

КОРОБКО ВАЛЕНТИНА МИХАЙЛОВНА

**РАЗРАБОТКА И
СТАНДАРТИЗАЦИЯ НИТРОКСИДСОДЕРЖАЩЕГО
РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО ПРЕПАРАТА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2016

Диссертационная работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор **Мельникова Нина Борисовна**

Официальные оппоненты:

Потанина Ольга Георгиевна – доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», центр научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра), директор;

Шорманов Владимир Камбулатович – доктор фармацевтических наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической, токсикологической и аналитической химии, профессор кафедры.

Ведущая организация: государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Казань.

Защита состоится 3 июня 2016 г. в ____:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан « ____ » марта 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Монооксид азота - важнейший регулятор эндотелиальной релаксации сосудов, передачи нервных сигналов, обеспечивает антибактериальное, кардиологическое, иммуностимулирующее, цитотоксическое, противовоспалительное и антиоксидантное действия.

Особый интерес вызывают лекарственные средства (ЛС), содержащие в своем составе NO-донирующий фрагмент (нитриты, нитраты и др.), способный высвободить NO под действием ферментов. К ним относится группа NO-НПВС, превосходящая свойства исходного НПВС, и обладающая противоопухолевым, обезболивающим, антитромбоцитным действиями без негативного влияния на слизистую желудка (А.М. Qandil, 2012). Предложено лечение онкологических, сердечно-сосудистых заболеваний и раневых процессов, использующее NO либо в газообразном состоянии, либо получаемого из сложных нитроксидных комплексов азот- и серосодержащих соединений в присутствии ионов железа (С.М. Алдошин, 2011, А.Ф. Ванин, 2008). Однако эти ЛС несовершенны, поскольку выделяемый NO трудно дозировать вследствие быстрого окисления на воздухе, имеют низкую биодоступность и возникают сложности при их стандартизации.

Близкими к NO свойствами обладают нитроксидные соединения, содержащие в своем составе стабильные радикалы, такие как ТЕМПО (2,2,6,6 - тетраметилпиперидин-1-оксил радикал), например, ТЕМПО - НПВС.

Производные ТЕМПО являются эффективными антиоксидантами и могут быть использованы в качестве имитации супероксиддисмутазы (SOD) и NO. Достоинством производных ТЕМПО, в отличие от NO-высвобождающих ЛС, является возможность изучения физико-химических закономерностей при создании новых ЛС, содержащих нитроксидные соединения, используя ТЕМПО как спиновую метку, на биомиметической модели red-ox процессов с участием NO частиц и ионов железа.

Изучение свойств нитрозильных комплексов цитохрома *c* (cyt c^{3+} /cyt c^{2+}), полученных под действием доступных нитро- и нитроксидсодержащих ЛВ в различных условиях, позволяет сформулировать требования для получения новых NO-высвобождающих ЛС.

Степень разработанности темы. Ранее показана возможность образования Fe-содержащих нитрозильных комплексов и последующей генерации NO из серосодержащих ЛВ, диэтилдитиокарбаматов, тиолатов (С.М. Алдошин, Н.А. Санина, 2008), 5-нитрофуранов и $K_4[Fe(CN)_6]$ (Н.Б. Григорьев, В.Г. Граник, 1999). Быстрое окисление NO и превращение его в токсичные пероксинитритные частицы не позволяют создать стабильные NO-генерирующие ЛС в этих системах.

Продемонстрированы противоопухолевые свойства бис-нитроксидного малонатного метанофуллерена ((NO[•])₂-МФ) (И.А. Нуретдинов, 2007). Антиоксидантная активность, стабильность и способность (NO[•])₂-МФ образовывать ленгмюровские и адслои делают это соединение удобной биомиметической моделью изучения red-ox свойств NO-содержащих соединений по отношению к ЛВ, а также компонентом NO-ЛС.

Следует отметить, что, несмотря на перспективность NO-высвобождающих ЛС как для системного, так и для наружного использования, серьезные исследования по разработке новых NO-ЛС из доступных NO-содержащих ЛВ не проводились и на фармацевтическом рынке такие ЛС отсутствуют.

Целью настоящей работы является исследование физико-химических свойств нитроксидных и нитроксид-высвобождающих соединений, и разработка ранозаживляющего препарата, содержащих эти соединения.

Для достижения поставленной цели необходимо решить **следующие задачи**:

1. Изучение восстановления NO-фрагментом цитохрома *c* – cyt *c*³⁺ на биомиметической модели NO-радикальной активности с использованием бис-нитроксидного малонатного метанофуллерена ((NO[•])₂-МФ).

2. Исследование влияния (NO[•])₂-МФ как соединения со стабильным NO-радикалом на антиоксидантные свойства ксимедона.

3. Экспериментальное обоснование состава ранозаживляющего препарата с натрия нитритом, генерирующим монооксид азота и нитроксидные комплексы в растворах, и условий регулируемого высвобождения NO.

4. Выбор NO-высвобождающих компонентов из класса антибактериальных нитропрепаратов и обоснование состава противоожогового порошка наружного применения.

5. Изучение ранозаживляющих и вазодилатирующих свойств разрабатываемого ранозаживляющего препарата, содержащего нитропрепараты, в эксперименте на животных на модели ожоговой раны.

6. Разработка методов идентификации и количественного определения всех компонентов противоожогового порошка.

7. Проведение валидационной оценки методов количественного определения всех компонентов противоожогового порошка.

Научная новизна.

- Впервые установлена роль цитохрома *c* как маркера окислительно-восстановительных процессов с участием нитроксидного фрагмента – аналога монооксида азота, на примере нитроксидного метанофуллерена ((NO[•])₂-МФ). Выявлено влияние (NO[•])₂-МФ на увеличение антиоксидантной активности каталазы и SOD под действием ксимедона в эксперименте на крысах.

- Впервые разработаны составы новых противоожоговых препаратов, содержащие NO-высвобождающий компонент, эффективность которых доказана в эксперименте на крысах.

- Впервые разработаны методики идентификации и количественного определения 5-нитрофурала и натрия аскорбата с использованием УФ-спектроскопии и ОФ ВЭЖ хроматографии, а также количественного определения железа в сульфиде и цинка в цинка оксиде в порошке. Все методики удовлетворяют требованиям по правильности, воспроизводимости, линейности и сходимости.

Научно-практическая значимость и внедрение результатов исследования.

Обоснованы составы новых противоожоговых препаратов, содержащих NO-высвобождающий компонент. Изучены ранозаживляющие и вазодилатирующие свойства разрабатываемого ранозаживляющего препарата. Проведена валидационная оценка методов количественного определения всех компонентов противоожогового порошка. Результаты диссертационных исследований используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, а также в учебный процесс государственного бюджетного образовательного учреждения среднего профессионального образования Нижегородской области «Нижегородский медицинский базовый колледж». Полученные данные используются в системе мониторинга качества лекарственных средств в государственном автономном учреждении здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств».

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования построена на изучении и обобщении литературных данных по изучению физико-химических, фармакологических свойств монооксида азота, NO-высвобождающих соединений, и препаратов на их основе. В соответствии с поставленной целью и вытекающими из нее задачами разработан план выполнения диссертационной работы, определены объекты научного исследования и подобран перечень современных методов изучения.

Работа была выполнена с использованием современных физико-химических методов анализа (UV-vis спектроскопия, тензиометрические измерения, ЭПР-спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография, атомно-абсорбционная спектрофотометрия, биохемилюминесцентный анализ). Полученные результаты систематизированы и статически обработаны, на основании этого сделаны выводы и даны практические рекомендации.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-

исследовательских работ ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России (номер государственной регистрации 01201063248) по научной проблеме «Разработка и исследование новых лекарственных средств на основе природных и синтетических веществ».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия по нескольким областям исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты физико-химических исследований (электронная спектроскопия, спектроскопия ЭПР, тензиометрический метод изучения π -А изотерм монослоев, потенциометрия, методики определения концентрации монооксида азота и нитроксидных частиц) окислительно-восстановительного взаимодействия нитроксидных соединений с биологически активными веществами.

2. Доказательства (эксперимент на крысах) усиления антиоксидантной и репаративной активности препаратов с ксимедоном под действием NO-радикального фрагмента бис-нитроксидного метанофуллерена.

3. Экспериментальное обоснование оптимального состава нитроксид-генерирующего противоожогового порошка с 5-нитрофуралом.

4. Результаты по изучению вазодилатирующих и репаративных свойств препарата, содержащего 5-нитрофурал, цитохром *c*, натрия аскорбат, цинка оксид и крахмал.

5. Методика идентификации и количественного определения УФ-спектрального и ОФ ВЭЖ-хроматографического анализов 5-нитрофунала и натрия аскорбата в сложной лекарственной форме – порошке.

6. Методика идентификации и количественного определения УФ-спектрального и атомно-абсорбционного спектрального анализов цитохрома *c* в порошке.

7. Результаты валидационной характеристики методик количественного определения по показателям линейности, воспроизводимости, сходимости, правильности всех компонентов порошка.

Степень достоверности научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на XI научной сессии молодых ученых и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2012); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Озон, активные формы кислорода, оксид азота и высокоинтенсивные физические факторы в биологии и медицине» (Нижний Новгород, 2013); I Всероссийской XII ежегодной научной сессии

молодых ученых и студентов с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2013); II Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (Белгород, 2014); II Всероссийской с международным участием XIII научной сессии молодых ученых и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2015 г.); III Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины в современных условиях» (Санкт-Петербург, 2016 г.); VIII Международной научно-практической конференции «Приоритетные направления развития науки и образования». (г. Чебоксары, 2016); XXIV Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные и прикладные исследования проблемы и результаты» (г. Новосибирск, 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 5 в журналах, включенных ВАК Минобрнауки РФ в перечень рецензируемых научных изданий.

Личный вклад автора. Результаты, приведённые в диссертации, получены при непосредственном участии автора в проведении физико-химических и биологических исследований препаратов, содержащих нитроксидные или нитроксидгенерирующие соединения. Автор является основным исполнителем написания публикаций по теме диссертации и разработке методик контроля качества компонентов препарата и нормативной документации на предложенный состав порошка.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной методам и объектам исследования, двух глав собственных исследований, выводов, списка литературы, включающего 160 наименований отечественных и зарубежных авторов и приложений. Работа изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 29 рисунков, 19 схем.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика объектов и методов исследования

Материалы и реактивы: «Цитохром *c*» (из сердца лошади) ($\geq 95\%$, lot STBV7839V, «Fluka» (USA) «Sigma-Aldrich»); Нитрофура́л ($\geq 97\%$, «Aldrich» (USA) «Sigma-Aldrich», Product Number: 59870); Натрия нитрит ($>99,9\%$); Метронидазол ($>99,8\%$); Нитроксолин ($>99,8\%$); ТЕМПО свободный радикал (2,2,6,6 – тетраметилпиперидин-1-оксил радикал) ($>99\%$) синтезирован в НИОХ СОРАН; Биснитроксидный малонатный метанофуллерен был синтезирован и охарактеризован в КНЦ им. Арбузова в лаборатории И.А. Нуретдинова; Натрия аскорбат ($\geq 99\%$, lot BCBJ1585V, «Fluka» (USA), «Sigma-Aldrich»); Ксимедон (1-(β -оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксопиримидин), НППФГУП «Кристалл», г. Дзержинск Ниж. обл.; Набор для определения метаболитов NO (Nitrite/Nitrate assay kit colorimetric) lot BCBQ 5244V,

(Japan) «Sigma», Product Number 23479; Оксид цинка (ГОСТ 10262-73); Крахмал ($\geq 95\%$, «Fluka» (USA) «Sigma-Aldrich», Product Number: 9005-25-8); ацетонитрил для хроматографии сорт 0 (ТУ 2636-040-44493179-00); вода очищенная, полученная на установке «Elix-3» фирмы «MILLIPORE», удельное сопротивление менее $0,2 \mu\text{См}$.

Состав препаратов (%): Геля, ($\omega, \%$): натрия гиалуронат – 1,0; натрия аскорбат – 0,1; сукс – 0,05; метилпарабен – 0,15; спирт этиловый – 0,08; воды до 100. Натрия нитрит (NaNO_2) (0,1-1%) добавляли в гель перед применением. Состав порошка, ($\omega, \%$): сукс – 0,05; натрия аскорбат – 0,1; 5-нитрофураил (метронидазол, нитроксолин) – 0,5; крахмала до 100. При использовании комбинированной ЛФ – гель+порошок порошок с нитросодержащими ЛВ добавляли в гель, непосредственно перед нанесением на рану.

Методы исследования и приборы: Электронные спектры поглощения были получены на приборе «Bioline Specord S-100» (Analytik Jena, Germany) в области 190-600 нм, толщина кварцевой кюветы 10 мм; ЭПР-спектры регистрировали на Bruker EMX спектрометре при комнатной температуре; ВЭЖ-хроматограммы были получены с использованием ВЭЖ-хроматографа Shimadzu LC-10 Avp (Japan) в обращенно-фазовом режиме с дегазатором подвижной фазы, термостатом колонки с диодно-матричным УФ-детектированием, колонка Discovery C18 (25 см x 4.6 mm, 5 μm , Supelco). Объем вводимой пробы – 20 мкл; Элементный анализ на содержание Fe, Zn проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре (ААС) Shimadzu AA 7000; pH контролировали на pH-метре «pH-150M», РУП (Гомельский завод измер. приборов, Белоруссия). Состояние микроциркуляторного русла оценивали методом лазерной доплеровской флуометрии с помощью аппаратно-программного комплекса «ЛАКК-М-2» (НПП «Лазма», Москва). Тензиометрические измерения и получения изотерм сжатия π -А проводили на установке состоящей из тefлоновой ванны и весов Ленгмюра (KSV Nima) с использованием деионизованной воды при pH 5,5 субфазы и $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Поверхностное давление $\pi = \gamma_0 - \gamma$, где γ_0 и γ [$\text{мН} \cdot \text{м}^{-1}$] – поверхностное натяжение до и после нанесения монослоя. Молекулярную площадь A_0 $(\text{NO})_2$ -МФ определяли графически в точки пересечения линейной части π -А изотермы и горизонтальной оси.

Медико-биологические исследования. Фармакологическую активность композиции исследовали в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (А.Н. Миронов, 2012) на крысах-самцах линии Вистар массой ($M \pm s$) $200 \pm 2,6$ г. Контактный термический ожог нанесен под наркозом (площадь – 20% поверхности тела). После моделирования термической травмы животным основной группы в течение 10 дней на раневую поверхность наносили ранозаживляющий препарат.

Состояние микроциркуляторного русла оценивали в месте воздействия сразу же по его завершении методом лазерной доплеровской флуометрии с помощью аппарата

ЛАКК-02. Изучали интенсивность микроциркуляции, активность ее регуляторных компонентов и степень участия шунтирующих путей с учетом особенностей интервалов частотных диапазонов колебаний кровотока по микрососудам у крыс.

Исследование variability сердечного ритма производили с применением комплекса «Нейрософт» (Иваново) в собственной адаптации процедуры регистрации электрокардиограммы и обработки результатов.

Статистическую обработку проводили по программе Statistica 7,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Биомиметическое окислительно-восстановительное взаимодействие нитроксидных соединений с ЛВ.

UV-vis спектры продуктов взаимодействия газообразного NO с *cyt c* и NO, полученного *in situ* под действием NaNO₂ и натрия аскорбата в водной среде, показали их сходство (Рисунок 1). В течение первых 10 минут образовывался нитрозильный комплекс *cyt c*, характеризующийся интенсивной полосой при 358 нм, и восстановленная форма *cyt c*²⁺, проявляющаяся в спектрах смещением γ-полосы от 410 до 415 нм и появлением слабых полос 550 нм (α) и 520 нм (β).

После выдержки на воздухе более 30 минут *cyt c*²⁺ полностью окислялся (Рисунок 1б, врезка), при этом концентрация NO-содержащих частиц практически не изменялась (пробы с реактивом Грисса).

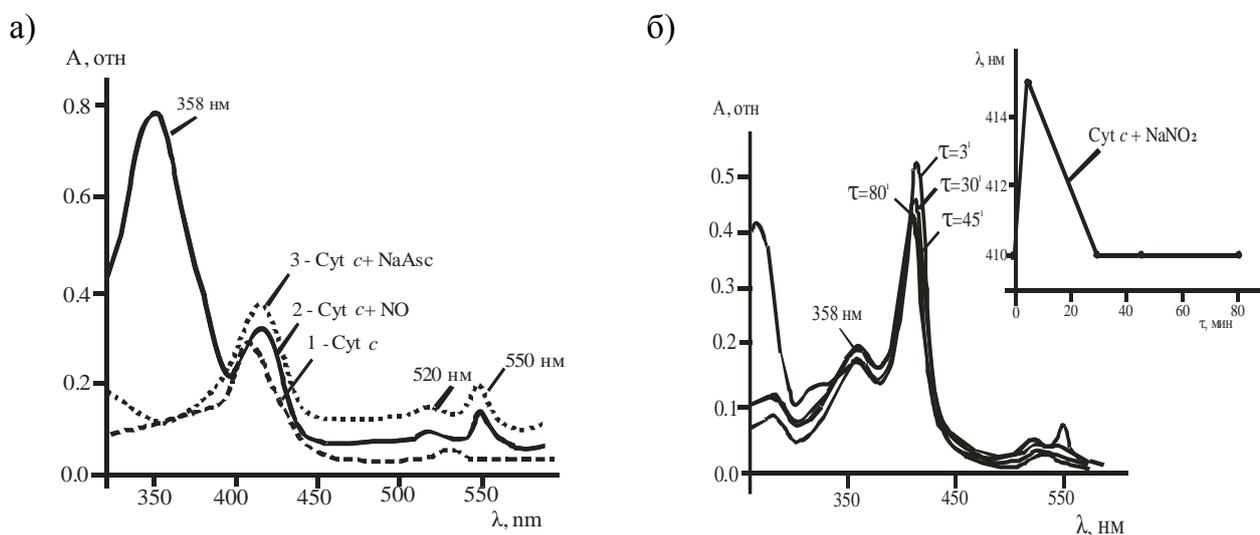


Рисунок 1. Электронные спектры раствора *cyt c*: **а)** 2.4·μМ *cyt c*– окисленная форма – в воде (кривая 1), 2.4·μМ *cyt c* после добавления монооксида азота (кривая 2), 3.5·μМ *cyt c*– восстановленная форма – после добавления 5·10⁻⁴ М натрия аскорбата (кривая 3); **б)** реакционная смесь 1·10⁻⁵ М *cyt c*, 1.45·10⁻² М натрия нитрита, 5·10⁻⁴ М натрия аскорбата, 8.5·10⁻³ М янтарной кислоты во времени. Врезка показывает зависимость λ = f (τ).

Таким образом, *cyt c* может выступать как в роли индикатора взаимодействия с NO частицами, нестабильными на воздухе в водной среде, при контроле видимой части электронного спектра, так и компонентом NO-генерирующего ЛС.

1.1. Биомиметическое взаимодействие нитроксидных соединений с цитохромом *c*.

UV-vis спектры раствора *cyt c* после его взаимодействия с ТЕМПО или (NO[•])₂-МФ, сорбированных на SiO₂ изменялись во времени (Рисунок 2). В течение первых 30 минут появлялись полосы α- (550 нм) и β- (520 нм), характерные для *cyt c*²⁺, а γ-полоса изменила своё положение до 415 нм. В дальнейшем положение γ-полосы в присутствии ТЕМПО указывало на быстрое окисление *cyt c*²⁺. В отличие от этого под действием (NO[•])₂-МФ *cyt c*³⁺ медленно восстанавливался до *cyt c*²⁺, что характеризует (NO[•])₂-МФ как сильный антиоксидант, red-ox потенциал которого меньше чем у *cyt c*.

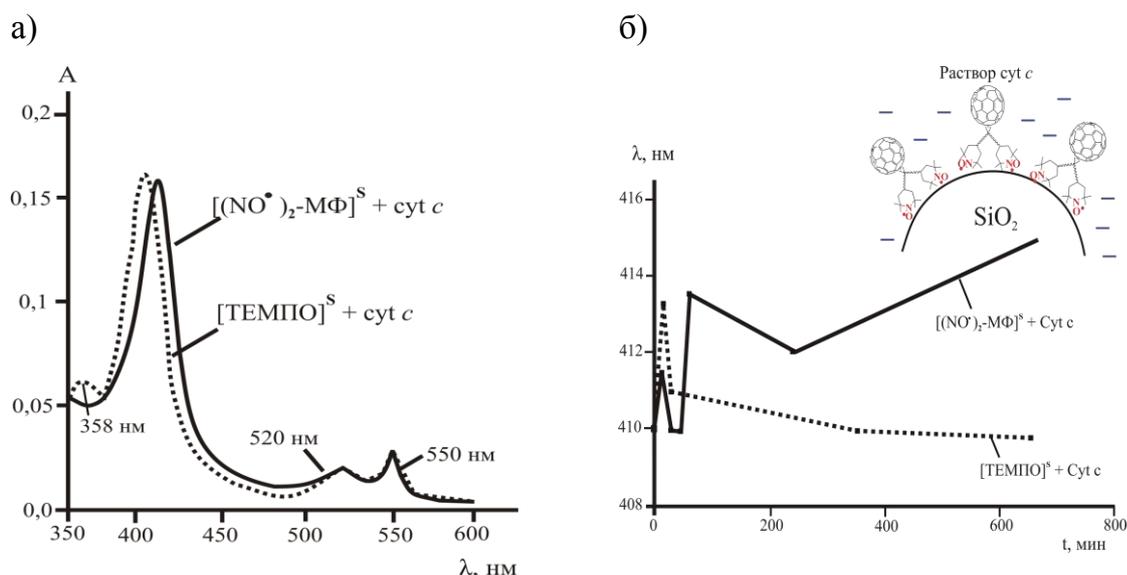


Рисунок 2. Данные UV-vis спектров раствора *cyt c* после обработки сорбированным ТЕМПО (пунктирная линия) или (NO[•])₂-МФ (сплошная линия) на SiO₂. **а)** $A=f(\lambda)$; **б)** $\lambda=f(\tau)$, где τ – время взаимодействия *cyt c* с сорбентом.

Для доказательства участия NO-фрагмента водонерастворимого (NO[•])₂-МФ в восстановлении *cyt c*³⁺ на межфазной границе «водный раствор *cyt c*» - (NO[•])₂-МФ изучено их взаимодействие с использованием ленгмюровских монослоев (NO[•])₂-МФ на водной поверхности (субфазе) *cyt c*. Изменение структуры NO-фрагмента в монослоях (NO[•])₂-МФ под действием *cyt c* устанавливали по зависимости молекулярной площади A_0 (NO[•])₂-МФ от концентрации *cyt c*, имеющий вид изотермы адсорбции ленгмюровского типа: A_0 увеличивалась в 1,5 раза от 0,88 до 1,40 нм² (Рисунок 3).

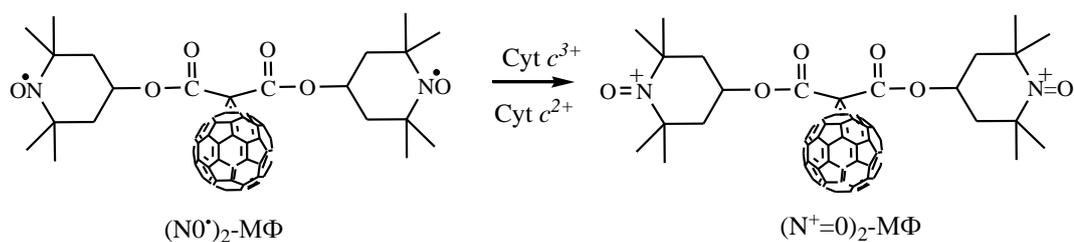


Схема 1. Окислительно-восстановительная реакция (NO[•])₂-МФ с *cyt c*.

Существенное увеличение A_0 на межфазной границе «монослой $(NO)_2$ -МФ-сyt c» свидетельствует о возникновении заряд-зарядных взаимодействий, приводящих к отталкиванию молекул в монослой. Наиболее вероятно, что отталкивание молекул в монослой обусловлено превращением нитроксидного фрагмента в N-оксоаммониевый ион.

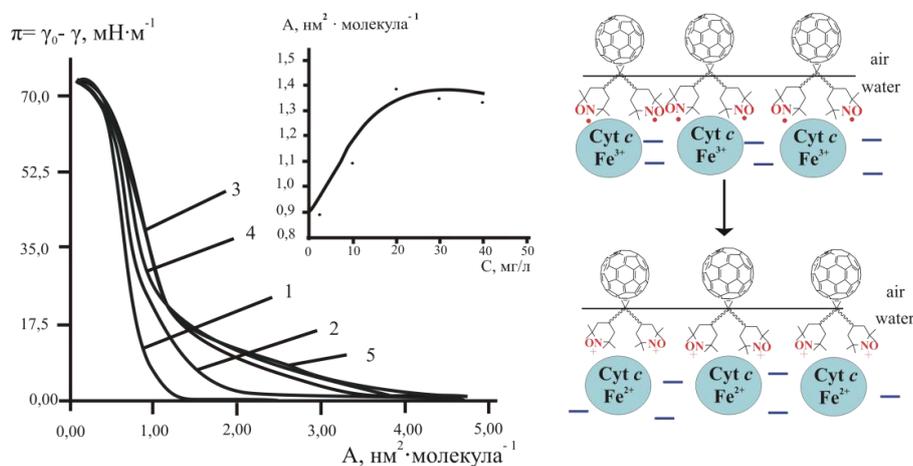


Рисунок 3. Изотерма сжатия $\pi = f(A)$ монослоев $(NO)_2$ -МФ при различных концентрациях cyt c (мг/л). Врезка показывает зависимость молекулярной площади A_0 от концентрации cyt c.

Изменения нитроксидного радикала в $(NO)_2$ -МФ подтверждали методом ЭПР при переносе монослоев $(NO)_2$ -МФ на кварц с последующим его погружением в раствор cyt c (Рисунок 4).

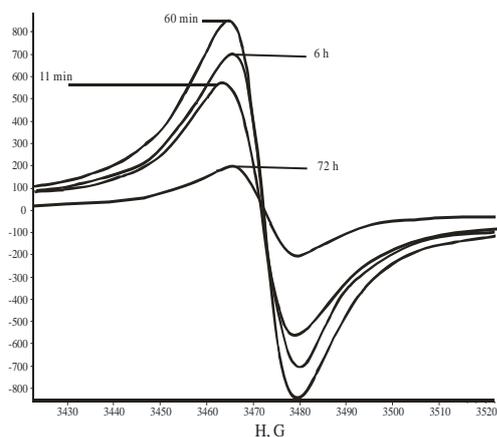


Рисунок 4. ЭПР спектры тонких пленок $(NO)_2$ -МФ на кварце после погружения в раствор $4 \cdot 10^{-5} M$ cyt c во времени: раствора cyt c: 1-11 мин, 2 - 60 мин, 3 - 6 часов, 4 – 72 часа.

Интенсивность сигнала NO в ЭПР спектрах изменялась во времени и практически была равна нулю после 72 ч контакта, что доказывает исчезновение радикального фрагмента, подтверждая высказанные предположения.

1.2. Влияние $(NO)_2$ -МФ на восстановление окисленных форм антиоксидантов и на их антиоксидантную активность.

УФ-спектральными исследованиями была доказана способность $(NO)_2$ -МФ восстанавливать окисленную форму антиоксиданта – дигидрокверцетина (ДКВ) в хиноидной форме (Рисунок 5). Под действием $(NO)_2$ -МФ вновь появлялась полоса поглощения $\lambda_{\max}=290$ нм, характеризующая исходный ДКВ.

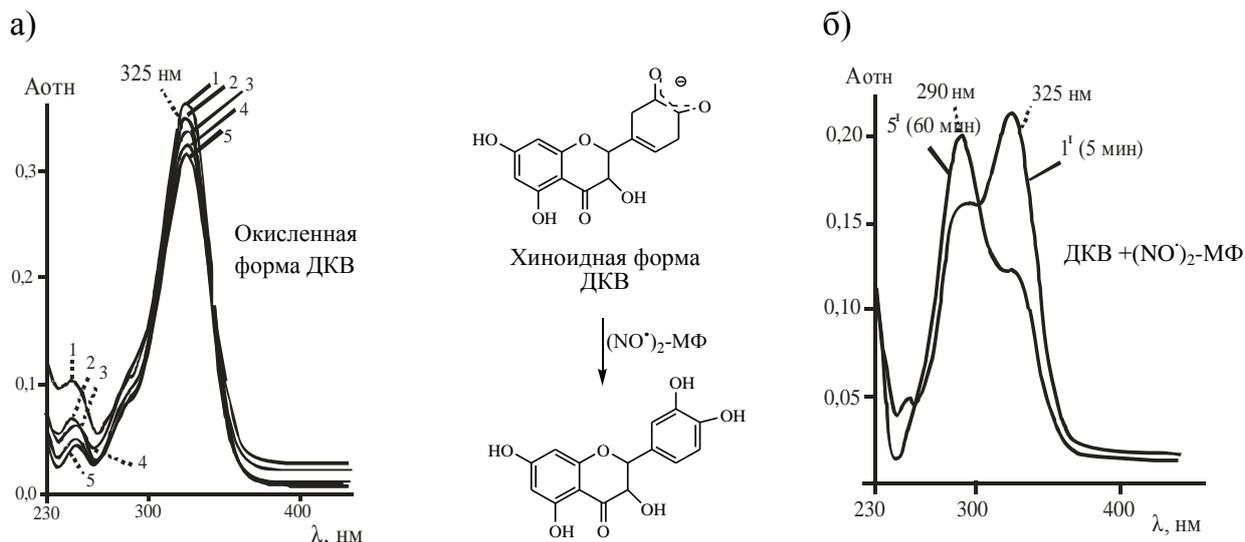


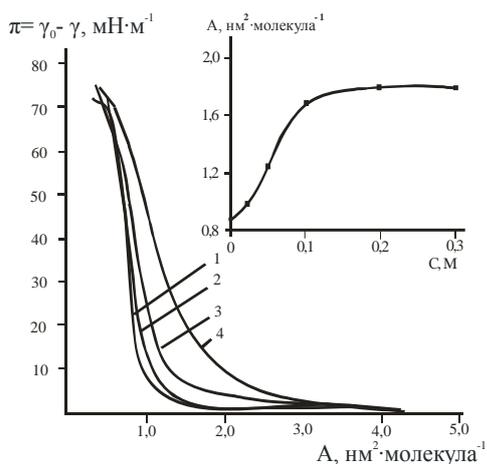
Рисунок 5. Электронные спектры $2 \cdot 10^{-5}$ М ДКВ в растворе $4 \cdot 10^{-5}$ М NaOH во времени: **а)** 1 – 5 мин; 2 – 10 мин; 3 – 25 мин; 4 – 40 мин; 5 – 60 мин; **б)** в присутствии $(NO)_2$ -МФ: 1' – 5 мин; 2' – 60 мин.

Антиоксидантная активность смеси $(NO)_2$ -МФ и ДКВ была изучена на крови крыс хемилюминесцентным анализом по интенсивности липидной пероксидации, вызванной ионами железа и пероксидом водорода. Антиоксидантная активность ($I/S \cdot 10^2$) ДКВ увеличивалась в присутствии $(NO)_2$ -МФ от 5,40 до 8,11 и нормализация скорости ПОЛ ($-tg2\alpha$) уменьшалась от 0,17 до 0,14. Анализ продуктов ПОЛ на первой стадии – диеновых конъюгатов (ДК) и триеновых конъюгатов (ТК) и оснований Шиффа (ОШ) показал двухкратное увеличение этих параметров (ДК от 0,21 до 0,16, ТК от 0,04 до 0,02, ОШ от 4,24 до 2,17), подтверждает увеличение антиоксидантной активности ДКВ.

Эти результаты могут быть использованы для исследования антиоксидантной активности синтетических ЛС, например, ксимедона - регенеранта и репаранта, не проявляющих, как ДКВ, свойств восстановителя.

Биомиметическое исследование влияния ксимедона на $(NO)_2$ -МФ в ленгмюровских монослоях характеризует интенсивное взаимодействие нитроксида фрагмента с ксимедоном, о чем свидетельствует двухкратное увеличение молекулярной

площади A_0 $(NO)_2$ -МФ, обусловленное силами отталкивания N-оксоаммониевыми катионами, аналогично схеме 1.



$C_{\text{ксимедона}}, M$	$A_0 \pm 0.02,$ $nm^2 \cdot \text{молекула}^{-1}$
-	0.88
0.025	0.98
0.05	1.26
0.1	1.70
0.2	1.70
0.3	1.70

Рисунок 6. π - A изотерма монослоя $(NO)_2$ -МФ над водной субфазой, содержащей ксимедон. Врезка показывает зависимость $A_0=f(C)$.

Эксперименты на крысах подтвердили улучшение антиоксидантных свойств мази ксимедона в присутствии $(NO)_2$ -МФ (Таблица 1).

Таблица 1. Эффективность лечения ожоговых ран мазью с ксимедоном в эксперименте на крысах.

Наблюдаемые явления		Ксимедон (10 %) Контроль 1	$(NO)_2$ -МФ (0,001 %)+ Ксимедон (10 %)	Контроль 2 Без лечения
Грануляция, дни		3	3	4
Очищение раны, дни		5	4	7
Колонизация, $CFU \cdot ml^{-1}$		$2,8 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$7,4 \cdot 10^8$
Увеличение площади раны, %	3 дня	81	80	89
	7 дней	62	55	68
	11 дней	25	20	45
Полное заживление, дни		14	12	19
Антиоксидантная активность каталазы (15 дней), $mmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ белка		2,7	3,8	1,4
Антиоксидантная активность СОД (15 дней), $mmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ белка		1700	2200	400

Таким образом, нами показано, что нитроксидный фрагмент в $(NO)_2$ -МФ способен улучшать антиоксидантные свойства ЛС, переводя компоненты в более активную форму. Наибольший интерес для практики представляет собой сочетание нитроксидных соединений с цитохромом c , который в присутствии NO -фрагмента переходит в более активную восстановленную форму c^{2+} .

2. Разработка ЛС, содержащий NO-высвобождающие компоненты.

2.1. Исследование физико-химических свойств комплексов нитропрепаратов с цитохромом с.

UV-Vis анализом показано, что при взаимодействии 5-нитрофурала, нитроксолина, метронидазола, а также натрия нитрита NaNO_2 с cyt c (cyt c^{3+}) в присутствии избытка аскорбиновой кислоты (AA) или натрия аскорбата (NaAsc) в растворе образуются комплексы cyt c^{2+} с нитропрепаратами, аналогично нитрозильным комплексам монооксида азота с cyt c (Рисунок 7, Рисунок 1). Особенностью нитрозильных комплексов cyt c^{2+} с нитропрепаратами является их стабильность: оптическая плотность реакционных растворов не изменялась в течение месяца.

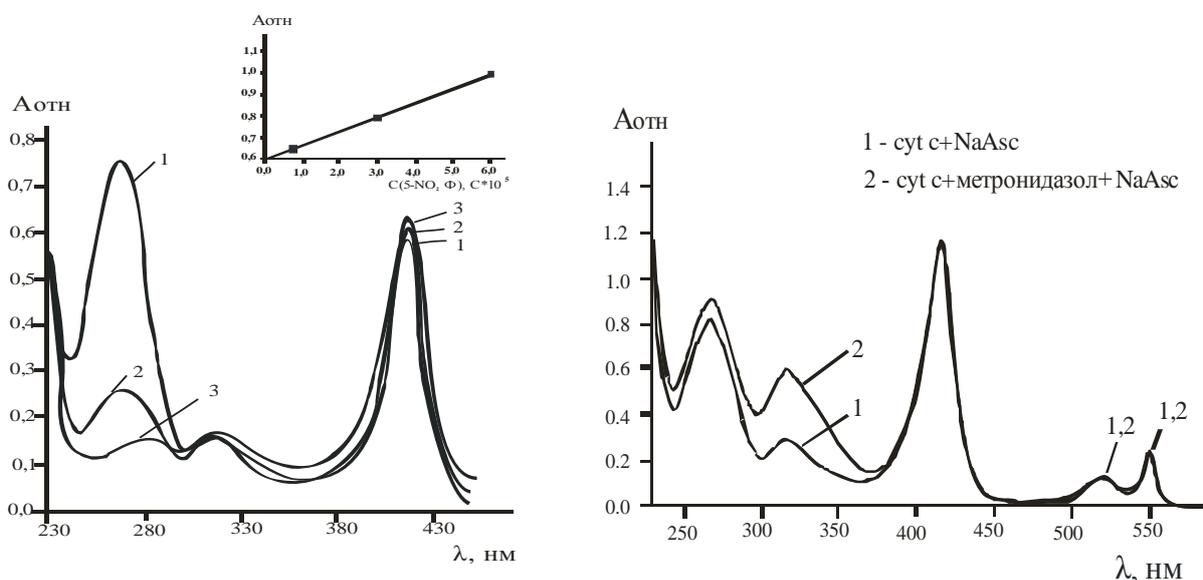


Рисунок 7. Электронные спектры реакционных смесей, содержащей растворы $1 \cdot 10^{-5}$ М cyt c и $5 \cdot 10^{-4}$ М NaAsc; **а)** с концентрацией 5-нитрофурала (М): 1 - $C=0$; 2 - $C=3 \cdot 10^{-5}$; 3 - $C=6 \cdot 10^{-5}$; **б)** с $1,8 \cdot 10^{-5}$ М раствором метронидазола (кривая 2).

Комплексообразование cyt c^{2+} с нитропрепаратами и затем с NO в реакционной смеси в течение первых 10 минут было подтверждено определением общей концентрации $[\text{NO}_x]$, которая равна $15 \pm 5,4 \mu\text{M}$ при $C_{5\text{-NO}_2\text{Ф}} = 30 \mu\text{M}$ и $22 \pm 5,8 \mu\text{M}$ при $C_{5\text{-NO}_2\text{Ф}} = 60 \mu\text{M}$, соответственно.

Эти результаты позволили нам предложить ранозаживляющий препарат для лечения ожогов следующего состава (масс. %): метронидазол или 5-нитрофураол, или их смесь 0,5-5,0; cyt c 0,05-0,1; AA или NaAsc 0,1-1,0; цинка оксид 0,1-1,0; крахмал картофельный до 100 г. Показано, что порошок удовлетворяет требованиям ГФ 12 ч.2 по: сыпучести - от 3,93 до 4,05 г/с; насыпной массе - 0,885-0,890 г/см³; степени измельчения порошка, определенного по ситовому анализу (очень мелкий порошок –

96% массы порошка проходит через сито номер 125 и 38% массы порошка проходит через сито номер 90).

Оценка эффективности ранозаживляющего препарата в эксперименте на крысах была проведена на модели ожоговой раны. В соответствии со стандартом ФГБУ «ННИИТО» Минздрава России (г. Нижний Новгород) перед нанесением порошка поверхность раны крыс смачивалась водным гелем крахмала.

Заживление ожоговых ран при лечении предлагаемой комбинированной ЛФ на 3, 7, 10-е сутки происходило быстрее, чем при лечении мази с 5-NO₂Ф. Наибольшее различие наблюдалось на 3-й и 7-й день: площадь ожоговой раны на 3-й день сократилась от 94% (контроль) до 83% (порошок); на 7-й день – от 80% (контроль) до 69% (порошок). Было установлено, что предлагаемый препарат обеспечивает увеличение показателя микроциркуляции (ПМ) в околораневой зоне как на третьи, так и на десятые сутки послеожогового периода по сравнению с контрольной группой (Рисунок 8).

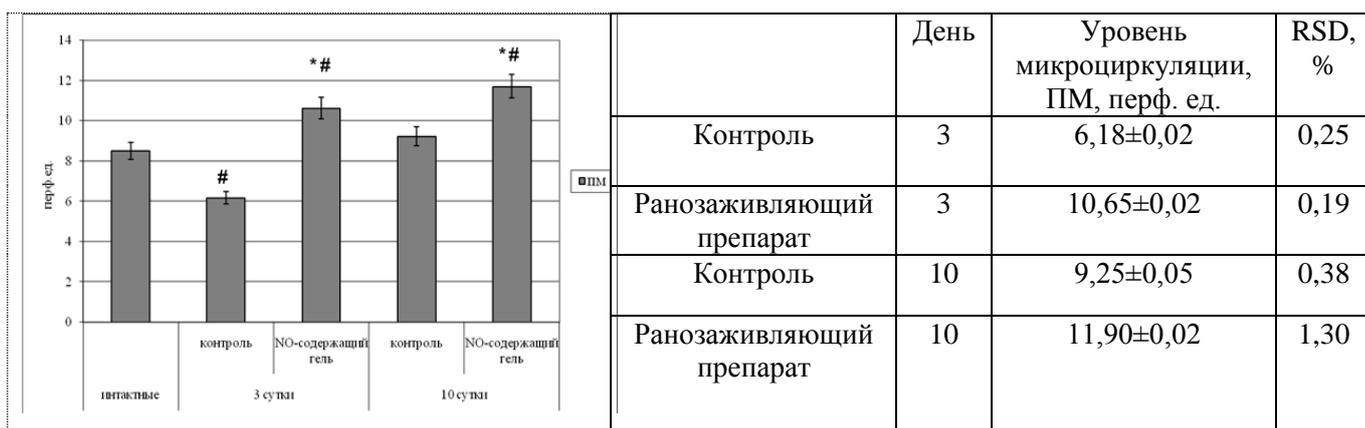


Рисунок 8. Уровень показателя микроциркуляции у животных с термической травмой в зависимости от примененного варианта местного лечения.

На предлагаемые составы ранозаживляющего препарата подана заявка об изобретении (Лекарственное средство для лечения поражений мягких тканей организма: заяв. №2015132729 (05.08.2015) / Мельникова Н.Б., Коробко В.М.; уведомление о положительном результате формальной экспертизы от 27.10.15).

Таким образом, нами обоснован состав ранозаживляющего препарата, способного в присутствии АА или NaAsc генерировать NO *in situ*, на основе нитропрепарата и сук с. В эксперименте на крысах на модели ожоговой раны установлен вазодилатирующий эффект порошка с 5-NO₂Ф, сук с, NaAsc, цинка оксидом и крахмалом стерильным на раннем этапе заживления.

3. Разработка методик анализа компонентов противоожогового порошка наружного применения с 5-нитрофуралом и цитохромом с

Общая схема предлагаемой пробоподготовки для анализа всех действующих веществ представлена ниже:

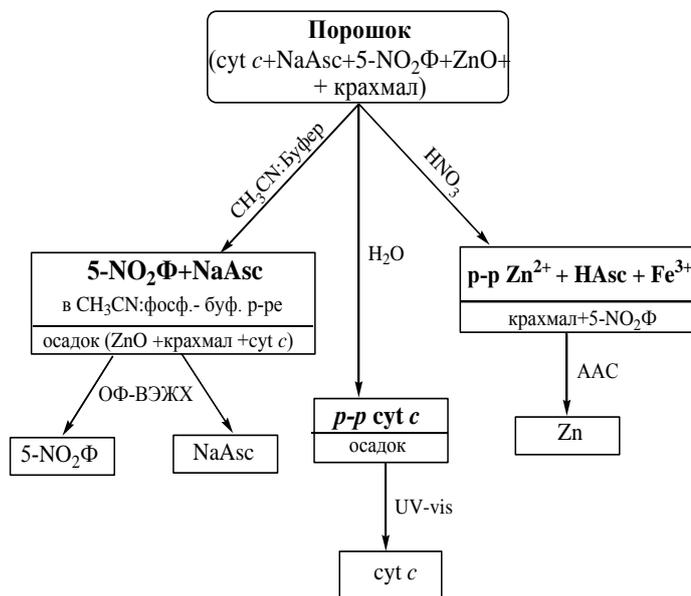


Схема 2. Общая схема анализа основных компонентов порошка.

Идентификацию 5-NO₂Ф проводили, используя визуальный тест (переход из желтой в оранжевый цвет аци-соли под действием 30% NaOH) и УФ – спектроскопию исходного водно-ацетонитрильного раствора ($\lambda=375$ нм) и раствора аци-соли (появление плеча $\lambda=450$ нм). NaAsc доказывали тестом с аммиачным раствором серебра по образованию черного осадка серебра.

5-NO₂Ф и NaAsc анализировали ОФ ВЭЖХ методом после растворения порошка в смеси ацетонитрил:фосфатный буферный раствор pH 6 при соотношении 27:73 и удаления нерастворимого осадка, содержащего cyt c, оксид цинка и крахмал (схема 2). Время выхода пика 5-NO₂Ф – 4,8 мин, NaAsc – 2,9 мин на хроматограммах растворов модельных смесей совпадало со временем выхода этих соединений в стандартных растворах в изократическом режиме при $t=35^{\circ}\text{C}$ (Рисунок 9).

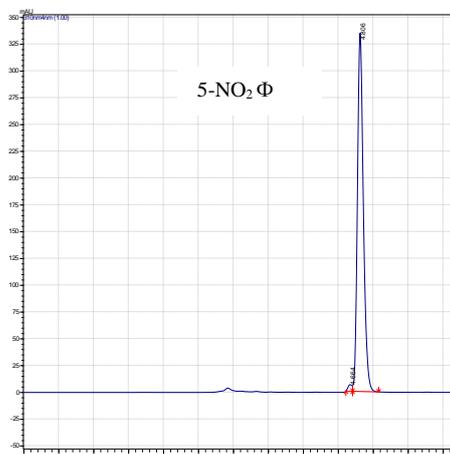
Определение *линейности* проводили на 3 уровнях концентраций для 5-NO₂Ф и для NaAsc от ожидаемых содержаний в порошке. *Линейность* оценивали по уравнению линейной регрессии, при коэффициенте корреляции r равным 0,99, имеющими вид: $y=1,980504e+007x$ (5-NO₂Ф) и $y=4,720793e+007x$ (NaAsc), соответственно. *Правильность* методики определяли методом «введено-найденно». Отношение количества введенного 5-NO₂Ф к найденному (X_{cp}) в % соответствовало 100,7 %, а

величина X_{cp} для NaAsc - 100,1 %, что характеризует методику как правильную (Таблица 2).

Таблица 2. Результаты ВЭЖХ анализа 5-NO₂Ф по методу «введено-найдено».

Введено, г	Найдено, г	Выход, %	Метрологические характеристики
0,25	0,24	96	$X_{cp}=100,7$ $SD=5,15$ $RSD=0,51\%$ $E=4,21\%$
0,25	0,27	108	
0,25	0,26	106	
0,5	0,49	98	
0,5	0,48	96	
0,5	0,52	104	
0,75	0,77	102	
0,75	0,72	96	
0,75	0,76	101	

а)



б)

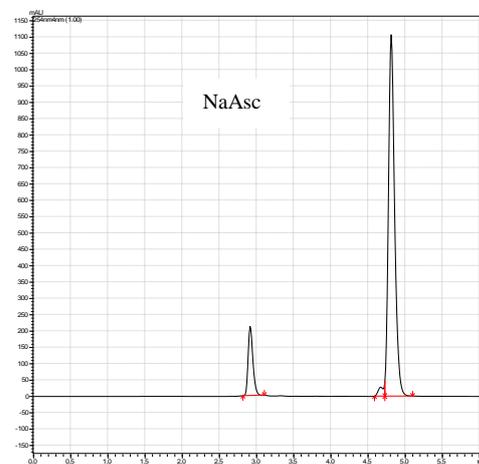


Рисунок 9. Хроматограммы модельных смесей, содержащих 5-NO₂Ф и NaAsc, и калибровочные графики действующих веществ: **а)** - модельной смеси 2, содержащей 0,1 мг/мл 5-NO₂Ф при постоянстве концентраций остальных действующих веществ; **б)** - модельной смеси 5, содержащей 0,02 мг/мл NaAsc при постоянстве концентраций остальных действующих веществ.

Таблица 3. Результаты количественного определения (ВЭЖХ) NaAsc по методу «введено-найдено»

Введено, г	Найдено, г	Выход, %	Метрологические характеристики
0,05	0,049	98	$X_{cp}=100,1$ $SD=9,48$ $RSD=0,94\%$ $E=7,44\%$
0,05	0,051	102	
0,05	0,048	96	
0,1	0,09	90	
0,1	0,11	110	
0,1	0,12	120	
0,15	0,14	93	
0,15	0,16	106	
0,15	0,13	86	

Методика удовлетворяет требования по *сходимости* для обоих анализируемых компонентов - 5-NO₂Ф и NaAsc, о чем свидетельствуют критерии приемлемости RSD%=0,51% и RSD%=0,94%, соответственно.

Идентификацию *сyt c* в порошке проводили после его растворения в воде и удаления нерастворимого осадка, анализируя видимую область спектра ($\lambda=410-415, 520, 550$ нм). Количественное определение проводили методом ААС после растворения его в концентрированной азотной кислоте, используя лампу полого катода с $\lambda = 248,33$ нм, в газовой среде - аргон. Результаты с использованием калибровочного графика (уравнение $Abs = y = 0.0284 C_{Fe} - 0.0507$, где $[C_{Fe}] = \text{мкг/л}$) в таблице 4.

Таблица 4. Результаты анализа железа методом ААС

Действие	Истинное значение концентрации и (мкг/л)	Концентрация (мкг/л)	Абсорбция	RSD, %	SD
STD-1	2.000	1.7401	0.0013	6.12	0.023
STD-2	2.000	2.2892	0.0143		
STD-3	2.000	1.8774	0.0026		
STD-AV	2.000	1.9689	0.0052		
STD-1	6.000	5.4533	0.1042	4.14	0.025
STD-2	6.000	3.6161	0.0520		
STD-3	6.000	6.6711	0.1388		
STD-AV	6.000	6.0622	0.1215		
STD-1	10.000	9.2720	0.2127	5.58	0.027
STD-2	10.000	9.5888	0.2217		
STD-3	10.000	11.0494	0.2632		
STD-AV	10.000	9.9689	0.2325		
Cyt c		4.4803	0.1271	6.06	0.024
Cyt c		4.4921	0.1123		
Cyt c		4.4823	0.1040		

* аббревиатура STD относится к стандартам, прилагаемым к прибору.

Как следует из данных таблицы 4, значения относительного стандартного отклонения RSD и стандартного отклонения SD малы и составляют 5,5% и 0,025%. В соответствии с требованиями руководства эту методику можно считать *правильной и воспроизводимой*.

Качественный и количественный анализ цинка оксида в порошке проводили методом ААС после растворения его в азотной кислоте, используя лампу полого катода $\lambda = 213,9$ нм в газовой среде воздух - ацетилен, $2,2 \text{ л}\cdot\text{мин}^{-1}$. Процедура выполнения пробоподготовки и анализа в целом аналогична анализу железа в цитохроме *c*. Калибровочный график имеет вид $Abs = y = 0.4829C_{Zn} - 0,0018$, где $[C_{Zn}] = \text{мг/л}$.

Таблица 5. Результаты анализа цинка методом ААС

Действие	Истинное значение концентрации (мг/л)	Концентрация (мг/л)	Абсорбция	RSD, %	SD
STD-1	0.100	0.0886	0.0410	1.20	0.005
STD-2	0.100	0.0901	0.0417		
STD-3	0.100	0.0885	0.0409		
STD-AV	0.100	0.0895	0.0414		
STD-1	0.200	0.2092	0.0992	4.35	0.0045
STD-2	0.200	0.2222	0.1055		
STD-3	0.200	0.2221	0.1054		
STD-AV	0.200	0.2158	0.1024		
STD-1	0.400	0.3829	0.1831	4.23	0.0080
STD-2	0.400	0.4063	0.1944		
STD-3	0.400	0.3820	0.1829		
STD-AV	0.400	0.3947	0.1888		
Zn		0.3875	0.1853	3.17	0.0060
Zn		0.4051	0.1938		
Zn		0.3964	0.1896		

* аббревиатура STD относится к стандартам, прилагаемым к прибору.

Данные таблицы 5 значений RSD и SD, составляющих 3,2% и 0,006%, позволяют считать методику определения цинка в порошке *правильной и воспроизводимой*.

В результате проведенных исследований был разработан проект ФС на ранозаживляющий порошок «Фуруцит», спецификация на который представлены в таблице 6.

Таблица 6. Спецификация на ранозаживляющий порошок

	Методы	Нормы
	Показатели	<i>Описание</i>
Визуальный		Порошок желтого цвета, допускается наличие частиц в виде уплотнённой порошкообразной массы.
<i>Подлинность</i>		
1. Качественная реакция на нитрофураны (ГФ.Х, стр.319).		1. Препарат должен давать качественную реакцию с 30% раствором натрия гидроксида (оранжево-красное окрашивание).
2. Качественная химическая реакция на цинк.		2. Препарат должен давать качественную реакцию на цинк.
3. Спектрофотометрия (5-нитрофурал)	3. Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения 5-нитрофурала, в области от 350 до 600 нм должен соответствовать спектру СО 5-нитрофурала, измеренных в этих же условиях и имеет максимумы поглощения при 260 нм ±2 нм и 375 нм ±2 нм и минимум поглощения при 306 ±2 нм.	

4. Спектрофотометрия (цитохром с)	4. Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для качественного определения цитохрома с, в области 350-600 нм должен соответствовать спектру градуировочных растворов цитохрома с, измеренных в этих же условиях, и имеет максимумы при 415±2 нм, 520±2 нм, 550±2 нм.
5. ВЭЖХ (натрия аскорбат)	5. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме градуировочных растворов натрия аскорбата.
Масса содержимого	
НД	От 9,5 до 10,5 г
Количественное определение:	
1. 5-нитрофура́л (ВЭЖХ)	от 0,475 до 0,525 г (на 100 г порошка)
2. Натрия аскорбат (ВЭЖХ)	от 0,095 до 0,105 г (на 100 г порошка)
3. Цитохром с (ААС)	от 0,0475 до 0,0525 г (на 100 г порошка)
4. Цинка оксид (ААС)	от 0,095 до 0,105 г (на 100 г порошка)
Микробиологическая чистота	
ГФ XII, изд. №1, с. 160	Категория 2
Упаковка	
НД	По 10 г в полиэтиленовые банки с дозатором.
Маркировка	
НД	В соответствии с ФС
Транспортировка	
В соответствии с РД 9301-006-05749470-93	
Хранение	
НД	В сухом, защищенном от света месте, при температуре от 18 до 22 ⁰ С (не выше 25 ⁰ С)
Срок годности	
2 года	

Таким образом, разработаны методы контроля качества порошка для лечения ожоговых ран, содержащего смесь цитохрома с, нитрофура́ла, натрия аскорбата и оксида цинка.

Проведена валидационная оценка методов количественного определения по показателям правильность, воспроизводимость, линейность и сходимости всех действующих веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований веществ, содержащих в своем составе NO-высвобождающий фрагмент и их взаимодействия с биологически активными веществами, сформулированы условия образования NO *in situ* и разработаны нитроксидсодержащие ранозаживляющие препараты.

Выводы

1. Изучено взаимодействие нитроксидного фрагмента биологически активных веществ с цитохромом *c* в окисленной форме (cyt c^{3+}), используя бис-нитроксидный малонатный метанофуллерен как модель нитроксид-генерирующих веществ и монооксида азота. Методами ЭПР и электронной спектроскопии доказано антиоксидантное действие нитроксидных фрагментов метанофуллерена, приводящее к восстановлению железа цитохрома *c* (cyt c^{2+}) и образованию нитрозильного катиона.

2. Теоретически (электронная спектроскопия, биомиметическое моделирование на монослоях) и экспериментально (крысы) доказано увеличение антиоксидантной активности препарата, содержащего ксимедон, в присутствии бис-нитроксидного метанофуллерена, содержащего стабильные NO-радикалы.

3. Сформулированы условия регулируемой генерации монооксида азота из препарата, содержащего натрия нитрит, натрия аскорбат и цитохром *c* (молярное соотношение компонентов 1:0,1:0,05) при совместном использовании цитохрома *c* в виде геля и порошка натрия нитрита. Образование монооксида азота и нитрозильных комплексов в растворе и на ране доказано электронной спектроскопией (появление полосы нитрозильного комплекса - 358 нм, γ -полосы восстановленной формы цитохрома *c* - 415 нм, α - и β -полос в области 520 и 550 нм) и результатами с использованием реактива Грисса.

4. Установлено образование нитрозильных комплексов в растворах, содержащих лекарственные нитраты – 5-нитрофураил, 5-нитроксолин, метронидазол, натрия аскорбат, и цитохром *c*. На основе спектральных исследований разработан состав двух ранозаживляющих препаратов наружного применения, содержащих 5-нитрофураил, цитохром *c*, натрия аскорбат, цинка оксид в форме порошка и комбинированной лекарственной формы порошок+гель. Показано, что средства удовлетворяют требованиям ГФ 12.

5. В экспериментах на крысах линии Вистар на модели ожоговой раны установлено лучшее заживление раны за счет стимуляции регенеративных процессов и

вазодилатирующего эффекта предлагаемых препаратов, содержащих нитропрепараты, цитохром *c* и натрия аскорбат.

6. Разработаны методы контроля качества порошка для лечения ожоговых ран, содержащего смесь цитохрома *c*, 5-нитрофунала, натрия аскорбата и оксида цинка. Предложены методики идентификации и количественного определения 5-нитрофунала и натрия аскорбата с использованием УФ-спектроскопии и ОФ ВЭЖ хроматографии.

7. Проведена валидационная оценка методов количественного определения всех действующих веществ по показателям правильность, воспроизводимость, линейность и сходимость.

Практические рекомендации

Разработанный проект фармакопейной статьи на новый противоожоговый порошок может быть внедрён в производственный процесс фармацевтических предприятий. Разработанные методики анализа компонентов противоожогового порошка с 5-нитрофуралом и цитохромом *c* могут быть внедрены в лабораторные практикумы, учебный процесс и научно-исследовательскую работу ВУЗов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в получении в разработке новых лекарственных средств с использованием NO-высвобождающих веществ, способных расширить спектр фармакологического воздействия и исследовании их медико-биологических свойств.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Славкина, В.М. Нитрозильные комплексы цитохрома *c* и натрия аскорбата как компоненты ранозаживляющих лекарственных средств / В.М. Славкина, Д.А. Пантелеев, А.К. Мартусевич, Н.Б. Мельникова // **Медицинский альманах.** – 2013. – №3(27). – С. 94-95.

2. Korobko, V.M. The study of the complexes of nitromedicine with cytochrome *c* and NO-containing aqueous dosage form in the wound treatment of rats / V.M. Korobko, N.B. Melnikova, D.A. Panteleev, A.K. Martusevich, S.P. Peretyagin // **Nitric oxide.** – 2014. – №42. – P. 62-69.

3. Коробко, В.М. Анализ компонентов противоожогового порошка наружного применения с 5-нитрофуралом и цитохромом *c* / В.М. Коробко, О.А. Воробьева, Н.Б. Мельникова // **Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.** – 2015. – №9. – С. 322-328.

4. Melnikova, N.B. Nitroxide methanofullerene as biomimetic model of interaction of nitroxide species with antioxidants / N.B. Melnikona, V.M. Korobko, M.V. Gulenova, G.M.

Fazleeva, O.E. Zhiltsova, E.N. Kochetkov, A.I. Poddel'sky, I.A. Nuretdinov // **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. – 2015. – №136. – P. 314-322.

5. Коробко, В.М. Порошок нитрофураля и цитохрома с как потенциальный источник монооксида азота на ране / В.М. Коробко, А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, Н.Б. Мельникова // **Медицинский альманах**. – 2016. – № 1(41). – С. 119-123.

6. Славкина, В.М. Разработка ранозаживляющего раневого покрытия на основе метаболитов / В.М. Славкина // **МедиАль**. – 2013. – №1(6). – С. 116.

7. Коробко, В.М. Композиция в виде порошка как источник NO и нитрозильных комплексов на ране / В.М. Коробко, Д.А. Пантелеев, Н.Б. Мельникова // Теоретические и прикладные аспекты современной науки: сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции в 2 ч. Ч.2. Белгород, 2014. – С. 143-148.

8. Коробко, В.М. Бис-нитроксидный метанофуллерен – потенциальный компонент лекарственных средств / В.М. Коробко // Актуальные вопросы медицины в современных условиях: сборник научных трудов по итогам III международной научно-практической конференции. – Санкт-Петербург, 2016. – Выпуск III. – С. 200-204.

9. Коробко, В.М. Биомиметическое изучение антиоксидантной активности нитроксидов на примере бис-нитроксидного метанофуллерена / В.М. Коробко // Приоритетные направления развития науки и образования VIII Международной научно-практической конференции. – Чебоксары, 2016. – №1 (8). – С. 79-81.

10. Коробко, В.М. Цитохром с как маркер редокс-процессов с участием нитроксидных соединений / В.М. Коробко // XXIV Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные и прикладные исследования проблемы и результаты». – Новосибирск, 2016. – С. 151-154.