

УДК 577.355

ПРИМЕНЕНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

С.Э. Кондаков, М.Я. Мельников, Е.В. Блынская*, К.В. Алексеев*

(кафедра химической кинетики; e-mail: melnikov46@mail.ru)

Показана возможность использования показателя оседания клеток крови в качестве неспецифического биосенсора для изучения изменения активности разных партий одного фармацевтического препарата.

Ключевые слова: биоэквивалентность лекарств, применение биосенсоров в фармации, процесс оседания клеток.

Полученные в результате статистической обработки критерии оценки воздействия веществ на биосенсор можно использовать для практических целей, например в биофармации. Одна из задач организации фармацевтического дела – осуществление внешнего контроля стабильности фармацевтического производства и выявление фальсифицированных лекарственных средств [1]. Внешний контроль независимыми методами с использованием биосенсоров широко используется обществами потребителей в западных странах, но мало востребован в России. В настоящее время в соответствии с решением Межведомственной комиссии Совета безопасности РФ от 24.10.2001 г. № 3 Министерство здравоохранения и социального развития РФ совместно с заинтересованными министерствами и ведомствами ведет поиск и разработку методов для внедрения скрининговой оценки лекарственных препаратов, которые, не заменяя фармакопейные методы анализа, дали бы возможность быстро и с меньшими затратами выявлять фальсифицированные и некачественные лекарственные средства.

Ранее нами было показано, что процесс оседания форменных элементов крови может быть использован для контроля стабильности характеристик выпускаемых лекарственных средств одного производителя для разных партий препарата [2]. Предположение об использовании показателя оседания клеток крови в качестве неспецифического биосенсора для фармацевтического скрининга основано на том, что оседание эритроцитов является многостадийным процессом, зависящим не только от физико-химических свойств системы, но и от сохранения метаболической активности форменных элементов крови, в частности ней-

трофилов [3]. Экспериментально показано, что добавление в оседающую кровь микроколичеств веществ, не меняющих физико-химические свойства системы, но специфически влияющих на метаболизм белых клеток крови, значительно замедляет оседание всей клеточной массы [4]. Проведенные исследования позволили разработать математическую модель активной коллоидной системы, когда свойства седиментирующих частиц (клеток крови) изменяются в процессе оседания [5].

Динамика оседания форменных элементов крови при приеме лекарственных препаратов человеком, как было показано ранее, аналогична наблюдаемой при добавлении того же препарата к образцу крови данного человека вне организма [6]. Таким образом, изучая процесс седиментации клеток крови с добавкой исследуемого препарата *in vitro*, можно прогнозировать его воздействие *in vivo*. Это означает, что, зная, как конкретное вещество воздействует на процесс оседания форменных элементов крови, можно оценивать его эффективность как величину отклика биосенсора, в качестве которого выступают клетки крови. Следовательно, используя процесс оседания в качестве неспецифического биосенсора, можно проводить сравнение активности фармацевтических препаратов. Данная задача является основополагающей в биофармации – разделе фармацевтической науки, которая появилась после установления фактов терапевтической неэквивалентности лекарственных препаратов одного состава, но изготовленных разными производителями [7, 8]. Дальнейшие физико-химические инструментальные исследования показали, что терапевтическая неэквивалентность может быть обуслов-

*ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва.

лена рядом причин: дисперсностью лекарственных веществ, подбором вспомогательных компонентов и различием технологических процессов – так называемыми фармацевтическими факторами [9–10].

Цель настоящей работы – экспериментальное исследование возможности использования показателя оседания форменных элементов крови в качестве неспецифического биосенсора для исследования биоэквивалентности препаратов, выпускаемых на основе ацетилсалициловой кислоты (АСК). В качестве характеристики воздействия на систему мы взяли абсолютную разность между величинами столбика плазмы над оседающей клеточной массой с добавкой аликвоты исследуемого препарата и без него.

При измерении оседания клеток крови (показатель СОЭ*) стабилизированную антикоагулянтом (цитратом натрия) кровь набирают в стандартный капилляр так, чтобы высота столбика крови составляла 100 мм (внутренний диаметр капилляра $1,0 \pm 0,1$ мм). Капилляр устанавливают в вертикальное положение и через определенное время, в нашем случае 60 мин, определяют величину высоты столбика плазмы над оседающей красной кровью. Эксперимент проводили, как было описано ранее [2]. Все приобретенные препараты ацетилсалициловой кислоты в виде таблеток

(7 образцов) и образец фармацевтической субстанции растворяли в физиологическом растворе. Производители готовых лекарственных форм, используемых в опытах, указаны в таблице. Для получения достоверных результатов несколько таблеток одного производителя взвешивали, дробили и смешивали, а затем растирали в агатовой ступке. Из полученной смеси отбирали навеску, соответствующую 0,05 г чистой ацетилсалициловой кислоты. Навески помещали в одноразовые конические пластиковые пробирки объемом 10 мл, добавляли 5 мл физиологического раствора и, закрыв, помещали в ротамикс “PM-1” (“ELMI”, Латвия) на 2 ч (теоретическая концентрация АСК в растворе 10 мг/мл). Полученный раствор фильтровали через бактериальный фильтр “Millipore”, затем 0,22 мкм и 10 мкл фильтрата добавляли к 10 мл исходного физиологического раствора. Тем самым моделировалась концентрация фармацевтического препарата в кровеносном русле при его внутривенном введении из расчета на 5 л крови. Полученные для исследования образцы по 10 мкл вносили в круглодонную иммунологическую плашку размером 8×12 лунок так, чтобы каждый образец располагался в отдельном ряду. Таким образом, была приготовлена матрица на 10 образцов крови (10 рядов) по 8 лунок для

Препараты ацетилсалициловой кислоты (АСК)

Номер образца	Название препарата (производитель)	Нормативная документация	Масса таблетки, г	Масса АСК в таблетке (определено)
1	ацетилсалициловая кислота (ОАО “Дальхимфарм”)	Р № 001701-2003 от 09.01.2003 ФСП 42-0158-2865-02	0,6±0,03	500мг (490±10 мг)
2	ацетилсалициловая кислота (ЗАО “ПФК Обновление”)	Р № ЛС-001533 от 21.04.2006 ФСП 42-0461-7262-05	0,6±0,04	500 мг (490±15 мг)
3	ацетилсалициловая кислота (ОАО “Фармстандарт-Лексредства”)	Р N003846/01 ФСП 42-0550-4503-04	0,6±0,03	0,5 г (490±25 мг)
4	ацетилсалициловая кислота-УБФ (ОАО “Уралбиофарм”)	Р № 002248/01-2003 ФСП 42-0336-2925-02	0,6±0,04	0,5 г (490±25 мг)
5	аспирин® (“BAYER”)	Р № 013664/01	0,6±0,01	500 мг (490±15 мг)
6	субстанция ацетилсалициловой кислоты (“Shandong Xinhua Pharmaceutical Factory”, Китай)	П N012533/01 НД 42-4421-07	–	навеска 500 мг
7	ацетилсалициловая кислота МС (ЗАО “Медисорб”)	Р N002019/01-2002 ФСП 42-0306-2367-02	0,6±0,04	0,5 г (490±25 мг)
8	ацетилсалициловая кислота (ЗАО “Алтайвитамины”)	Р N003889/01 ФСП 42-0163-3526-02	0,6±0,04	500 мг (490±15 мг)

* Степень оседания эритроцитов.

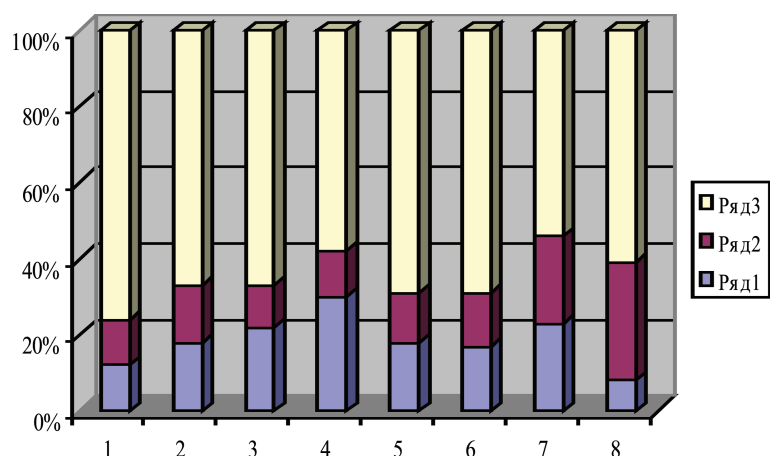


Рис. 1. Применение методологии неспецифических биосенсоров для исследования биоэквивалентности препаратов разных производителей с одним действующим началом: ряд 1 – сильная реакция (отличие в показателе СОЭ более 2 мм); ряд 2 – возможная реакция (реакция в пределах ошибки метода от 1 до 2 мм); ряд 3 – нет реакции по сравнению с контролем

каждого образца. В пустые лунки помещали чистый физиологический раствор для контроля. К подготовленным образцам добавляли по 90 мкл донорской крови, полученные смеси инкубировали в течение 20 мин в иммуношайкере при постоянном перемешивании при температуре 28°C. По окончании инкубации полученные опытные и контрольные смеси набирали в стандартные капилляры для измерения СОЭ. Положение границы клетки крови/плазмы в опыте и контроле фиксировали через 60 и 90 мин.

Результаты и их обсуждение

В качестве критерия активности использовали изменение показателя СОЭ за 1 ч в образце крови, содержащем аликвоту препарата, по сравнению с показателем СОЭ в образце крови без добавки. Рассчитывали среднюю скорость оседания по контролям. Для обработки результатов считали число соответствующих реакций для каждого образца препарата. Полученные данные представлены на рис. 1 в виде столбчатой процентной диаграммы (время 60 мин). Для каждого отрезка времени и для каждого образца крови конкретного донора вычисляли отклонение от среднего, и в случае отклонения более чем на 2 мм в ту или иную сторону фиксировали сильную реакцию (рис. 1, ряд 1). В случае отклонения на 1 мм фиксировали возможную реакцию (рис. 1, ряд 2).

На рис. 2 представлена нормированная диаграмма активности исследованных препаратов в предположении, что активность чистой ацетилсалициловой кис-

лоты составляет 100% и в расчет принимаются только сильные реакции.

Так как препараты, исследованные при помощи скрининга неспецифическими биосенсорами, сильно отличаются по активности, высказано предположение, что это может быть частично связано с нарушением технологии производства или недостаточным количеством действующего начала. Концентрацию ацетилсалициловой кислоты в образцах измеряли спектрофотометрически на длине волны $\lambda_{\text{погл}} = 240$ нм по предварительно построенной калибровочной кривой. При построении калибровочной кривой использовали субстанцию ацетилсалициловой кислоты производства “Shandong Xinhua Pharmaceutical Factory” (Китай). Для приготовления матричных растворов ацетилсали-

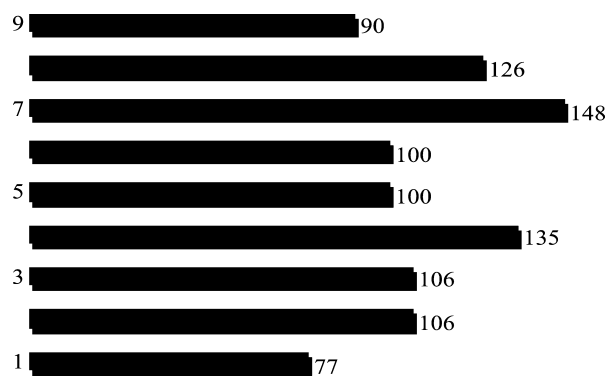


Рис. 2 Нормированная диаграмма активности готовых лекарственных форм на основе ацетилсалициловой кислоты. Активность субстанции ацетилсалициловой кислоты принимается за 100% (учитываются только сильные реакции)

циловой кислоты с концентрацией 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 мг/мл использовали этанол.

В ходе проведения исследований выяснились следующие особенности. Во всех случаях концентрация ацетилсалициловой кислоты, перешедшей при экстракции физиологическим раствором в водную фазу (степень извлечения), вычисленная на основании экспериментов с матричными растворами чистой субстанции, составила $84,7 \pm 5,6\%$ (концентрация АСК в физрастворе $8,5 \pm 0,5$ мкг/мл). Экспериментально определенная концентрация АСК во всех

исследуемых образцах находилась также в этих пределах ($8,6 \pm 0,7$ мкг/мл).

Таким образом, полученные различия в активности, по всей видимости, не связаны с концентрацией действующего начала. На основании проведенных исследований можно предположить, что разработанная методика оценки биоэквивалентности одного препарата с использованием неспецифического биосенсора в дальнейшем может послужить основой для разработки сертифицированной методики оценки биоэквивалентности препаратов на этапе их регистрации [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арзамасцев А.П., Дорофеев В.Л., Коновалов А.А. и др. // Хим.-фарм. ж. 2004. **38**. № 3. С. 38.
2. Кондаков С.Э., Мельников М.Я., Козаченко П.Н., Блынская Е.В., Алексеев К.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. **50**. С. 153.
3. Kindzelskii A.L., Zhou M.-J., Haugland R.P., Boxer L.A., Petty H.A. // Biophys. J. 1998. **74**. P. 90.
4. Воейков В.Л., Гурфинкель Ю.И., Дмитриев А.Ю., Кондаков С.Э. // Докл. РАН. 1998. **359**. № 5. С. 686.
5. Кондаков С.Э., Мельников М.Я., Токарев А.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2008. **49**. С. 238.
6. Gurfinkel Yu., Bouravleva E., Voeikov V. // Biorheology. 2002. **39**. N 5. P. 675.
7. Тенцова А.И., Козлова Л.М. // Биофармация. Учеб.-метод. пособие. М., 1978.
8. Panchagnula P., Thomas N. // Int. J. Pharmac. 2000. P. 131.
9. Хабриев П.У., Ягудина Р.И. // Хим.-фарм. ж. 2003. **37**. № 8. С. 41.
10. Королев А.В., Боковикова Т.Н., Лутцева А.И., Милкина С.Е., Нечаева Е.Б., Садчикова Н.П. // Хим.-фарм. ж. 2009. **43**. № 3. С. 49.

Поступила в редакцию 02.03.10

APPLICATION OF THE BLOOD SEDIMENTATION PROCESSES AS A NONSPECIFIC BIOSENSORS FOR THE BIOEQUIVALENCE MONITORING OF PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS ON THE BASIS OF ONE CHEMICAL ENTRIES (ACETYLSALICYLIC ACID)

S.E. Kondakov, M.Ya. Melnikov, Ye.V. Blynskaya, K.V. Alekseev

(Division of Kinetic Chemistry)

The application of blood cell sedimentation for the monitoring of the bioequivalence of the drugs based on acetylsalicylic acid was shown.

Key words: drug bioequivalence, blood cells sedimentation, application biosensors in pharmacy.

Сведения об авторах: Кондаков Сергей Эмильевич – ст. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ, докт. фарм. наук (495)9391814); Мельников Михаил Яковлевич – зав. лабораторией химической кинетики химического факультета МГУ, докт. хим. наук (melnikov46@mail.ru); Блынская Евгения Викторовна – аспирант кафедры фармакологии ГОУ ВПО ММА им И.М. Сеченова, мл. науч. сотр. лаборатории готовых лекарственных форм ГУ НИИ им. В.В. Закусова РАМН; Алексеев Константин Викторович – зав. лабораторией готовых лекарственных форм ГУ НИИ им. В.В. Закусова РАМН, докт. фарм. наук.