускоренной дробной мацерации, который позволяет получить экстракты в лабораторных условиях в 3 раза быстрее по сравнению с методами реперколяции. Также был экспериментально определен коэффициент спиртопоглощения с целью дальнейшего его использования при расчетах общего количества необходимого экстрагента [3]. Процесс экстракции методом реперколяции проводился при комнатной температуре. Сырье в сухом виде загружали в равных количествах по 10,0 г в три перколятора. Для максимального истощения сырья в перколяторе экстрагент был разделен на три порции. Свежая порция экстрагента заливалась в первый перколятор в течение первых 3 суток в случае метода реперколяции и 1 дня с перерывами для настаивания в 2 часа для метода ускоренной мацерации. Экстракция во втором и третьем перколяторах проводилась отпусками из первого и второго перколяторов соответственно. Готовое извлечение получали из третьего перколятора. Продолжительность экстракции для метода реперколяции составила 6 дней, для метода мацерации – 2 дня [4]. Общий объем каждой серии жидкого экстракта составил 30,0 мл. Полученные серии экстрактов отстаивали при температуре +8°C 7 суток и фильтровали.

Для оценки выхода биологически активных веществ в готовые экстракты проводили количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом.

Результаты. Проведенными исследованиями установлено, что коэффициент спиртопоглощения для полыни горькой травы составляет 4,4. Результаты количественного определения флавоноидов в пересчете на рутин представлены в таблице 1.

Таблица 1. Количественное определение флавоноидов в жидком экстракте полыни горькой

№ серии	Оптическая плотность, А	Содержание флавоноидов, %
Экстракты, полученные методом реперколяции		
1	0,461	0,136
2	0,444	0,131
3	0,531	0,157
4	0,457	0,135
5	0,512	0,151
Экстракты, полученные методом дробной мацерации		
6	0,244	0,072
7	0,242	0,071
8	0,245	0,074

По результатам эксперимента среднее содержание флавоноидов (в пересчете на рутин) для жидкого экстракта полыни горькой, полученных методом реперколяции составило $0,142 \pm 0,011\%$. Ввиду того, что количественное содержание флавоноидов в жидких экстрактах полыни горькой, полученных методом ускоренной дробной мацерации, меньше в 2 раза и составляет в среднем $0,073 \pm 0,002\%$, то оптимальным способ получения жидкого экстракта



полыни является метод реперколяции. Также можно сделать вывод о возможности оптимизации условий проведения экстрагирования методом ускоренной дробной мацерации для увеличения выхода флавоноидов в извлечение.

Закключение. Предложена технология получения жидкого экстракта полыни горькой травы. Согласно разработанной технологии для его получения необходимы следующие условия: экстрагент – 70% этиловый спирт; соотношение сырья и экстрагента – 1:1; оптимальный метод экстрагирования по количественному выходу флавоноидов – реперколяция с делением сырья на равные части; температура экстракции – комнатная; размеры измельченного сырья – 1-3 мм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Реестр УП Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rceth.by>. – Дата доступа: 26.09.2022.
2. A Pharmacognostic review on *Artemisia absinthium* / J. Ahamad [et al.] // Int. Res. J. Pharm. – 2019. – Vol. 10. – P. 25-31.
3. Технология получения извлечений листьев малины обыкновенной / И. А. Савков, О. М. Хишова // IV Гаммермановские чтения: сборник научных трудов. – Москва: РУСАЙНС, 2018. – С. 313-315.
4. Получение экстракционного препарата противовоспалительного и мочегонного действия из травы Золотарника канадского / Л. Н. Савченко, Т. Ф. Маринина, В. А. Карпенко // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Том 18. – №2 – С. 195-198.

THE CHOICE OF TECHNOLOGY FOR OBTAINING LIQUID WORMWOOD EXTRACT

Sushinskaya O.A., Golyak N.S.

*Belarusian State Medical University, 220116, Republic of Belarus, Minsk, 83 Dzerzhinsky Ave.,
sushinskayaoa@gmail.com*

The technology of obtaining a liquid extract of wormwood is proposed. To obtain a liquid extract, the method of repercolation with the division of herbal raw materials into equal parts and the method of accelerated fractional maceration were used. To assess the yield of biologically active substances in the finished extract, the quantitative determination of the amount of flavonoids in terms of rutin was carried out by the spectrophotometric method. The yield of flavonoids in liquid extracts obtained by the method of repercolation was $0.142 \pm 0.011\%$, in extracts obtained by the method of accelerated fractional maceration – $0.073 \pm 0.002\%$. According to the results of quantitative determination, the optimal technology for obtaining liquid wormwood extract 1:1 in laboratory conditions is repercolation with the division of herbal raw materials into equal parts with a completed cycle.



ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ФЛАВANOИДОВ НА МОДЕЛИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА *IN VIVO*

Тумар Е.М., Огурцова С.Э., Савин А.О., Рубинов Д.Б.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, helentumar@gmail.com

Введение. В настоящее время онкологические заболевания относятся к числу лидирующих по причине смертности населения. Флавоноиды являются перспективными соединениями для создания на их основе противоопухолевых средств благодаря их взаимодействию с различными белками, участвующими в канцерогенезе [1]. Эти соединения проявляют противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo*, действуя на множество различных мишеней в системе клеточной сигнализации (протеинкиназы, ROS, TNF- α , NF κ B, VEGF, TRAIL и др.), могут влиять на пролиферацию и апоптоз, ангиогенез и метастазирование опухолевых клеток [2-4].

Целью настоящего исследования являлось изучение противоопухолевой активности синтетических соединений ряда флавоноидов *in vivo* на модели перевиваемой опухоли асцитной карциномы Эрлиха мышей.

Методы. В Институте биоорганической химии НАН Беларуси проведен синтез новых синтетических соединений ряда флавоноидов. По результатам прескрининга *in vitro* (MTT-тест) на культуре клеток MCF-7 и Hep G2 были отобраны вещества Rub-581, Rub-611, Zel-133-2R и Zel-133-3, проявившие значимую антипролиферативную активность (IC₅₀ – 20-25 мкМ). В опыте использовали инбредных мышей-самцов линии ICR и перевиваемую модель опухолевого роста – асцитную карциному Эрлиха [5]. Соединения Rub-581, Rub-611, Zel-133-2R и Zel-133-3 растворялись в 1% крахмальном геле и вводились внутривентрально ежедневно однократно в течение 5 дней в дозах 250 и 350 мг/кг. Критерием оценки противоопухолевой активности служило торможение роста опухоли (ТРО, %). Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты. Установлены наиболее эффективные дозы – 250 и 350 мг/кг, при которых достигается выраженная противоопухолевая активность. В структуре соединений Rub-581, Rub-611, Zel-133-2R и Zel-133-3 в качестве обязательного компонента имеется мезитиленовый фрагмент, при этом в аналогах флавоноидов (RUB-611, ZEL-133-2R, ZEL-133-3) он представлен заместителем в цикле А, а в соединении (RUB-581) он является циклом В. Соединения с разными заместителями проявили различную активность на представленной модели опухолевого роста (рисунок 1).

Так, соединения RUB-581 (рис. 1,А) и RUB-611 (рис. 1,Б) были максимально эффективны к третьим суткам наблюдения после окончания введения с показателями ТРО 42% и 27%, соответственно, в дозе 350 мг/кг с последующим снижением эффекта к 7, 14 и 21 суткам. Соединение Zel-133-3 проявило максимальную активность к 7 суткам наблюдения (ТРО – 38-42%) без достоверных различий между разными дозами соединения, с последующим резким снижением эффекта к 14 и 21 суткам (рис. 1,Г).

Среди четырех исследованных веществ соединение Zel-133-2R показало наиболее высокую противоопухолевую активность с дозозависимым эффектом, постепенно возрастающим к 21 суткам наблюдения (рис. 1,В). Значения ТРО после внутривентрального пятикратного введения соединения Zel-133-2R в дозе 350 мг/кг составили к 1, 3, 7, 14 и 21 суткам – 32%, 35%, 53%, 61% и 72%, соответственно.

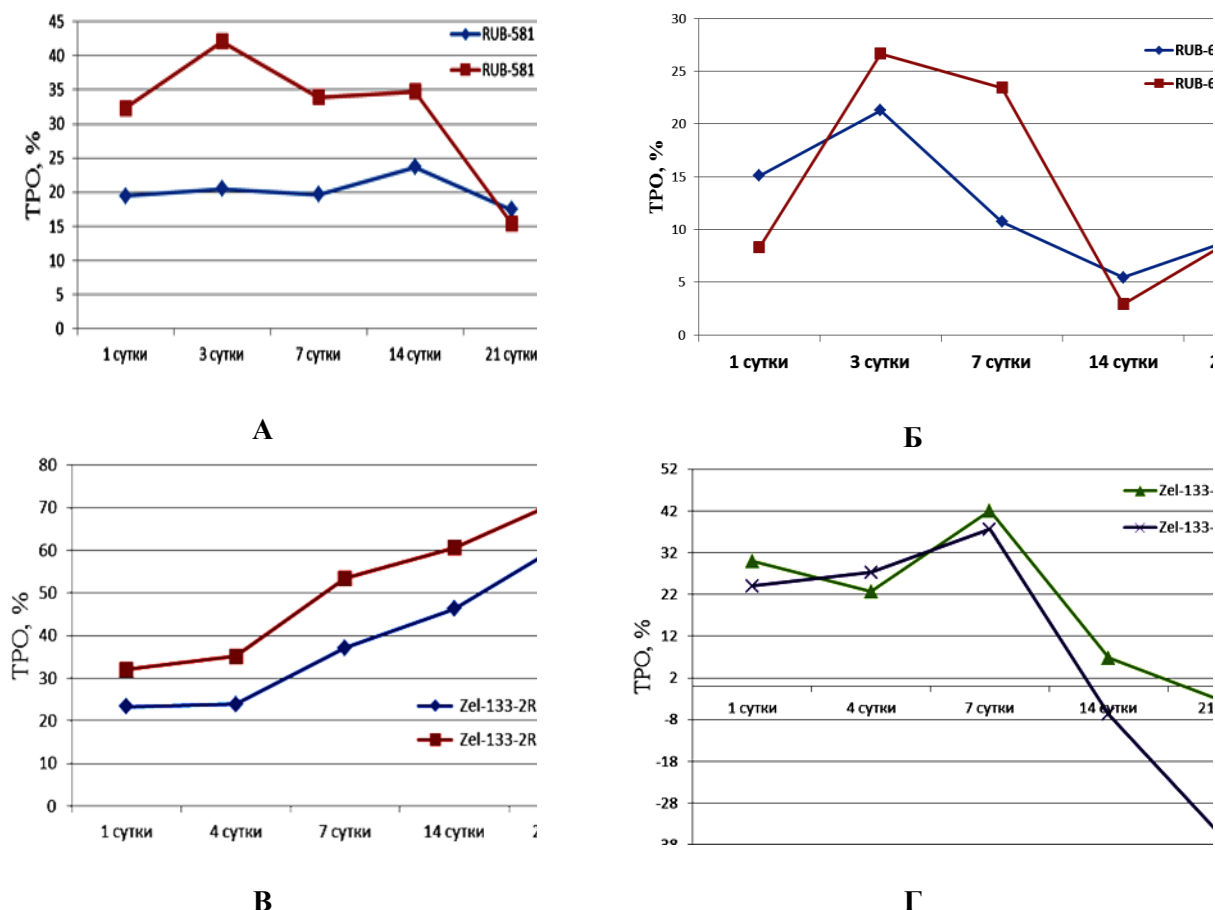


Рисунок 1. Кинетика ТРО у мышей ICR с привитой АКЭ после в/ж введения препаратов RUB-581 (А), RUB-611(Б), Zel-133-2R (В), Zel-133-3 (Г)

Результаты работы позволяют рекомендовать проведение углубленных исследований наиболее перспективного соединения Zel-133-2R с целью создания в дальнейшем на его основе нового противоопухолевого препарата, а также для синтеза на его основе новых соединений с высокой противоопухолевой активностью.

Выводы. Показано, что в опыте *in vivo* все исследованные флавоноиды Rub-581, Rub-611, Zel-133-2R и Zel-133-3 обладают противоопухолевой активностью в отношении асцитной карциномы Эрлиха у мышей. Наибольшая активность была отмечена у соединения Zel-133-2R (ТРО=72%) при ежедневном пероральном введении в течение пяти дней в дозе 350 мг/кг к 21 суткам наблюдения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Противоопухолевая активность флавоноидов / Я.Ф. Зверев // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 181-194.
2. Phytochemicals Targeting VEGF and VEGF-Related Multifactors as Anticancer Therapy /A. Parveen [et al.] // J. Clin. Med. – 2019. – Vol. 8. – P. 350-388.
3. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review / J.M. Al-Khayri [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27(9). – P. 2901-2924.
4. Flavonoids in Cancer and Apoptosis / M. Abotaleb [et al.] // Cancers. – 2018. – Vol. 28(11). – P. 28-67.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева // – 2-е изд., перераб. и доп. – М: Медицина, 2005. – 832 с.



INVESTIGATION OF THE ANTI-TUMOR ACTIVITY OF NEW SYNTHETIC FLAVANOID ANALOGUES IN THE IN VIVO MODEL OF EHRlich'S ASCITE CARCINOMA

Tumar E.M., Ogurtsova S.E., Savin A.O., Rubinov D.B.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, helentumar@gmail.com*

Among the compounds of the flavonoid series, substances with pronounced antitumor activity were identified, which indicates the effectiveness of continuing research in this series.

ИЗУЧЕНИЕ РЕДОКС-АКТИВНОСТИ И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ КОМПЛЕКСОВ RU(III) – ПЕРСПЕКТИВНЫХ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫХ АГЕНТОВ

Тюрин В.Ю., Антоненц А.А., Назаров А.А., Милаева Е.Р.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, г. Москва,
ул. Ленинские горы д.1, стр.3, olivecc@mail.ru*

Введение в клиническую практику цисплатина привело к развитию нового направления в поиске противоопухолевых агентов [1]. Препараты платины успешно применяются в клинике и используются почти в половине всех химиотерапевтических схем. В настоящее время ведутся исследования по поиску новых противоопухолевых металлодержащих соединений, лишенных таких недостатков цисплатина и его аналогов, как низкая избирательность и высокая токсичность, а также наличие первичной или приобретённой резистентности. Одной из основных стратегий поиска новых противоопухолевых соединений металлов является получение комплексов рутения, которые будут обладать селективностью и отличным от платиновых лекарственных средств, механизмом действия. В ряду новых комплексов наиболее перспективными являются соединения Ru(III), два из которых, NAMI-A и KP1019 (KP1339) проходили или проходят клинические испытания [2]. Основное отличие противоопухолевых комплексов рутения от классических соединений платины заключается в отсутствии кросс-резистентности к платиновым препаратам, низкий уровень общей токсичности и белковые молекулярные мишени.

Механизм действия NAMI-A до сих пор до конца не ясен. Существуют две основных гипотезы: первая заключается в связывании с биологическими мишенями, например, с молекулой ДНК по аналогии с соединениями платины; показана также возможность связывания продуктов гидролиза NAMI-A с РНК. Второй подход заключается во внутриклеточном восстановлении до активной формы – комплекса Ru(II), чем и объясняется низкий уровень общей токсичности по сравнению с цисплатином. В связи с этим поиск новых редокс-активных соединений Ru(III) и изучение их способности к восстановлению приобретает особый интерес [3].

В работе изучено электрохимическое поведение шести новых комплексов Ru(III) с редокс-активными лигандами на основе лекарственного препарата Дибуфелона, связанными с рутениевым центром линкерами различной длины. Редокс-поведение комплексов Ru(III) было изучено в CH₃CN на платиновом и стеклоуглеродном электродах. Для большинства комплексов наблюдаются четыре одноэлектронные волны окисления в анодной области потенциалов. Была предложена возможная схема окислительных переходов: первый квазиобратимый пик малой интенсивности в диапазоне потенциалов 0,2 – 0,4 В может быть связан с окислением Ru(II) до Ru(III) в комплексе с изменённым лигандным окружением. Необратимый пик в диапазон потенциалов 1,0 – 1,1 В можно отнести к N-центрированному одноэлектронному окислению амидной группы с образованием соответствующего катион-



радикала. Следующий почти обратимый пик в области потенциалов 1,3 – 1,4 В может быть отнесен к одноэлектронному окислению Ru(III) в Ru(IV). Пик со слабо выраженной обратимостью в области потенциалов 1,7 – 1,9 В соответствует окислению метиленового фрагмента до N-ацильного катиона II. В катодной области потенциалов наблюдались две одноэлектронные волны восстановления. Первый пик в диапазоне потенциалов -0,4 – -0,3 В соответствует восстановлению Ru(III) до Ru(II). Квазиобратимый характер этого пика ($\Delta E = 120-150$ мВ) указывает на изменение геометрии комплексов [4]. На основе значений потенциалов восстановления определены параметры Левера E_L для данных лигандов. Сравнение значений потенциалов синтезированных комплексов с исследованными ранее свидетельствует об увеличении акцепторных свойств лигандов на основе имидазола, модифицированного Дибуфеленом. Таким образом, введение в комплексы подобных лигандов облегчает восстановление Ru(III) до Ru(II), что указывает на перспективность использования комплексов для синтеза противоопухолевых агентов, действующих по принципу «активация путем восстановления».

Одним из современных подходов к увеличению специфичности препаратов в неорганической медицинской химии является создание соединений двойного действия, когда с токсичным фрагментом металла связана биологически активная молекула, которая селективно взаимодействует с молекулярными мишенями и обеспечивает действие на раковую клетку. Данный подход даёт возможность одновременного влияния на несколько молекулярных особенностей злокачественных клеток с целью увеличения биологического ответа и эффективности соединения. В связи с этим были исследованы антиоксидантные свойства комплексов **1-6** с использованием ранее предложенного электрохимического ДФПГ-теста [5]. Данный подход основан на измерении скорости реакции переноса атома водорода на устойчивый радикал 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ), мониторинг которой проводится с использованием электрохимических методов (ЦВА и ВДЭ). На циклической вольтамперограмме (ЦВА) ДФПГ наблюдаются два обратимых пика, соответствующих окислению и восстановлению радикала. Как следует из уравнения Рендлса-Шевчика, при заданных величинах площади поверхности электрода и скорости развертки потенциала отношение значений силы тока в пике окисления и восстановления равно отношению концентраций радикала ДФПГ в различные моменты времени: $I/I_0 = C/C_0$. Это соотношение использовали для количественной оценки антиоксидантной эффективности (АОЕ) в процентах от прореагировавшего DPPH. Рассчитана АОЭ синтезированных соединений, определены соединения-лидеры. Через 24 часа реакции процент прореагировавшего DPPH составил $\geq 98\%$ для всех соединений, что сравнимо с активностью известного антиоксиданта Trolox.

Таким образом, результаты исследований указывают на перспективность дальнейшего исследования биологического действия полученных комплексов в качестве перспективных противоопухолевых соединений, механизм действия которых основан на активации реакцией восстановления атома металла, а также на наличие мультимодального (двойного) действия за счет наличия антиоксидантного фрагмента Дибуфенола в молекуле лиганда.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-03-00471).

ЛИТЕРАТУРА

1. Intrinsic Cisplatin Resistance in Lung and Ovarian Cancer Cells Propagating in Medium Acutely Depleted of Folate / Whiteside M.A. [et al.]. // Nutrition and Cancer. – 2006. – Vol. 54(2). – P. 274-284.
2. Ru(III) Complexes with Lonidamine-Modified Ligands / Shutkov I.A. [et al.] // J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22. – P. 13468.
3. Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs / Reisner E. [et al.] // Inorg. Chim. Acta. – 2008. – Vol. 361. – P. 1569-1583.



4. Tuning of Redox Potentials for the Design of Ruthenium Anticancer Drugs – an Electrochemical Study of $[trans-RuCl_4L(DMSO)]$ and $[trans-RuCl_4L_2]$ Complexes, where L = Imidazole, 1,2,4-Triazole, Indazole / Reisner E. [et al.] // *Inorganic Chemistry*. – 2004. – Vol. 43. – P. 7083-7093.
5. The electrochemical approach to antioxidant activity assay of metal complexes with dipicolylamine ligand, containing 2,6-di-tert-butylphenol groups, based on electrochemical DPPH-test / Tyurin V.Yu [et al.] // *J. Electroanal. Chemistry*. – 2015. – Vol. 756. – P. 212-221.

STUDY OF THE REDOX ACTIVITY AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NEW RU(III) COMPLEXES – PROMISING ANTIPROLIFERATIVE AGENTS

Tyurin V.Yu., Antonets A.A., Nazarov A.A., Milaeva E.R.

*M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, 119991, Moscow,
St. Leninskie Gory 1, building 3, olivecc@mail.ru*

Since the discovery of the antitumour activity of cisplatin, organic complexes with other metals such as ruthenium, gold, osmium, gallium, rhodium, titanium, etc., have been investigated. Ruthenium compounds became the most promising because of their different mode of action and relatively low general toxicity. Modifying the known metal-based drugs by introducing a biologically active molecule is a promising approach in medicinal chemistry to improve cytotoxicity, selectivity, and the twin-drug effect. It is assumed that the mechanism of action of Ru(III) complexes includes a reduction to Ru(II) compounds, which are more labile in substitution reactions and react with specific regions of proteins. In this work the electrochemical behavior of six new Ru(III) complexes with redox-active ligands based on the fragment of Dibufelon drug linked to the ruthenium center was studied. A feasible scheme of oxidative transitions was proposed. Based on the values of the reduction potentials, the Lever parameters EL for these ligands are determined. The antioxidant properties of complexes **1-6** were studied using the previously proposed electrochemical DPPH test. The results of the studies indicate the prospects for further biological investigation of these complexes as promising antitumor compounds, the antiproliferative activity of which is based on reduction of the metal ion, and also possessing multimodal action due to the Dibuphenol antioxidant fragment in the ligand molecule.



РЕКОНСТРУКТИВНАЯ МЕТОДОЛОГИЯ В ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОЙ ХИМИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СРЕДСТВ

Уломский Е.Н.^{1,2}, Русинов В.Л.^{1,2}, Федотов В.В.¹

¹ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 630002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, e.n.ulomsky@urfu.ru

²Институт органического синтеза УрО РАН, 630990, Россия, г. Екатеринбург, ул. С.Ковалевской, 22 / Академическая, 20

Реакции деструкции и трансформации азотистых гетероциклов являются близкими родственниками, но отношение к ним в органическом синтезе разное. Реакции деструкции обычно считаются нежелательными в противоположность «благородным» трансформациям. В докладе показаны возможности практического конструктивного использования реакций деструкции конденсированных полиазотистых гетероциклов – структурных аналогов пуринов. В то же время, органический синтез требует разнообразных подходов к получению важных органических соединений. Одним из подходов является расщепление азотистых гетероциклов для получения важных физиологически активных веществ.



В работе сформулирован принцип «реконструктивной методологии» синтеза гетероциклов. Этот принцип заключается в построении конденсированной полициклической структуры на основе первичного гетероцикла и последующей его деструкции с получением целевого соединения. В докладе будут продемонстрированы примеры получения физиологически активных гетероциклических соединений и показаны преимущества предложенной методологии в сравнении с традиционными синтетическими приемами.

DISCOVERY OF NOVEL ATN1CANCER BENZAMIDE DERIVATIVES: RATIONAL DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Farina A.V., Bozhok T.S., Panibrat O.V., Kalinichenko E.N.

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, farina@iboch.by

The discovery of novel highly effective inhibitors of therapeutically relevant protein kinases as well as managing their selectivity to suppress mutant targets and overcome resistance is still an important scientific challenge [1].

Considering pharmacophore features of approved type-2 protein kinase inhibitors (imatinib, nilotinib, sorafenib, ponatinib etc.) and with the use of computer-aided drug design techniques

(pharmacophore modeling, molecular docking, and molecular dynamics), we purposed 4-methylbenzamide as promising scaffold for the development of novel kinase inhibitors.

Our first series of compounds revealed that introducing 3-(trifluoromethyl)aniline and piperazine to the 4-methylbenzamide linker can be a promising strategy to obtain novel anticancer agents [2] (Figure 1A). To increase anticancer activity of obtained compounds two structure optimization pathways were purposed. First approach was to replace piperazine with purine moiety [3]. This allowed us to obtain novel 2,6-dichloropurine derivatives that are highly potent against acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) (Figure 1B). The second design decision was to use phthalic linker instead of 4-methylbenzamide. Molecular modeling studies expected isophthalic derivatives to be more active against protein kinases if compared to terephthalic linker. Experimental results confirmed these expectations (Figure 1C).

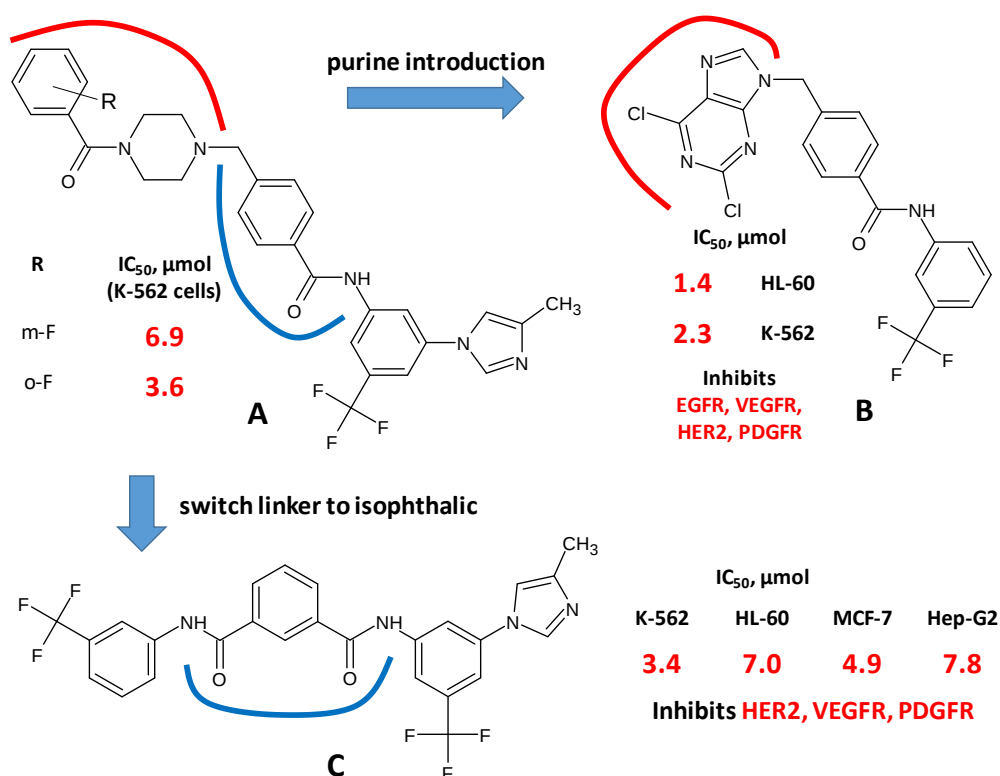


Figure 1. The most active compound from initially designed 4-methylbenzamide derivatives series (A). The most active compound from 2,6-dichloropurine derivatives series (B). The most active compound from the series with isophthalic linker (C)

Methyl 4-formylbenzoate was used as a starting material for purine-containing 4-methylbenzamide derivatives. The general synthetic route involved the conversion of both ester and aldehyde groups to corresponding chlorides. The next step was to, subsequently, replace chlorine atoms with specific amines, which was possible due to higher reactivity of acid halide function (Figure 2A). Phthalic acid derivatives were synthesized from isophthalic and terephthalic acids via corresponding dihalides. In this case, accurate stoichiometric control was needed to ensure good yields (Figures 2B).

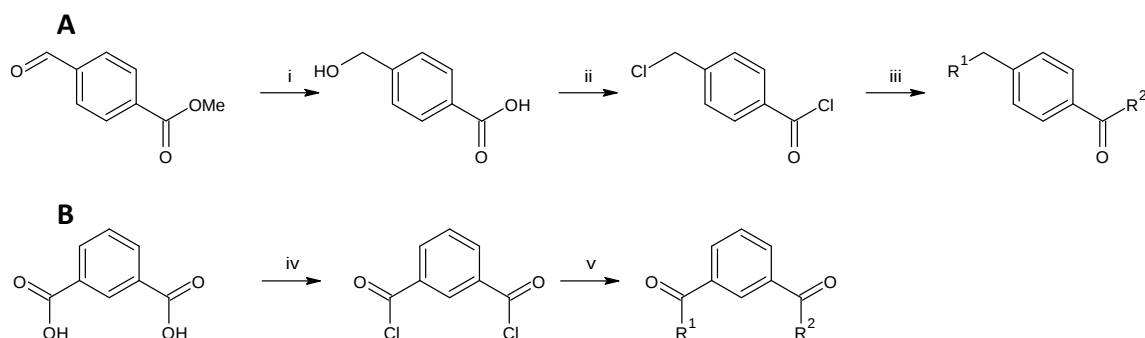


Figure 2. Synthetic approach to target 4-methylbenzamide (**A**) and phthalic (**B**) derivatives. Reagents and conditions: (i) NaBH₄, MeOH, rt, 2 h; KOH, MeOH/H₂O, 60°C, 2 h; (ii) SOCl₂, CHCl₃, reflux, 5 h; (iii) amine R₁H, DMF, CHCl₃, rt; amine R₂H, DMF, K₂CO₃, 80-90°C; (iv) oxalyl chloride, DMF, THF, rt, 3h; (v) THF, Et₃N, R₁H followed by R₂H

The results of ligand-receptor interactions modeling of synthesized 2,6-disubstituted purines and phthalic series with various kinase receptors suggest type-2 (imatinib-like) binding with the formation of h-bonds with the key amino acid residues (Figure 3).

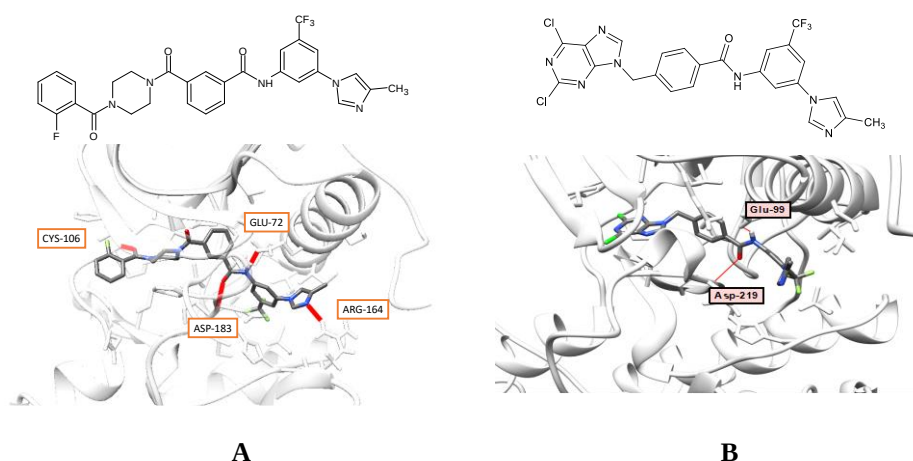


Figure 3. Predicted binding of studied benzamide derivatives to kinase receptors vegfr (A, pdb id: 3WZE) and pdgfr (B, pdb id: 6jol). H-bonds are shown as red lines

REFERENCES

1. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions / P. Cohen, D. Cross, P.A. Jänne // Nat. Rev. Drug Discov. – 2021. – Vol. 20. – P. 551-569.
2. Synthesis, biological activities and docking studies of novel 4-(Arylaminomethyl)benzamide derivatives as potential tyrosine kinase inhibitors / E. Kalinichenko [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – P. 3543.
3. Synthesis, In Vitro and In Silico Anticancer Activity of New 4-Methylbenzamide Derivatives Containing 2,6-Substituted Purines as Potential Protein Kinases Inhibitors / E. Kalinichenko [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22. – P. 12738.



**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ НА ОСНОВЕ
БЕНЗАМИДА: РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ
АКТИВНОСТЬ**

Фарина А.В., Божок Т.С., Панибрат О.В., Калиниченко Е.Н.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,
220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, farina@iboch.by*

Поиск новых ингибиторов протеинкиназ является актуальным направлением исследований в области таргетной терапии рака. С использованием подхода рационального конструирования идентифицированы ранее неизвестные производные 4-метилбензамида, обладающие значительной противоопухолевой активностью. Дальнейшая направленная структурная оптимизация позволила разработать новые производные бензамида путем введения фрагмента 2,6-дихлорпурина или с использованием фталевых линкеров, которые способны блокировать функцию онкозначимых протеинкиназ и ингибировать рост опухолевых клеточных линий.

N1-(3-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL)ISOPHTHALAMIDE DERIVATIVES AS PROTEIN KINASE INHIBITORS: DESING AND DOCKING STUDIES

Farina A.V., Kalinichenko E.N.

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, farina@iboch.by

Since imatinib (approved by the FDA in 2001) revolutionized the treatment of chronic myeloid leukemia, the development of protein kinase inhibitors (PKIs) has become a huge area of scientific investigation. Targeted therapy with PKIs has shown superior effectiveness in the treatment of many cancer diseases. The major limitation of clinical use of PKIs is primary or acquired resistance, the main causes of which are target mutations as well as overexpression of other kinases. The discovery of novel chemical compounds that are able to inhibit kinases as well as managing their selectivity is a major scientific challenge.

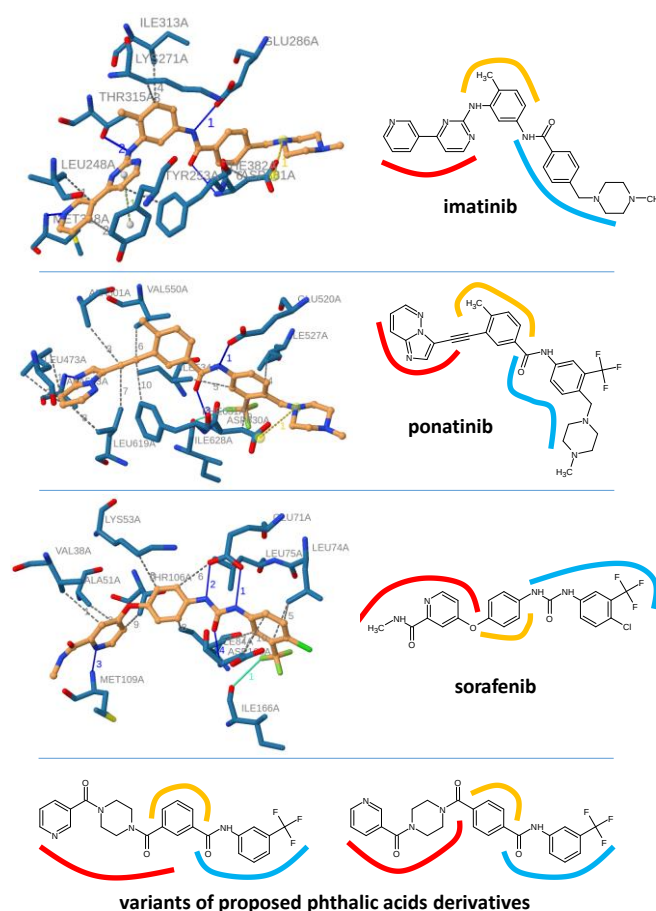


Figure 1. Design approach to the studied structures

amine substituents to phthalic linkers. The threshold of -11.5 kcal/mol was chosen based on previously obtained docking results for approved inhibitors to their targets. Out of 133 poses with docking scores of -11.5 kcal/mol or better, 101 poses corresponded to the structures containing an isophthalic linker, 32 poses belonged to the structures having terephthalic linker. Most frequent amine substituent was 3-trifluoromethylaniline. The most frequent receptors were trk kinase (PDB: 6KZD), abl family (PDB: 3CS9, 2HYY), vegfr family (PDB: 3HNG, 3WZE, 4ASD). All these proteins are essentially receptors of type-2 ligands, which indirectly confirms the correctness of the chosen approach to the design of studied phthalic acids derivatives.

In this study, novel phthalic acid derivatives were designed *de novo* and evaluated as potential kinase inhibitors using molecular docking protocol. The design approach was to attempt to transfer pharmacophore features of known type-2 protein kinase inhibitors to the structure of specific chemical structures containing isophthalic or terephthalic linker (Figure 1).

A total of 28 unique chemical structures were generated (Figure 2). As substituents at carbonyl groups of phthalic linkers we used structural fragments of approved inhibitors: 3-trifluoroaniline (nilotinib, ponatinib, sorafenib), 4-(4-aminophenoxy)-N-methylpyridine-2-carboxamide (sorafenib) as well as some other amines.

Obtained structures were docked against thirty-three cancer-related proteins, which 3d-structures were obtained from PDB. Most of docking receptors were protein kinases of different families. Two receptors were poly(ADP-ribose)-polymerases. Total 926 highest-ranked docking poses were obtained for each ligand-receptor pair.

For docking poses having binding energy -11.5 kcal/mol or higher we studied their distribution by receptor type, linker type and

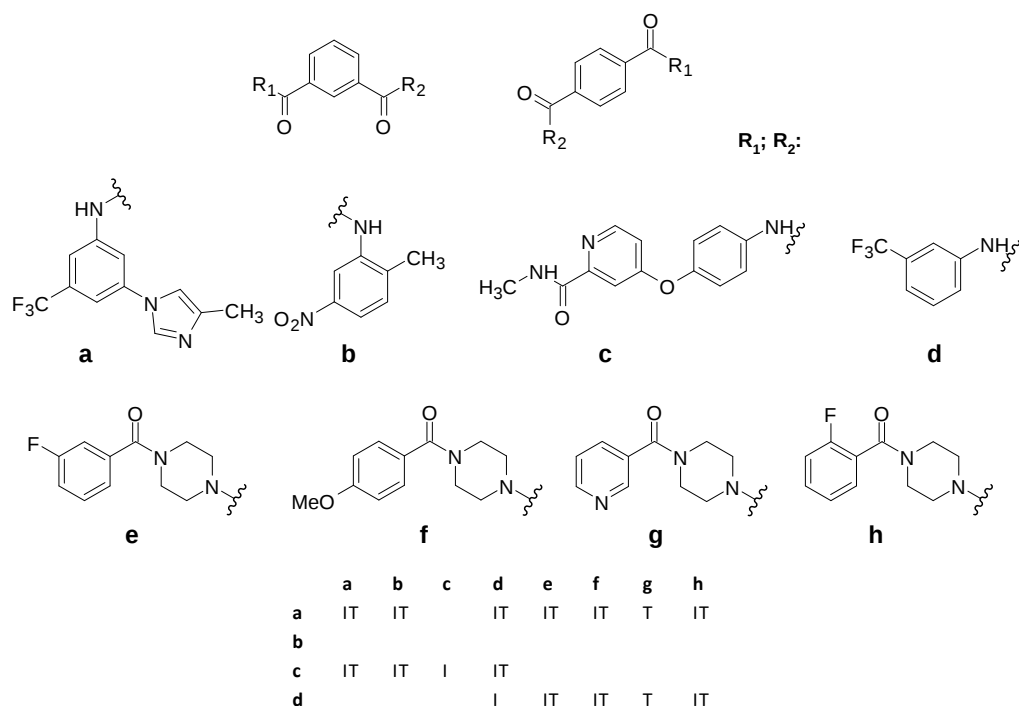


Figure 2. The generation scheme of studied phthalic acids derivatives. Letters **a-h** represent amine substituents. Letters I, T and IT represents what type of linker was used for a structure: isophthalic, terephthalic or both

Docking results favors imatinib-like binding for studied structures to oncogenic protein kinases with the formation of up to four hydrogen bonds (Figure 3). To summarize, the obtained docking results indicate that isophthalic linker, together with the attached 3-trifluoromethylaniline might be a promising structural fragment for the development of novel type-2 protein kinase inhibitors.

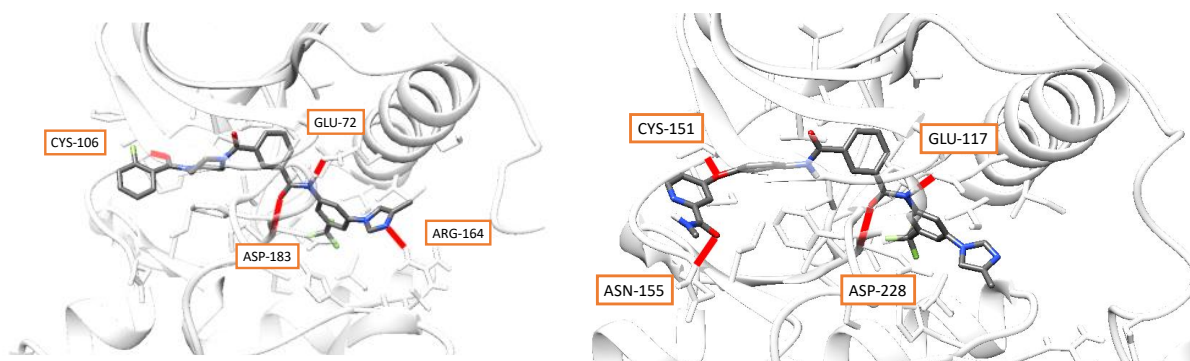


Figure 3. Complexes of studied structures with vegfr kinase. Isophthalic derivative with amines **a,h** is shown on the left (PDB id: 3wze, h-bonds: Cys-106, Asp-183, Glu-72, Arg-164). Isophthalic derivative with amines **a,c** is shown on the right (PDB id: 4asd, h-bonds: Cys-151, Asn-155, Asp-228, Glu-117)

Materials and methods. Qvina 2.1 [2] was used for docking experiments. Chimera was used for receptors and ligands preparation as well as binding models visualization [3].

REFERENCES

1. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions / P. Cohen, D. Cross, P.A. Jänne // Nat. Rev. Drug Discov. – 2021. – Vol. 20(7). – P. 551-569.



2. Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2 / A. Alhossary [et al.] // Bioinformatics. – 2015. – Vol. 31(13). – P. 2214-2216.
3. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis / E.F. Pettersen [et al.] // J. Comput. Chem. – 2004. – Vol. 25(13). – P. 1605-1612.

ПРОИЗВОДНЫЕ N1-(3-(ТРИФТОРМЕТИЛ)ФЕНИЛ)ИЗОФТАЛАМИДА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНКИНАЗ: ДИЗАЙН И ДОКИНГ

Фарина А.В., Калиниченко Е.Н.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, farina@iboch.by

Ингибиторы протеинкиназ составляют важную часть современной таргетной терапии рака. В работе направленным фармакофорным дизайном сконструированы структуры новых производных фталевых кислот как потенциальных ингибиторов протеинкиназ. Проведена оценка противокиназной активности этих структур методом молекулярного докинга. Полученные результаты свидетельствуют, что производные N1-(3-(трифторметил)фенил)изофталамида могут быть основой для разработки новых противоопухолевых агентов.

ПРОЦЕДУРА АТТЕСТАЦИИ УПОЛНОМОЧЕННЫХ ЛИЦ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Хмурович Н.В.¹, Лавник Е.Б.², Суворова И.В.¹, Гапанович В.Н.¹, Довгаль Е.Г.¹, Ситько Т.И.²

¹*РУП «Научно-практический центр ЛОТИОС», Республика Беларусь, 220034, г. Минск, ул. З. Бядули, 10, lotios@yandex.ru*

²*Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Республика Беларусь, 220030, г. Минск, ул. Мясникова, 39, kanc@minzdrav.gov.by*

В соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь, уполномоченным лицом (УЛ) является должностное лицо производителя, на которое возлагается ответственность за качество производимых и выпускаемых в реализацию лекарственных средств (ЛС), гарантирующее, что каждая серия (партия) ЛС произведена и проверена в соответствии с требованиями Надлежащей производственной практики, иными актами законодательства, а также регистрационным досье.

С мая 2021 года в Республике Беларусь начато проведение процедуры аттестации УЛ. Постановлениями Министерства здравоохранения Республики Беларусь (далее – Минздрав) от 18.11.2020 № 103 «О порядке аттестации, формирования и ведения реестров уполномоченных лиц производителей лекарственных средств, фармацевтических инспекторов» (далее – Постановление № 103), и от 25.01.2022 № 5 «Об изменении постановлений Министерства здравоохранения Республики Беларусь», приказами Минздрава от 27.05.2021 № 612 «Об аттестационной комиссии по аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств» и от 24.02.2022 № 238 «О мерах по техническому обеспечению процедуры выдачи свидетельства» за республиканским унитарным предприятием «Научно-практический центр ЛОТИОС» (государственное предприятие «НПЦ ЛОТИОС») закреплена организация проведения аттестации УЛ производителей ЛС Республики Беларусь.

Цель исследования – провести анализ организационно-технических мероприятий в решении процедурных вопросов проведения аттестации УЛ производителей ЛС в Республике Беларусь.

Материалы и методы. В рамках поставленных задач проанализированы этапы проведения аттестации УЛ за период с 2021 г. по сентябрь 2022 г.



Процедура аттестации – это многоступенчатый процесс, который включает ряд организационно-технических мероприятий, которые выполняются силами специалистов государственного предприятия «НПЦ ЛОТИОС»: информационное обеспечение всех процедурных вопросов аттестации (нормативная документация, графики обучения и др.) на сайте www.lotios.by (информация дублируется электронной рассылкой всем заинтересованным); сбор, анализ и регистрация поступающей на аттестацию документации; организация обучения по 12 базовым предметам в учреждениях образования «Белорусский государственный медицинский университет (УО «БГМУ») и «Витебский государственный медицинский университет» (УО «ВГМУ») – анализ потребностей УЛ, оказание консультативной помощи в решении вопросов перезачета дисциплин, формирование групп согласно графика, рассылка направлений УЛ на обучение и др.; организация и проведение профессионального обучения УЛ (в формате семинаров и вебинаров) согласно перечня тем, рекомендованного Минздравом; подготовка материалов на экспертизу, взаимодействие экспертов и заявителей на аттестацию (при наличии вопросов и замечаний), контроль соблюдения сроков экспертизы, получение и регистрация экспертных заключений; проведение организационных работ по созданию базы данных для компьютерного тестирования на базе государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования (ГУО «БелМАПО»)), формирование групп и организация проведения компьютерного тестирования; организация заседаний аттестационной комиссии, подготовка протоколов, аттестационных листов УЛ; подготовка проекта приказа Минздрава об аттестации уполномоченного лица; уведомление УЛ о результатах аттестации, подготовка макета свидетельства и др.

Результаты. Проведен количественный и качественный анализ результатов первого опыта проведения аттестации УЛ производителей ЛС в Республике Беларусь.

За период с 2021 г. по сентябрь 2022 г. на аттестацию заявилось 71 УЛ. Обучение, при отсутствии в базовом высшем образовании, по 12 предметам, указанным в Постановлении № 103, на базах УО «БГМУ» и УО «ВГМУ» прошли 34 человека.

Профессиональное обучение УЛ в формате вебинаров и семинаров проводится отраслевым информационно-методическим центром государственного предприятия «НПЦ ЛОТИОС» согласно «Перечня тем прохождения обучения» при участии отечественных и зарубежных лекторов-тренеров. За период с 2021 г. по сентябрь 2022 г. обучение прошли 32 УЛ.

Тестовый контроль знаний УЛ по разработанной компьютерной программе на базе ГУО «БелМАПО» прошло 29 человек, из них 21 – с результатом выше 90% правильных ответов, в том числе 4 УЛ с 100% результатом (при норме не менее 70% правильных ответов, согласно Постановления № 103).

В настоящее время завершили аттестацию и получили положительное решение на заседании аттестационной комиссии 26 УЛ. По итогам аттестации уполномоченных лиц Минздравом выдается свидетельство об аттестации, формируется реестр уполномоченных лиц на базе ГУ «Госфармаконадзор».

Заключение. Процедура аттестации УЛ имеет большое значение в оценке теоретических и практических навыков соответствующих специалистов, а также доказывает право на осуществление профессиональных обязанностей, связанных с производством ЛС. Аттестации УЛ в Республике Беларусь продолжается, в перспективе планируется разработка компьютерной программы для автоматизации процедуры по полному циклу – от заявки до получения свидетельства, что позволит сократить временные затраты и упростит задачу создания и сопровождения реестра УЛ.



PROCEDURE FOR CERTIFICATION OF AUTHORIZED PERSONS OF MANUFACTURERS MEDICINES IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Hmurovich N.V.¹, Lavnik E.B.², Suvorova I.V.¹, Gapanovich V.N.¹, Dovgal E.G.¹, Sitko T.I.²

¹RUE «Scientific and Practical Center LOTIOS», Republic of Belarus,

220034, Minsk, st. Z. Byaduli, 10; lotios@yandex.ru

²Ministry of Health of the Republic of Belarus, Republic of Belarus, 220030, Minsk,

st. Myasnikova, 39, kanc@minzdrav.gov.by

Since May 2021, the procedure for attestation of authorized persons (AP) of manufacturers of medicines has been launched in the Republic of Belarus. The state enterprise «SPC LOTIOS» was assigned the organization of this procedure. Currently, attestation has completed for 26 AP.

The attestation procedure of the AP is of great importance in assessing the theoretical and practical skills of the relevant specialists, and also proves the right to exercise professional duties related to the production of drugs. Certification of AP in the Republic of Belarus continues, in the future it is planned to develop a computer program to automate the procedure for the full cycle – from the application to the receipt of the certificate, which will reduce time costs and simplify the task of creating and maintaining the register of AP.

ФИЗИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ЭМУЛЬСИОННОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ИНЪЕКЦИОННОГО ВВЕДЕНИЯ

Чехольский А.С., Михальчук А.Л.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,

220084, ул. Академика В.Ф. Купровича, д.5, корп.2, cheholksi@tut.by

Существенным аспектом эффективного лечения является доставка действующего вещества к цели в организме человека. Известным способом доставки является инъекционное введение растворов действующего вещества с помощью шприца или другого устройства. Если действующее вещество мало растворимо в воде, прибегают к созданию эмульсии фармакологически активного вещества или создают липосомы основанные на капсулировании такого вещества в мембраноподобную структуру.

Так эмульсии «масло в воде», содержащие растительные жиры, стабилизированные лецитином, широко используются, например, в качестве компонентов парентерального питания (Lipovenos, Intralipid). При этом основным требованием к эмульсии, предназначенной для парентерального введения, является среднее значение размера частиц эмульсии, не превышающее значение размеров клеток крови [1]. Размеры частицы эмульсии для внутривенного введения не должны превышать значения примерно 5 мкм (микрон), предпочтительно размер частиц должен составлять менее 1-2 микрон для уменьшения риска жировой эмболии капилляров [2,3].

В этой связи целью данной работы являлись изучение влияния физических режимов процесса получения эмульсий, предназначенной для инъекционного введения, для достижения средних значений размеров частиц, не превышающим размеров клеток крови. В качестве прототипа модели исследования по составу жировой эмульсии, выбран первый коммерческий препарат «Intralipid», впервые выпущенный шведской фирмы «Vitrum».

Такой выбор модели обусловлен тем, что наибольший авторитет у клиницистов заслужили те препараты, состав которых был близок составу «Intralipid» или ему полностью соответствовал. Главным компонентом этих эмульсий были растительные масла с жирными кислотами с достаточно длинной цепочкой атомов углерода. В дальнейшем их стали обозначать как LCT-эмульсии (Long Chain Triglycerides).



Были изготовлены три модельных образца жировой эмульсии следующего состава: соевое масло – 100 г, соевый лецитин – 13 г, маннит – 50 г, дистиллированная вода – до 1000 мл.

Все три образца жировой эмульсии на первой стадии процесса моделирования обработаны на роторно-пульсационном аппарате (РПА) – «Magic PLANT» производства фирмы ИКА в течение 2 минут. Затем два образца полученной дисперсии обрабатывали ультразвуком в течение 30 и 50 минут при частоте 44 кГц в ультразвуковой ванне объемом 2 литра.

С целью анализа распределения частиц в образцах эмульсии по размеру, измерения проведены методом лазерного светорассеяния. Для проведения измерения размеров частиц методом лазерного светорассеяния, применялся анализатор LA-960 производства HORIBA, который предназначен для анализа сухих или жидких образцов. Анализатор LA-960 содержит два источника излучения света, систему подачи пробы для контроля взаимодействия падающего света и частиц, матрицу фотодиодов для детектирования рассеянного света, детекторы для регистрации бокового рассеяния и рассеяния назад.

До начала измерений несколько капель образца были предварительно разведены в воде. Так как полученная субстанция была однородной, несколько капель образца были напрямую загружены в резервуар с деионизированной водой для обеспечения оптимальной концентрации образца для анализа.

Каждый образец последовательно измерялся 2 раза для оценки воспроизводимости измерений. После проводилась очистка системы и загружался свежий образец для оценки повторяемости измерений. Таким образом, было поведено 6 измерений для каждого образца

Режимы физического моделирования процесса получения образцов жировой эмульсии приведены в таблице. Процесс состоит из двух стадий, обеспечивающих комплексное гидродинамическое и ультразвуковое воздействие на компоненты модельных образцов эмульсионной композиции.

Таблица.

Образец V0	После диспергирования при 14000 об./мин. без ультразвука
Образец V2	После диспергирования при 14000 об./мин., при 30 минутах воздействия ультразвука
Образец V3	После диспергирования при 14000 об./мин., при 50 минутах воздействия ультразвука

Образец V₀ после гидродинамического воздействия в РПА анализировался дважды. Первое измерение образца проведено три раза. После ячейка была промыта и свежий образец измерен еще три раза. Распределение размеров частиц в модельном образце жировой эмульсии V₀ после первой стадии процесса диспергирования в РПА продемонстрировало воспроизводимость и повторяемость измерений. Распределение размеров частиц широкое и мономодальное, в диапазоне от 0,5 мкм до 6,5 мкм, с центром в точке 2,4 мкм.

Образец V₂ также анализировался дважды. Первое измерение образца проведено три раза. Затем ячейка была промыта и свежий образец измерен три раза. Распределение размеров частиц в модельном образце жировой эмульсии V₂ после второй стадии воздействия ультразвуком в течение 30 минут широкое, сконцентрировано в двух диапазонах.

Первый диапазон характерен для эмульсии, второй – для агрегатов. Наличие второго диапазона является признаком нестабильности эмульсии, вследствие чего размер агрегатов может изменяться с течением времени. Частицы эмульсии распределены в диапазоне от 0,3 мкм до 8,3 мкм, с центром в точке 1,9 мкм.



Образец V_3 анализировался дважды. Первое измерение образца проведено три раза. Далее ячейка была промыта и свежий образец еще измерен три раза. Распределение размеров частиц в модельном образце жировой эмульсии V_3 после второй стадии воздействия ультразвуком в течении 50 мин. Наблюдается воспроизводимость и повторяемость измерений. Распределение размеров частиц широкое и мономодальное, в диапазоне от 0,2 мкм до 3,1 мкм, с центром в точке 0,9 мкм.

Сравнение распределение размеров частиц в модельных образцах жировой эмульсии V_0 , V_2 и V_3 после двух стадий воздействия гидродинамическим диспергированием и ультразвуком в течение 30 и 50 минут показало что, по мере увеличения времени обработки ультразвуком, размер частиц уменьшается. Центр диапазона распределения частиц для образца эмульсии без использования ультразвука – 2,4 мкм, для образца с использованием ультразвука 30 минут – 1,9 мкм, для образца с использованием ультразвука 50 минут – 0,9 мкм. Образец V_2 – единственный образец с наличием второго диапазона распределения частиц, связанного с нестабильностью эмульсии.

В качестве заключения следует отметить, что проведенный анализ позволяет выявить тенденцию уменьшения размера частиц при увеличении времени технологической обработки ультразвуком, а режим обработки образца V_3 является оптимальным. Однородность и стабильность образцов композиции можно контролироваться с помощью анализаторов частиц производства HORIBA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Парентеральное питание с использованием жировых эмульсий, содержащих жирные кислоты со средней длиной молекулы в триглицеридах / Штатнов М.К. // Вестник интенсивной терапии. – 2001. – С. 3-4.
2. The pharmacodynamic effects of a lower-lipid emulsion of propofol: a comparison with the standard propofol emulsion / Song D. [et al.] // Anesthesia and Analgesia. – 2004. – Vol. 98. – P. 687-691.
3. Шанская А.И., Шабалин В.Н., Пучкова С.М. Жировая эмульсия для парентерального питания. – Патент РФ №1285658.

PHYSICAL MODELING OF THE PROCESS OF OBTAINING AN EMULSION COMPOSITION FOR INJECTION

Cheholsky A., Michal'chuk A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, cheholski@tut.by*

A study of the process of obtaining samples of an emulsion composition based on soybean oil was carried out in order to achieve fine-grained sizes of fat particles required for injection. The complex process of dispersion of the emulsion components consisted of two stages and included hydrodynamic dispersion in a rotary pulsating apparatus and ultrasonic processing of the emulsion after the first stage of dispersion to achieve particle sizes commensurate with the shaped elements of blood. The analysis of the distribution of fat particles in the emulsion samples by size was carried out by laser light scattering after each stage of the simulated process of obtaining a pharmaceutical composition. Based on the results of processing the data of particle dispersion measurements, the optimal mode of obtaining a stable emulsion with particle sizes comparable to those of known commercial preparations for parenteral nutrition was determined.

Key words: dispersion; emulsion; fat particles; laser light scattering.



ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА MCF-7 И КАРЦИНОМЫ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА HEP G2 К ДЕЙСТВИЮ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ РЯДА ФЛАВОНОИДОВ

Чукарина Т.В., Прокопович О. А., Огурцова С.Э., Рубинов Д.Б.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, 220084, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, chukagirl@gmail.com

Введение. Несмотря на определенные успехи, достигнутые в области диагностики и лечения онкологических заболеваний, каждый год частота заболеваемости различных форм опухолей увеличивается во всех развитых странах на 2%. В структуре смертности населения Беларуси злокачественные новообразования занимают второе место[1].

В онкологии ведется активный поиск противоопухолевых лекарственных средств, проявляющих высокую специфическую активность и одновременно не имеющих серьезных противопоказаний и побочного действия. Целенаправленное исследование противоопухолевой активности позволит выявить соединения, характеризующиеся высокой избирательной активностью в отношении опухолевых клеток и повышенной эффективностью в лечении онкологических заболеваний. Изучению биологической активности флавоноидов посвящено значительное число исследований. В последние годы опубликованы работы, описывающие синтез новых соединений указанной группы и их производных, а также биологическую активность [2-5].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении цитотоксичности производных флавоноидов на культуре клеток карциномы молочной железы человека MCF-7 и карциномы печени человека HEPG2.

Материалы и методы. В работе использовали 36 образцов 2-ацилциклогексан-1,3-дионов, флавоноидов, изофлавоноидов и азааналогов, которые были синтезированы в лаборатории химии простагландинов ИБОХ НАН Беларуси для испытания цитотоксической активности.

Для анализа использовали МТТ-тест (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega).

Клетки линий MCF-7 (карцинома молочной железы человека) и HEPG2 (карцинома печени человека) культивировали в питательной среде DMEM и MEM соответственно, с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков пенициллина 100 ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл и антимикотика амфотерицина В 25 мкг/мл при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки обеих линий сажали в 96-луночный планшет в концентрации 5×10^3 клеток / лунку и инкубировали 24 часа. На следующий день добавляли тестируемые вещества в концентрациях 0,1, 1,0, 10, 50, 100 мкМ. Исходная концентрация препаратов – 20 мМ, раствор в ДМСО. В контроль добавляли 0,5% ДМСО. После 72 ч культивирования клеток с исследуемыми препаратами в стандартных условиях (см. выше) в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 20 мкл MTS концентрации 5 мг/мл. Через 3 ч экспозиции при 37°C и 5% CO₂ количество восстановленного продукта измеряли фотометрически на планшетном приборе для иммуноферментного анализа (Awareness, Microplate Rider Stat Fax 3200). Пролиферативную активность клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывали по формуле: ОП опытных лунок / ОП контр. лунок $\times$ 100%, где ОП опытных лунок – оптическая плотность образцов с испытуемыми соединениями, ОП контр. лунок – оптическая плотность образцов с растворителем (0,5% ДМСО).

Концентрация препарата, которая вызывает 50% ингибирование пролиферации клеток (IC₅₀), рассчитывали графически по дозозависимой кривой. Статистический анализ данных проводили с помощью одностороннего дисперсионного анализа в программе Statistica 6.0. Различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.



Результаты и их обсуждение. Показано, что цитотоксический эффект, определенный МТТ-тестом, имеет выраженный дозозависимый характер, индивидуальный для каждого соединения. Эффект зависит от дозы: при концентрациях 1-10 мкМ исследуемые соединения стимулируют рост опухолевых клеток, а при концентрациях ≥ 10 мкМ ингибируют. Инкубирование опухолевых клеток обеих линий в течение 72 ч с исследуемыми соединениями приводило к подавлению жизнеспособности клеток в концентрации 100 мкМ.

Полученные данные указывают на определенные различия в чувствительности клеток линий человека карциномы печени HepG2 и рака молочной железы MCF-7 к цитотоксическому действию исследуемых соединений. Линия HepG2 была более чувствительна к действию исследуемых соединений, чем линия MCF-7. Соединения флавоноидного ряда RUB-581, RUB-611, ZEL-133-2R, ZEL-133-3 в концентрации 100 мкМ ингибировали жизнеспособность клеток линии HepG2 на 95% и более. Максимальное ингибирование раковых клеток линии MCF-7 исследуемыми соединениями в концентрации 100 мкМ составило 70-73% для RUB-611, RUB-581, ZEL-133-2R. Цитотоксическая активность остальных соединений в исследуемой максимальной дозе 100 мкМ оказалась слабой.

Таблица. Жизнеспособность опухолевых клеток под действием исследуемых соединений, IC_{50} соединений, проявивших наибольшую цитотоксическую активность в отношении раковых клеточных линий Hep G2 и MCF-7 в концентрации 100 мкМ

Соединение	Жизнеспособность опухолевых клеток, % от контроля			
	HepG2	IC_{50} , мкМ	MCF-7	IC_{50} , мкМ
RUB-581	5,64 $\pm$ 1,28	25,00	31,45 $\pm$ 1,38	58,60
RUB-611	1,46 $\pm$ 0,17	20,00	26,66 $\pm$ 0,79	53,02
ZEL-133-2R	6,52 $\pm$ 0,14	23,72	28,23 $\pm$ 0,70	56,09
ZEL-133-3	5,05 $\pm$ 0,18	22,38	48,99 $\pm$ 0,72	93,84

Проведенные исследования позволили определить эффективные концентрации соединений, вызывающие 50% гибель клеток (IC_{50}). Активными считали соединения, у которых IC_{50} была ≤ 50 мкМ. Разница между IC_{50} также варьируется в зависимости от клеточной культуры. Значения ингибирующей концентрации IC_{50} , полученные в результате использования МТТ в отношении культуры клеток HepG2 является более низким, чем полученные для MCF-7. Наибольшую активность на клеточной линии HepG2 проявили: RUB-581, RUB-611, ZEL-133-2R, ZEL-133-3. IC_{50} вышеуказанных соединений для клеточной линии HepG2 составило 20-25 мкМ. IC_{50} соединений RUB-581, RUB-611, ZEL-133-2R, ZEL-133-3 для MCF-7 было больше 50 мкМ.

Выводы. По результатам изучения цитотоксической активности можно сделать вывод о том, что соединения ряда флавоноидов RUB-581, ZEL-133-2R, RUB-611 и ZEL-133-3 перспективны для дальнейшего изучения их противоопухолевых свойств на лабораторных животных как веществ с потенциальной противоопухолевой активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцер-регистра за 2010-2019 гг. / А.Е. Океанов [и др.]; под ред. С.Л. Полякова. – РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова. – Минск, 2020. – 298 с.
2. Flavonoids as Anticancer Agents / D.M. Kopustinskiene [et al.] // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12(2). – P. 457-480.
3. The Effects and Mechanisms of Flavonoids on Cancer Prevention and Therapy: Focus on Gut Microbiota / M. Wang [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2022. – Vol. 18(4). – P. 1451-1475.
4. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent / A. Ullah [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25(22). – P. 5243-5281.



5. Противоопухолевая активность флаваноидов / Я.Ф. Зверев // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т.18, №2. – С. 181-194.

STUDY OF THE SENSITIVITY OF MCF-7 HUMAN BREAST CARCINOMA AND HEPG2 HUMAN LIVER CARCINOMA CELLS TO THE ACTION OF NEW SYNTHETIC COMPOUNDS OF A SERIES OF FLAVONOIDS

Chukarina T.V., Prokopovich O.A., Ohurtsova S.E., Pubinov D.B.

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,

Ak. Kuprevich Str. 5/2, Minsk, 220084, Belarus, chukagirl@gmail.com

Screening was carried out in a number of new synthetic compounds of a number of flavonoids. The studies performed made it possible to identify the compounds RUB-581, RUB-611, ZEL-133-2R, ZEL-133-3, which showed high cytotoxicity against the HepG2 and MCF-7 cancer cell lines. The selected compounds are promising for further study of their antitumor properties in laboratory animals as substances with potential antitumor activity.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ОЛОВА С ОСНОВАНИЕМ ШИФФА, СОДЕРЖАЩИМ АНТИОКСИДАНТНЫЙ ФРАГМЕНТ

Шпаковский Д.Б., Антоненко Т.А., Грачева Ю.А., Милаева Е.Р.

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва, 119991, Ленинские Горы, 1-3, dmshpak@mail.ru

Постановка задачи. Оловоорганические соединения обладают перспективными противоопухолевыми свойствами [1-3]. Основные механизмы антипролиферативной активности олова основаны на способности атома Sn связываться с SH-группами белков, а также промотировать окислительный стресс клетки. Снижение нежелательной токсичности возможно за счёт введения в структуру молекулы фрагмента 2,6-ди-*трет*-бутилфенола – миметика природного антиоксиданта витамина Е. Кроме того, известно, что основания Шиффа проявляют широкий спектр биологической активности, включая противогрибковые, антибактериальные, противомаларийные, антипролиферативные, противовоспалительные, противовирусные и жаропонижающие свойства [4].

Целью данной работы являлся синтез комплексов олова с основанием Шиффа, содержащим фрагмент 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, изучение их антиоксидантной и антипролиферативной активности, апоптоза а также их влияния на остановку клеточного цикла.

Методы исследования. Состав и чистота соединений подтверждены методами ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn -спектроскопии, ИК-спектроскопии, масс-спектроскопии и элементного анализа. Антиоксидантная активность соединений исследована спектрофотометрически с помощью CUPRAC- и ДФПГ-тестов. Противовоспалительная активность полученных соединений изучена в процессе ферментативного окисления линолевой кислоты под действием липоксигеназы LOX 1-B *in vitro*. Оценена *in vitro* цитотоксичность комплексов на клеточных линиях рака толстой кишки человека HCT-116, аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и рака легкого человека A-549 в МТТ-тесте. Методом проточной цитометрии изучен апоптоз и клеточный цикл на примере клеточной линии HCT-116 для наиболее цитотоксичных соединений через 24 и 48 часов.

Результаты. Получена серия новых оловоорганических комплексов на основе L (2-(N-3',5'-ди-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)-иминометилфенол) общей формулой $\text{Me}_2\text{SnBr}_2(\text{L})_2$ (1), $\text{Bu}_2\text{SnCl}_2(\text{L})_2$ (2), $\text{Ph}_2\text{SnCl}_2(\text{L})$ (3), $\text{Ph}_2\text{SnCl}_2(\text{L})_2$ (4) и $\text{Ph}_3\text{SnBr}(\text{L})_2$ (5).

Показано, что комплексы Sn более активны, чем исходный лиганд L и тролокс, используемый в качестве стандарта в CUPRAC-тесте. Наиболее активными являются



соединения **1**, **2** и **4**. Значения ТЕАС (тролокс-эквивалент) для них составляют $3,37 \pm 0,03$, $2,78 \pm 0,04$ и $2,64 \pm 0,07$, соответственно. Обнаружена высокая радикал-связывающая активность комплексов **1-5** по отношению к стабильному радикалу 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилу (ДФПГ). Наиболее активными восстановителями являются соединения **1** ($EC_{50} = 16 \pm 2 \mu M$) и **5** ($EC_{50} = 19 \pm 2 \mu M$).

Обнаружено, что соединение **4** является умеренным ингибитором LOX 1-B, $EC_{50} = 53,5 \pm 2 \mu M$.

Установлено, что наиболее цитотоксичным является комплекс на основе трифенилолова **5**, значения IC_{50} для трех линий составляют $0,32 \pm 0,08$, $0,29 \pm 0,03$ и $0,30 \pm 0,04 \mu M$ соответственно. Высокую активность также демонстрирует комплекс на основе дибутилолова **2**, значения IC_{50} составляют $1,6 \pm 0,2$, $4,3 \pm 0,5$ и $5,7 \pm 1 \mu M$, соответственно.

Апоптоз, известный как запрограммированная гибель клеток, представляет собой тщательно контролируемый энергозависимый процесс гибели клеток. Индукция апоптоза приводит к каскаду характерных биохимических событий, приводящих к изменениям клеточной морфологии и гибели. Показано, что наиболее активным соединением, индуцирующим апоптоз, является комплекс **2**. Общий процент апоптотических клеток составляет 42,6%. Характерно, что основная фракция клеток обнаруживается в позднем апоптозе 32,4%, что может свидетельствовать о появлении уже и частично мертвых клеток. Через 48 часов общее количество апоптотических клеток значительно выросло и приблизилось к 65% для соединения **2**. Исследование влияния наиболее токсичных соединений **2** и **5** на остановку клеточного цикла методом проточной цитометрии показало, что они блокируют пролиферацию в фазе G2/M клеточного цикла.

Заключение. Полученные оловоорганические комплексы демонстрируют высокую биологическую активность, что делает их перспективными для дальнейших исследований в качестве потенциальных противоопухолевых средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 20-03-00471 и стипендии Президента РФ аспирантам и молодым ученым № СП-1641.2021.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cytotoxic activity of organotin compounds containing non-steroidal anti-inflammatory drugs / T.A. Antonenko [et al.] // J. Organomet. Chem. – 2022. – Vol. 960. – Art. 122191.
2. Novel organotin complexes with phenol and imidazole moieties for optimized antitumor properties / E.A. Nikitin [et al.] // J. Organomet. Chem. – 2022. – Vol. 959.
3. Antioxidative vs cytotoxic activities of organotin complexes bearing 2,6-di-*tert*-butylphenol moieties / Antonenko T.A. [et al.] // Appl. Organomet. Chem. – 2018. – Vol. 37.
4. Analgesic and anti-inflammatory activities of Schiff base metal complexes – a review / Dave S., Bansal N. // Int. J. Basic Appl. Chem. – 2013. – Vol.3. – P. 31-40.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF TIN COMPLEXES WITH A SCHIFF BASE CONTAINING AN ANTIOXIDANT FRAGMENT

Shpakovsky D.B., Antonenko T.A., Gracheva Yu.A., Milaeva E.R.

Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, dmshpak@mail.ru

New organotin complexes with a Schiff base containing a fragment of 2,6-di-*tert*-butylphenol were synthesized and the study of their antioxidant and antiproliferative activities, apoptosis, effect on cell cycle was performed. It was found that the most cytotoxic complex was based on triphenyltin chloride. The obtained compounds demonstrate high biological activity, which makes them promising for further research as potential antitumor agents.



УСТОЙЧИВЫЕ К ЛИГАНДНОМУ ОБМЕНУ АНАЛОГИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ РУТЕНИЯ С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ

Шутков И.А., Милаева Е.Р., Назаров А.А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119991, Ленинские горы 1/3, ia.shutkov@gmail.com

В химиотерапии злокачественных новообразований хорошо зарекомендовали себя и успешно применяются платиновые препараты, цисплатин и его аналоги. Однако, несмотря на эффективность препаратов платины, их применение ограничено первичной или приобретенной резистентностью некоторых видов рака, а также тяжелыми побочными эффектами.

По этой причине широкий пласт современной медицинской химии направлен на поиск и изучение новых противоопухолевых соединений различных металлов. Наиболее изученными и описанными противоопухолевыми соединениями после платины являются соединения рутения, которые отлично зарекомендовали себя и обладают рядом достоинств. Первыми соединениями, вошедшими в клинические испытания, стали комплексы Ru(III) NAMI-A и NKP1339 (BOLD-100). В 2021 году FDA присвоило BOLD-100 статус орфанного лекарства для лечения рака желудка. Еще одной перспективной группой противоопухолевых соединений рутения являются металлоорганические производные Ru(II) типа RAPTA и RAED.

В отличие от платиновых препаратов, соединения рутения обладают другим механизмом противоопухолевого действия, их основной молекулярной мишенью являются гистоновые белки, а не ДНК, благодаря чему соединения рутения не обладают кросс-резистентностью к платиновым препаратам. Кроме того, соединения рутения обладают более низкой общей токсичностью.

Перспективным направлением является создание двойных лекарств, в которых объединены биологически активный органический лиганд и металлоцентр. Такой подход позволяет корректировать профиль противоопухолевой активности препарата и повысить селективность его действия.

Ранее нами были получены имидазольные лиганды с различной длиной линкера, содержащие фрагмент противоопухолевых препаратов лонидамина (селективный ингибитор аэробного гликолиза) и бексаротена (агонист ретиноидных X рецепторов), которые применяются в клинической практике и имеют доказанные молекулярные мишени. На основе таких биологически активных модифицированных имидазолов были получены серии аналогов соединения-лидера рутения RAPTA-C с хлоридными лигандами, которые показали перспективный профиль противоопухолевой активности в *in vitro* тестах на клеточных линиях рака человека. Однако полученные соединения рутения легко вступают в реакции лигандного обмена в присутствии таких растворителей, как вода и ДМСО, что может осложнить исследования противоопухолевой активности и в дальнейшем приводить к нежелательным побочным эффектам.

Поэтому целью данной работы являлось получение аналогов, устойчивых к лигандному обмену. Для этого был предложен подход, который заключается в замене хлоридных лигандов на остатки дикарбоновых кислот (щавелевой и малоновой), а также в получении катионных комплексов с двумя биологически активными имидазольными лигандами. Для полученных серий рутениевых соединений исследовали антипролиферативную активность в *in vitro* тестах на клеточных линиях рака человека и стабильность в растворах, содержащих ДМСО. Анализ полученных данных показал, что соединения с остатками дикарбоновых кислот устойчивы к лигандному обмену, однако это не влияет на значения антипролиферативной активности. Введение второго биологически активного имидазольного лиганда также приводит к



устойчивости, но и к заметному увеличению антипролиферативной активности, которое вероятно связано с введением второго фрагмента противоопухолевого препарата.

Среди полученных рутениевых соединений были отобраны лидеры, для которых изучили механизм гибели опухолевых клеток методом проточной цитометрии. Было показано, что через 48 часов инкубации все полученные соединения эффективно индуцируют апоптоз. Кроме того, комплексы с фрагментом лонидамина приводят к активации каспаз, что указывает на митохондриальный путь запуска апоптоза. Комплексы с остатком бексаротена, напротив, не приводят к активации каспаз даже спустя 72 часа инкубации, что говорит о другом механизме для таких соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 22-63-00016).

LIGAND EXCHANGE-RESISTANT ANALOGUES OF ANTITUMOR RUTHENIUM COMPOUNDS WITH BIOLOGICALLY ACTIVE ORGANIC LIGANDS

Shutkov I.A., Milaeva E.R., Nazarov A.A.

*M.V. Lomonosov Moscow State University, Russian Federation, Moscow, 119991,
Leninskie Gory 1/3, ia.shutkov@gmail.com*

The aim of this work was to obtain analogs of ruthenium complexes with biologically active imidazole ligands containing a fragment of the antitumor drugs lonidamine (a selective inhibitor of aerobic glycolysis) and bexarotene (an agonist of retinoid X receptors) resistant to ligand exchange. For this, an approach was proposed that consists in replacing chloride ligands with residues of dicarboxylic acids (oxalic and malonic), as well as in obtaining cationic complexes with two biologically active imidazole ligands. For the obtained series of ruthenium compounds, antiproliferative activity was studied in *in vitro* tests on human cancer cell lines and stability in solutions containing DMSO. An analysis of the obtained data showed that compounds with dicarboxylic acid residues are resistant to ligand exchange, but this does not affect the values of antiproliferative activity. The introduction of a second biologically active imidazole ligand also leads to resistance, but also to a noticeable increase in antiproliferative activity, which is probably associated with the introduction of the second fragment of the antitumor drug.

Among the obtained ruthenium compounds, the leaders were selected, for which the mechanism of tumor cell death was studied by flow cytometry. It was shown that after 48 hours of incubation, all obtained compounds effectively induce apoptosis. In addition, complexes with the lonidamine fragment led to the activation of caspases, which indicates a mitochondrial pathway for triggering apoptosis. Complexes with a bexarotene residue, on the contrary, do not lead to caspase activation even after 72 hours of incubation, which suggests another mechanism for such compounds.



СОДЕРЖАНИЕ

Александрова А.А., Мехтиев А.Р., Золотцев В.А., Тимошенко О.С., Завьялова М.Г., Санжаков М.А., Щербakov К.А., Рудович А.С., Жабинский В.Н., Хрипач В.А. СИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ ИЗОКСАЗОЛОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ КАСКАДА SONIC HEDGENOG В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ.....	4
Александрова Ю.И., Шурпик Д.Н., Мостовая О.А., Зеленихин П.В., Стойков И.И. БИОСОВМЕСТИМЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ С СУЛЬФОПРОИЗВОДНЫМИ ПИЛЛАР[5]АРЕНА	6
Аминов С.В., Уломский Е.Н., Русинов В.Л. ДЕСТРУКЦИЯ АЗОЛОПИРИМИДИНОВ КАК СПОСОБ ПОСТРОЕНИЯ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ	9
Андрианов А.М., Корноушенко Ю.В., Королёва Е.В., Игнатович Ж.В. IN SILICO ДИЗАЙН МУЛЬТИТАРГЕТНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА	10
Андрианов А.М., Фурс К.В., Шульдов Н.А., Тузиков А.В. ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА И КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ГЕНЕРАЦИИ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2.....	13
Андрианов А.М., Фурс К.В., Юшкевич А.М., Гончар А.В., Тузиков А.В. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ВИРТУАЛЬНОГО СКРИНИНГА, МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ СЛИЯНИЯ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2.....	16
Андрианов А.М., Фурс К.В., Юшкевич А.М., Гончар А.В., Габриэлян А., Розенталь А., Тузиков А.В. ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВОГО ТУБЕРКУЛЕЗА И ОЦЕНКА ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ	19
Антонец А.А., Ворошилкина К.М., Милаева Е.Р., Назаров А.А. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ПЛАТИНЫ И РУТЕНИЯ С ЛИГАНДАМИ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДИБУФЕЛОНА.....	22
Артёменко С.В. ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ, ВНЕДРЕНИЯ, ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И УЛУЧШЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ КАЧЕСТВА НА ПРИМЕРЕ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ЦЕНТРА «ХИМФАРМСИНТЕЗ»	24
Артемяева Ю.Н., Есипов Р.С., Мирошников А.И., Михайлопуло И.А. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ МИЗОРИБИНА И ЗЕБУЛАРИНА: КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФОСФОРИЛАЗ ИЗ E. COLI	25
Barysevich M.V., Laktsevich-Iskryk M.V., Scherbakov A.M., Salnikova D.I., Andreeva O.E., Sorokin D.V., Shchegolev Y.Y., Hurski A.L., Zhabinskii V.N., Khripach V.A. 21,22-CYCLOSTEROIDS AND THEIR DERIVATIVES: SYNTHESIS AND ANTIANDROGENIC EFFECTS.....	27
Беляева И.Д., Беляева А.Д., Мартинсон К.Д., Няникова Г.Г. БИОКОМПЛЕКС НИКЕЛЬ-ЦИНКОВЫЙ ФЕРРИТ/ ГРИБНОЙ ХИТОЗАН ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ	28
Берсенева Д.А., Грачева Ю.А., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р. КОМПЛЕКСЫ ОЛОВА НА ОСНОВЕ АБИРАТЕРОНА И ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	30



Божок Т.С., Голякович А.В., Фарина А.В., Харитонович Ю.А., Калиниченко Е.Н. ПРЕПАРАТИВНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА СОПУТСТВУЮЩЕЙ ПРИМЕСИ N-ДЕСМЕТИЛ ИМАТИНИБ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ИМАТИНИБА МЕЗИЛАТ	32
Божок Т.С., <u>Зильберман Р.Д.</u> , Савин А.О., Винникова О.В., Шабуня П.С., Фатыхова С.А., Калиниченко Е.Н. ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ФТОРАНАЛОГА ДЕЦИТАБИНА И АЗАЦИТИДИНА ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ	34
Васильев Н.А. ПОВЫШЕНИЕ РАСТВОРИМОСТИ БЕНЗИМИДАЗОЛОВОГО АНТИГЕМИНТИКА ФЛЮБЕНДАЗОЛА С ПОМОЩЬЮ АМОРФИЗАЦИИ	38
Васильева М.А. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ ПРОИЗВОДСТВА СОАО «ФЕРЕЙН» ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ	39
<u>Varabyeva N.A.</u> , Salnikova D.I., Paulovich D.I., Bogdanov F.B., Mikhaylova A.L., Sorokin D.V., Scherbakov A.M., Lakhvich F.A. and Piven Y.A. DESIGN, SYNTHESIS, AND BIOLOGICAL EVALUATION OF 4-ACYLAMINO- TETRAHYDROBENZISOXAZOLES AS NOVEL HSP90 INHIBITORS	42
<u>Винникова О.В.</u> , Савин А.О., Зильберман Р.Д., Панибрат О.В., Хрипач В.А. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА И ЦИСПЛАТИНА НА МОДЕЛИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА	43
<u>Vinter M.A.</u> , Kazlouski I.S., Zinchenko A.I. SYNTHESIS OF CYCLIC DIADENOSINE 3',5'-MONOPHOSPHATE USING INCLUSION BODIES EXHIBITING DIADENYLATE CYCLASE ACTIVITY	46
Гапанович В.Н., Фарбер В.Л., Парахня Е.В., Васильева Е.Н., Павленко В.С., <u>Бердина Е.Л.</u> , Власенко Е.К., Андреев С.В., Голякович В.В. ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧЕСКИХ И ТЕРАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПРОКТОВЕРИН	48
<u>Герловский Д.О.</u> , Литвинко Н.М., Константинов Ф.О. ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ЭОЗИНА ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ РЕАКЦИЙ ФАГОЦИТОЗА <i>IN VITRO</i>	51
<u>Голоенко И.М.</u> , Обьедков В.Г., Докукина Т.В., Синявская М.Г. ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ПРИ АНТИПСИХОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ: НЕОБХОДИМО ЛИ ЖЕЛАТЕЛЬНО?	54
Голяк Н.С. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТРАНСКУТОЛА НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ПРОПРАНОЛОЛА ГИДРОХЛОРИДА ИЗ ГЕЛЕЙ В ОПЫТАХ <i>IN VITRO</i>	57
<u>Golyakovich A.V.</u> , Bozhok T.S., Panibrat O.V., Farina A.V., Kalinichenko E.N. NOVEL BENZIMIDAZOLE CONJUGATES WITH A BENZAMIDE LINKER AS POTENTIAL PROTEIN KINASE INHIBITORS: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY	60
<u>Гончар М.Р.</u> , Нинин Ф.С., Милаева Е.Р., Назаров А.А. СОЕДИНЕНИЯ ЗОЛОТА, ИРИДИЯ И РУТЕНИЯ С ФОСФИТНЫМИ ЛИГАНДАМИ НА ОСНОВЕ ГЛЮКОЗЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ АГЕНТЫ	62
<u>Грачева Ю.А.</u> , Берсенева Д.А., Ларин К.А., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р. СИНТЕЗ СЛОЖНОГО ЭФИРА АБИРАТЕРОНА, АЦИЛИРОВАННОГО МЕТИОНИНОМ	64
<u>Грибовская О.В.</u> , Цыганков А.М., Мартинович В.П., Голубович В.П., Янченко В.В. АПРОБАЦИЯ СИНТЕЗА И ПИЛОТНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ ПЕРСПЕКТИВНОЙ НЕИНЪЕКЦИОННОЙ ПЕПТИДНОЙ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА	66
Гурина Н.С., <u>Некрашевич Я.В.</u> АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАВЫ КАДИЛА МЕЛИССОЛИСТНОГО	68



<u>Доронькина А.С., Жаворонок И.П., Михальчук А.Л., Богдан В.Г.</u> РОЛЬ N-ПАЛЬМИТОИЛЭТАНОЛАМИНА В НОЦИЦЕПТИВНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЛОКАДЕ GPR18 ИЛИ PPRAA РЕЦЕПТОРОВ У КРЫС С ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИЕЙ	70
<u>Дорошенко И.А., Говтвань А.О., Беклемишев М.К., Подругина Т.А.</u> СИНТЕЗ ТРИКАРБОЦИАНИНОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО МЕЗО-ПОЛОЖЕНИЮ АМБИДЕНТНЫМИ НУКЛЕОФИЛАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ АМИНОГРУППУ, ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬДЕГИДОВ	72
<u>Дребенкова И.В., Зайцев В.А.</u> СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИНЕРАЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА	73
<u>Дубовская Л.В., Широчина И.В., Горбачева И.В., Свиридов О.В.</u> КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКА КОЛИСТИНА В ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА.....	76
<u>Жаворонок И.П., Антипова О.А., Михальчук А.Л., Лисовская М.В.</u> СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПАРАЦЕТАМОЛА И 4-КАПРИЛАМИДОФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА НОЦИЦЕПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АРТРИТОМ	79
<u>Жаворонок И.П., Феськова Е.В., Адамцевич Н.Ю., Маньковская С.В.</u> ВЛИЯНИЕ ГЕЛЕВОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ЭКСТРАКТОВ БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО (<i>HELICHRYSUM ARENARIUM L.</i>) И ВОРОБЕЙНИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (<i>LITHOSPERMUM OFFICINALE L.</i>) НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАН КОЖИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ.....	81
<u>Жилко М.О., Бородина К.В., Мартинович В.П., Саванец О.Н., Кравченко Е.В., Голубович В.П.</u> МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, АНАЛОГОВ НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ, С ВАЗОПРЕССИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ЧЕЛОВЕКА	84
<u>Заяц М.Ф., Лещев С.М., Походня Ю.Г., Агабалаев А.А.</u> ЭКСТРАКЦИОННАЯ ПРОБОПОДГОТОВКА ПРИ ГХ-МС/МС ОПРЕДЕЛЕНИИ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ.....	87
<u>Заяц М.Ф., Лещев С.М., Походня Ю.Г., Агабалаев А.А., Юрченко Р.А.</u> МЕТОДИКА ЭКСТРАКЦИОННОЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ В ПРОЦЕССЕ ГХ-МС/МС ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В МОЧЕ СПОРТСМЕНОВ.....	91
<u>Заяц М.Ф., Лещев С.М., Юрченко Р.А., Михнюк О.Н.</u> ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ПРИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ОБЪЕКТАХ СЛОЖНОГО МАТРИЧНОГО СОСТАВА	95
<u>Заяц М.Ф., Лещев С.М., Походня Ю.Г., Агабалаев А.А., Шагойко П.Г., Юрченко Р.А.</u> РАЗРАБОТКА ЭКСТРАКЦИОННОЙ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ ЖХ-МС ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМАНИТИНОВЫХ И ФАЛЛОИДИНОВЫХ ТОКСИНОВ В ГРИБАХ И МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА	98
<u>Игнатовец О.С., Леонтьев В.Н., Феськова Е.В., Адамцевич Н.Ю., Страх Я.Л., Чернецкая Ю.Г.</u> ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО СРЕДСТВА.....	102
<u>Казакевич С.А., Гапанович В.Н., Воробьев П.В., Андреев С.В., Хмурович Н.В., Островская И.Л.</u> ОСВОЕНИЕ ВЫПУСКА ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ – ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ	105
<u>Калиниченко Е.Н.</u> БИОЭКВИВАЛЕНТНОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ФЛУТРИКСАН И НЕКСАВАР	108



Каранкевич Е.Г., Маркович М.М., Сивчик В.В., Каминская В.В., Куваева З.И. ПРОИЗВОДНЫЕ L-АРГИНИНА С ПОТЕНЦИАЛОМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ	109
Карпенко А.Д., Войтко Т.Д., Тузиков А.В., Андрианов А.М. DE NOVO ДИЗАЙН ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ VSCR-AVL ТИРОЗИНКИНАЗЫ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ.....	112
Катковская И.Н., Титко О.В., Мурашкевич Ю.Г., Мороз В.Л., Гуринович В.А., Филипович Н. А., Якубович Е.А., Максимчик Ю.З., Лукиенко Е.П., Черемисин А.С., Канунникова Н.П., Мойсеенок А.Г., Надольник Л.И. ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРОИЗВОДНЫХ ВИТАМИНОВ, ЛАКТОФЕРРИНА И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИШЕМИИ И ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ПОЧЕК КРЫС	115
Коноплич А.В., Будько Е.В., Калиниченко Е.Н. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСИ А В ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ НИЛОТИНИБ-НАН МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС	118
Коноплич А.В., Савицкий В.А., Калиниченко Е.Н. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЛОТИНИБА В ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ.....	121
Космач А.А., Герловский Д.О., Литвинко Н.М. АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ АДЕНОЗИНА И ИХ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ.....	123
Кравченко Е.В., Бизунок Н.А., Дубовик Б.В., Суровец А.И., Асташко Ю.В. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ASP-GLU НА УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ	125
Кравченко Е.В., Бизунок Н.А., Дубовик Б.В. ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДА PRO-LEU НА УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПЕРЕМЕННОЙ СТРЕССОГЕННОСТИ	129
Куприенко О.С., Вашкевич И.И., Зильберман А.И., Кудрик И.Г., Свиридов О.В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕТА-ЛАКТАМНОГО АНТИБИОТИКА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ НОВОЙ РЕЦЕПТОРНО-ФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ	133
Лапко А.В., Семков И.Д., Голубович В.П. ПОЛУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ IGG-СВЯЗЫВАЮЩИХ ГЕМОСОРБЕНТОВ НА ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ОСНОВНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ.....	136
Лапко А.В., Голубович В.П. СРАВНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВЯЗЫВАНИЯ IGG ОБРАЗЦАМИ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕМОСОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ ОЛИГОПЕТИДОВ С ПРОТЕИН А СОДЕРЖАЩИМ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫМ ГЕЛЕМ.....	139
Литвинюк А.И., Рак А.И., Гудович В.В., Юркштович Н.К. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СОПУТСТВУЮЩИХ ПРИМЕСЕЙ В ГЕНЕРИЧЕСКОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ НА ОСНОВЕ ТИКАГРЕЛОРА.....	140
Лобов А.Ю., Коноплич А.В., Малявко А.В., Бабицкая С.В., Тетерюкова А.Ю., Балашова Л.А., Лятун И.Ю., Трушко В.А., Калиниченко Е.Н. ИНДОКСАНИБ (СУНИТИНИБ) – ТАРГЕТНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ, ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ И НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	142
Макарова В.В., Мандрик М.А., Садковский И.А., Голяк Н.С., Антонов С.В. ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОИНТЕРФЕРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОВМЕСТИМОСТИ КОМПОНЕНТОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ТРАНСДЕРМАЛЬНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СИСТЕМ	146



Мальчёнкова С.С., Голяк Н.С.

АКТУАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭКСТЕМПОРАЛЬНОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ ТВЕРДЫХ ПЕРОРАЛЬНЫХ ФОРМ ДЛЯ ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ 149

Милаева Е.Р.

СОВРЕМЕННАЯ СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СОЕДИНЕНИЙ МЕТАЛЛОВ..... 153

Михальчук А.Л.

ЛИПИДНЫЕ МЕССЕНДЖЕРЫ ГОМЕОСТАЗА (АУТОКОИДЫ) – ПАЛЬМИТОИЛЭТАНОЛАМИД И ЕГО КОНГЕНЕРЫ: К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМЫ БИОДОСТУПНОСТИ 156

Надольник Л.И., Полубок В.Ч., Виноградов В.В.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВИТАМИННО-АМИНОКИСЛОТНОГО КОМПЛЕКСА (ЛИПОЕВАЯ КИСЛОТА, ТИАМИН, ТИРОЗИН) ПРИ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У КРЫС..... 159

Назмутдинова В.А., Александрова Ю.И., Шурпик Д.Н., Зеленихин П.В., Стойков И.И.

ГУАНИДИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПИЛЛАР[5]АРЕНА, КАК НОВЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ 162

Насенникова Е.Е., Климашевич В.Б., Гудович В.В., Юркштович Н.К.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТИПА ПРОЛОНГИРУЮЩЕГО КОМПОНЕНТА И ЕГО КОНЦЕНТРАЦИИ НА ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВЕ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА 163

Nichick M.N., Zuraev A.V., Voitekhovich S.V., Kuzmenko S.

5-(2-MERCAPTOETHYL)TETRAZOLE AND SILVER NANOPARTICLES CAPPED WITH IT: ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND SOME OTHER PROPERTIES 166

Овсянникова Е.М., Солонинкина И.О., Юркова И.Л.

N-АЦЕТИЛЦИСТЕИН В РЕГУЛИРОВАНИИ $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -ОПОСРЕДОВАННОЙ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ ГЛИЦЕРОФОСФАТА 168

Панибрат О.В., Божок Т.С., Фарина А.В., Калининченко Е.Н.

ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ, ПРОИЗВОДНЫХ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ, НА ИНДУКЦИЮ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И УРОВЕНЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ АФК..... 172

Панибрат О.В., Божок Т.С., Фарина А.В., Калининченко Е.Н.

ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ – ПРОИЗВОДНЫХ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК 176

Панибрат О.В., Савочка О.П., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А.

ВЛИЯНИЕ МОНОКОНЬЮГАТОВ БРАССИНОСТЕРОИДОВ С САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК 179

Пашковский Ф.С., Рубинов Д.Б., Лахвич Ф.А., Чукарина Т.В., Огурцова С.Э., Прокопович О.А.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ФЛАВОНОИДОВ, ИЗОФЛАВОНОИДОВ И АЗАФЛАВОНОИДОВ 183

Пустюльга Е.С., Голубович В.П.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ СОРБЕНТОВ ПУТЕМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПО ЭДМАНУ..... 185

Рашкевич О.С., Волчек А.В.

АНТИГИПОКСИЧЕСКИЕ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗОХИНОНА 187

Rudovich M.I., Sachenko A.B., Shchur V.V., Usanov S.A., Yantsevich A.V.

NRICHMENT OF SUPERCOILED CIRCULAR DNA IN PLASMID DNA PREPARATIONS FOR GENE-THERAPY APPLICATION BY LIQUID-LIQUID EXTRACTION 191

Саванец О.Н., Кравченко Е.В., Ольгомец Л.М., Бородина К.В., Голубович В.П., Зильберман Р.Д.

ОЦЕНКА ХРОНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС 193



Саватеев К.В., Федотов В.В., Уломский Е.Н., Русинов В.Л. РЕГИОСПЕЦИФИЧНЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ АНОМАЛЬНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ ПУРИНОВОГО РЯДА.....	196
Савчук А.Л., Литвиновская Р.П., Драшар П., Хрипач В.А. СОДЕРЖАНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ В <i>LASER TRILOBUM</i>.....	198
Самцов М.П., Тарасов Д.С., Луговский А.П., Зильберман Р.Д., Савин А.О., Винникова О.В. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ И ФОТОЛОНА	199
Сечко О.Г., Калининченко Е.Н., Божок Т.С., Царенков В.М. ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗАМИДНОГО РЯДА	203
Сивец А.В., Ханчевский М.А., Жуковец Т.А., Сивец Г.Г. СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО МОДИФИЦИРОВАННОГО ПУРИНОВОГО НУКЛЕОЗИДА АЛЛОФУРАНОЗЫ	205
Сивец Г.Г. СИНТЕЗ МОЛНУПИРАВИРА ИЗ ЦИТИДИНА	209
Синявская М.Г., Голоенко И.М., Бобр С.Л., Левданский О.Д., Шулинский Р.С., Грищенко Л.Н., Ревтович М.Ю. ФАРМАКОГЕНОМИКА ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА.....	210
Синявский В.В., Сергей А.В., Будько Е.В., Калининченко Е.Н. РАЗРАБОТКА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ СОРАФЕНИБА ТОЗИЛАТА	212
Siniauski U.V., Farina A.V., Sergei A.U., Kalinichenko E.N. A METHOD FOR OBTAINING FINE PAZOPANIB HYDROCHLORIDE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGRIDIENT.....	214
Соколова С.В., Шамцян А.М. ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ, В ФАРМАЦЕВТИКЕ, ЛЕЧЕБНОЙ КОСМЕТИКЕ И ДЛЯ СОЗДАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ	215
Сорокин С.С., Колесников Б.А., Шамцян М.М. ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАЗИДИОМИЦЕТОВ <i>COPRINUS LAGOPIDES</i> И <i>FUNALIA TROGII</i>	217
Степура И.И., Агейко С.А., Степура В.И. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ВИТАМИНА В₁, ПОЛУЧЕННЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕРОКСИДАЗ РАСТЕНИЙ	219
Стрелец Е.А., Фенько Л.А., Леончикова Е.Г., Семашко И.В., Вершинина Г.А., Хилько Е.Б. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АЛЛОХОЛА, ФЕНИБУТА, КАПТОПРИЛА, БРОМГЕКСИНА ГИДРОХЛОРИДА, АМИАДАРОНА ГИДРОХЛОРИДА, ГЛИБЕНКЛАМИДА В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ.	222
Сушинская О.А., Голяк Н.С. ВЫБОР ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИДКОГО ЭКСТРАКТА ПОЛЫНИ.....	225
Тумар Е.М., Огурцова С.Э., Савин А.О., Рубинов Д.Б. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ФЛАВАНОИДОВ НА МОДЕЛИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА <i>IN VIVO</i>	228
Тюрин В.Ю., Антонец А.А., Назаров А.А., Милаева Е.Р. ИЗУЧЕНИЕ РЕДОКС-АКТИВНОСТИ И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ КОМПЛЕКСОВ RU(III) – ПЕРСПЕКТИВНЫХ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫХ АГЕНТОВ	230



Уломский Е.Н., Русинов В.Л., Федотов В.В.

РЕКОНСТРУКТИВНАЯ МЕТОДОЛОГИЯ В ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОЙ ХИМИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СРЕДСТВ 233

Farina A.V., Bozhok T.S., Panibrat O.V., Kalinichenko E.N.

DISCOVERY OF NOVEL ATN1 CANCER BENZAMIDE DERIVATIVES: RATIONAL DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY 233

Farina A.V., Kalinichenko E.N.

N1-(3-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL)ISOPHTHALAMIDE DERIVATIVES AS PROTEIN KINASE INHIBITORS: DESIGN AND DOCKING STUDIES.....234

Хмурович Н.В., Лавник Е.Б., Суворова И.В., Гапанович В.Н., Довгаль Е.Г., Ситько Т.И.

ПРОЦЕДУРА АТТЕСТАЦИИ УПОЛНОМОЧЕННЫХ ЛИЦ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ 239

Чехольский А.С., Михальчук А.Л.

ФИЗИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ЭМУЛЬСИОННОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ИНЪЕКЦИОННОГО ВВЕДЕНИЯ 241

Чукарина Т.В., Прокопович О. А., Огурцова С.Э., Рубинов Д.Б.

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА MCF-7 И КАРЦИНОМЫ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА HEP G2 К ДЕЙСТВИЮ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ РЯДА ФЛАВОНОИДОВ..... 244

Шпаковский Д.Б., Антоненко Т.А., Грачева Ю.А., Милаева Е.Р.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ОЛОВА С ОСНОВАНИЕМ ШИФФА, СОДЕРЖАЩИМ АНТИОКСИДАНТНЫЙ ФРАГМЕНТ 246

Шутков И.А., Милаева Е.Р., Назаров А.А.

УСТОЙЧИВЫЕ К ЛИГАНДНОМУ ОБМЕНУ АНАЛОГИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ РУТЕНИЯ С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ 248



АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

A

Andreeva O.E. 27

B

Barysevich M.V. 27

Bogdanov F.B. 42

Bozhok T.S. 60, 233

F

Farina A.V. 60, 214, 233, 234

G

Golyakovich A.V. 60

H

Hurski A.L. 27

K

Kalinichenko E.N. 60, 214, 233, 234

Kazlouski I.S. 46

Khripach V.A. 27

Kuzmenko S. 166

L

Lakhvich F.A. 42

Laktsevich-Iskryk M.V. 27

M

Mikhaylova A.L. 42

N

Nichick M.N. 166

P

Panibrat O.V. 60, 233

Paulovich D.I. 42

Piven Y.A. 42

R

Rudovich M.I. 191

S

Sachenko A.B. 191

Salnikova D.I. 27, 42

Scherbakov A.M. 27, 42

Sergei A.U. 214

Shchegolev Y.Y. 27

Shchur V.V. 191

Siniauski U.V. 214

Sorokin D.V. 27, 42

U

Usanov S.A. 191

V

Varabyeva N.A. 42

Vinter M.A. 46

Voitekhovich S.V. 166

Y

Yantsevich A.V. 191

Z

Zhabinskii V.N. 27

Zinchenko A.I. 46

Zuraev A.V. 166



А

Агабалаев А.А. 87, 91, 98
Агейко С.А. 219
Адамцевич Н. Ю. 81
Адамцевич Н.Ю 102
Александрова А.А. 4
Александрова Ю.И. 6, 162
Аминов С.В. 9
Андреев С.В. 48, 105
Андрианов А.М. 10, 13, 16, 19, 112
Антипова О.А. 79
Антоненко Т.А. 246
Антонец А.А. 22, 230
Антонов С.В. 146
Артёменко С.В. 24
Артемяева Ю.Н. 25
Асташко Ю.В. 125

Б

Бабицкая С.В. 142
Балашова Л.А. 142
Беклемишев М.К. 72
Беляева А.Д. 28
Беляева И.Д. 28
Бердина Е.Л. 48
Берсенева Д.А. 30, 64
Бизунок Н.А. 125, 129
Бобр С.Л. 210
Богдан В.Г. 70
Божок Т.С. 32, 34, 172, 176, 203
Бородин К.В. 84, 193
Будько Е.В. 118, 212

В

Васильев Н.А. 38
Васильева Е.Н. 48
Васильева М.А. 39
Вашкевич И.И. 133
Вершинина Г.А. 222
Винникова О.В. 34, 43, 199
Виноградов В.В. 159
Власенко Е.К. 48
Войтко Т.Д. 112
Волчек А.В. 187
Воробьев П.В. 105
Ворошилкина К.М. 22

Г

Габриэлян А. 19
Гапанович В.Н. 48, 105, 239
Герловский Д.О. 51
Герловский Д.О. 123
Говтвань А.О. 72
Голоенко И.М. 54, 210
Голубович В.П. 66, 84, 136, 139, 185, 193
Голяк Н.С. 57, 146, 149, 225
Голякович А.В. 32
Голякович В.В. 48
Гончар А.В. 16, 19
Гончар М.Р. 62
Горбачева И.В. 76
Грачева Ю.А. 30, 64, 246
Грибовская О.В. 66
Грищенкова Л.Н. 210
Гудович В.В. 140, 163
Гурина Н.С. 68
Гуринович В.А. 115



Д

Довгаль Е.Г. 239
Докукина Т.В. 54
Доронькина А.С. 70
Дорошенко И.А. 72
Драшар П. 198
Дребенкова И.В. 73
Дубовик Б.В. 125, 129
Дубовская Л.В. 76

Е

Есипов Р.С. 25

Ж

Жабинский В.Н. 4
Жаворонок И.П. 70, 79, 81
Жилко М.О. 84
Жуковец Т.А. 205

З

Завьялова М.Г. 4
Зайцев В.А. 73
Заяц М.Ф. 87, 91, 95, 98
Зеленихин П.В. 6, 162
Зильберман А.И. 133
Зильберман Р.Д. 34, 43, 193, 199
Золотцев В.А. 4

И

Игнатовец О.С. 102
Игнатович Ж.В. 10

К

Казакевич С.А. 105
Калиниченко Е.Н. 32, 34, 108, 118, 121, 142, 172, 176, 203, 212

Каминская В.В. 109
Канунникова Н.П. 115
Каранкевич Е.Г. 109
Карпенко А.Д. 112
Катковская И.Н. 115
Климашевич В.Б. 163
Колесников Б.А. 217
Коноплич А.В. 118, 121, 142
Константинов Ф.О. 51
Корноушенко Ю.В. 10
Королёва Е.В. 10
Космач А.А. 123
Кравченко Е.В. 84, 125, 129, 193
Куваева З.И. 109
Кудрик И.Г. 133
Куприенко О.С. 133

Л

Лавник Е.Б. 239
Лапко А.В. 136, 139
Ларин К.А. 64
Лахвич Ф.А. 183
Левданский О.Д. 210
Леонтьев В.Н. 102
Леончикова Е.Г. 222
Лещев С.М. 87, 91, 95, 98
Лисовская М.В. 79
Литвинко Н.М. 123
Литвинко Н.М. 51
Литвиновская Р.П. 179, 198
Литвинюк А.И. 140
Лобов А.Ю. 142
Луговский А.П. 199
Лукиенко Е.П. 115
Лятун И.Ю. 142



М

Макарова В.В. 146
Максимчик Ю.З. 115
Мальчёнкова С.С. 149
Малявко А.В. 142
Мандрик М.А. 146
Маньковская С.В. 81
Маркович М.М. 109
Мartiнович В.П. 66, 84
Мартинсон К.Д. 28
Мехтиев А.Р. 4
Милаева Е.Р. 22, 30, 62, 64, 153, 230, 246, 248
Мирошников А.И. 25
Михайлопуло И.А. 25
Михальчук А.Л. 70, 79, 156, 241
Михнюк О.Н. 95
Мойсеенок А.Г. 115
Мороз В.Л. 115
Мурашкевич Ю.Г. 115

Н

Надольник Л.И. 115, 159
Назаров А.А. 22, 62, 230, 248
Назмутдинова В.А. 162
Насенникова Е.Е. 163
Некрашевич Я.В. 68
Нинин Ф.С. 62
Няникова Г.Г. 28

О

Объедков В.Г. 54
Овсянникова Е.М. 168
Огурцова С.Э. 183, 228, 244
Ольгомец Л.М. 193

Островская И.Л. 105

П

Павленко В.С. 48
Панибрат О.В. 43, 172, 176, 179
Парахня Е.В. 48
Пашковский Ф.С. 183
Подругина Т.А. 72
Полубок В.Ч. 159
Походня Ю.Г. 87, 91, 98
Прокопович О. А. 244
Прокопович О.А. 183
Пустюльга Е.С. 185

Р

Рак А.И. 140
Рашкевич О.С. 187
Ревтович М.Ю. 210
Розенталь А. 19
Рубинов Д.Б. 183, 228, 244
Рудович А.С. 4
Русинов В.Л. 9, 196, 233

С

Саванец О.Н. 84., 193
Саватеев К.В. 196
Савин А.О. 34, 43, 199, 228
Савицкий В.А. 121
Савочка О.П. 179
Савчук А.Л. 198
Садковский И.А. 146
Самцов М.П. 199,
Санжаков М.А. 4
Свиридов О.В. 76, 133
Семашко И.В. 222
Семков И.Д. 136



Сергей А.В. 212
Сечко О.Г. 203
Сивец А.В. 205
Сивец Г.Г. 205, 209
Сивчик В.В. 109
Синявская М.Г. 54, 210
Синявский В.В. 212
Ситько Т.И. 239
Соколова С.В. 215
Солонинкина И.О. 168
Сорокин С.С. 217
Степура В.И. 219
Степура И.И. 219
Стойков И.И. 6, 162
Страх Я.Л. 102
Стрелец Е.А. 222
Суворова И.В. 239
Суровец А.И. 125
Сушинская О.А. 225

Т

Тарасов Д.С. 199
Тетерюкова А.Ю. 142
Тимошенко О.С. 4
Титко О.В. 115
Трушко В.А. 142
Тузигов А.В. 13, 16, 112
Тумар Е.М. 228
Тюрин В.Ю. 230

У

Уломский Е.Н. 9, 196, 233

Ф

Фарбер В.Л. 48
Фарина А.В. 32, 172, 176

Фатыхова С.А. 34
Федотов В.В. 196, 233
Фенько Л.А. 222
Феськова Е.В. 81, 102
Филипович Н. А. 115
Фурс К.В. 13, 16, 19

Х

Ханчевский М.А. 205
Харитонович Ю.А. 32
Хилько Е.Б. 222
Хмурович Н.В. 105, 239
Хрипач В.А. 4, 43, 179, 198

Ц

Царенков В.М. 203
Цыганков А.М. 66

Ч

Черемисин А.С. 115
Чернецкая Ю.Г. 102
Чехольский А.С. 241
Чукарина Т.В. 183, 244

Ш

Шабуня П.С. 34
Шагойко П.Г. 98
Шамцяня А.М. 215
Шамцяня М.М. 217
Широчина И.В. 76
Шпаковский Д.Б. 30, 64, 246
Шулинский Р.С. 210
Шульдов Н.А. 13
Шурпик Д.Н. 6, 162
Шутков И.А. 248



Щ

Щербаков К.А. 4

Ю

Юркова И.Л. 168

Юркштович Н.К. 140, 163

Юрченко Р.А. 91, 95, 98

Юшкевич А.М. 16, 19

Я

Якубович Е.А. 115

Янченко В.В. 66

БЕЛОРУССКИЕ ЛЕКАРСТВА

Материалы
Международной научно-практической конференции

Минск, 23-25 ноября 2022 г.

Информация об издательстве