

С. А. Савельев^{1*}, М. Ю. Дорош¹, Т. И. Опарина², И. А. Лагерева¹,
С. В. Чепанов², О. А. Цымбалова¹, С. В. Мыльников³, С. А. Сельков²

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА НА СВОЙСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ ПРОСТАТЫ ЭКСТРАКТА

¹ АО “МБНПК “Цитомед”, Россия, 197375, Санкт-Петербург, Орлово-Денисовский пр., д. 14, стр. 1.

² ФГБНУ “Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д. О. Отта”, Россия, 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

³ ООО “Эко-Вектор”, Россия, 191186, Санкт-Петербург, Аптекарский пер., д. 3, лит. А.

* e-mail: ssavelev@cytomed.ru

В статье описываются особенности разных технологий производства активной фармацевтической субстанции простаты экстракта, обеспечивающие различные качественные характеристики конечного продукта. Приводятся данные, характеризующие субстанцию простаты экстракта с точки зрения ее физико-химических и биологических свойств при использовании для производства готовой лекарственной формы. Проводится сравнительный анализ ключевых показателей качества субстанций, произведенных по разным технологиям.

Ключевые слова: простаты экстракт; экстракция; технология; эффективность; безопасность.

На фармацевтическом рынке Российской Федерации существует большое количество лекарственных средств (ЛС), действующим веществом которых является простаты экстракт, произведенный из предстательной железы (ПЖ) крупного рогатого скота. Данные препараты представлены разными лекарственными формами, путями введения и дозировками. Все эти препараты имеют один и тот же код АТХ (G04BX), фармакотерапевтическую группу (простатита хронического средства лечения) и схожий список показаний к применению.

Препараты экстракта простаты относятся к ЛС животного происхождения. Отличительной особенностью этого класса препаратов является их многокомпонентный состав, который находится в прямой зависимости от исходного сырья, условий хранения и технологии производства активной фармацевтической субстанции (АФС). Так как качественные и количественные характеристики таких препаратов сложно поддаются стандартизации, важнейшим аспектом их производства является технология получения АФС. Для производства лекарственных препаратов простаты экстракта используются АФС, внесенные в Государственный реестр ЛС: субстанция-смесь “Простатилен” (АО “МБНПК “Цитомед”, Россия); субстанция-порошок “Сампрост” (ООО “Самсон-Мед”, Россия); субстанция “Простаты крупного рогатого скота экстракт концентрированный жидкий” (АО “НПО “Микроген”, Россия) и не внесенные в него: субстанция “Простаты экстракт” (Биофак А/С, Дания); субстанция “Простаты экстракт” (ООО “ГЕРОФАРМ”, Россия); субстанция “Простаты экстракт” (ФГУП “Московский эндокринный завод”, Россия). Данные субстанции не могут быть идентичными вследствие их биологического происхождения [1]. Кроме того, это обусловлено отличиями технологического процесса при их производст-

ве. Особенности технологии производства субстанций простаты экстракта могут, в конечном итоге, влиять на терапевтическую эффективность и безопасность лекарственных препаратов, в состав которых они входят.

Технология производства АФС из ПЖ крупного рогатого скота включает в себя несколько основных стадий.

Сбор и подготовка сырья

ПЖ крупного рогатого скота представляет собой железисто-мышечный орган, состоящий из пузырьково-видной, содержащей основное количество регуляторных биологически активных веществ [2], и стволовой части. Последняя состоит из тела простаты и уретральной мышцы. Тело простаты крупного рогатого скота развито слабо и не производит достаточного количества секрета и биологически активных веществ [3], остальная масса стволовой части ПЖ представлена преимущественно белками мышечной и соединительной ткани. Поэтому на данном этапе важно определить, какую часть ПЖ использовать для получения экстракта. Содержание активных веществ определено содержанием железистой ткани в исходном сырье. При подготовке сырья также важно учитывать степень измельчения ПЖ, поскольку от этого будет зависеть скорость и эффективность протекания следующей стадии — экстракции.

Экстракция

Описанные в литературе технологии извлечения биологически активных веществ из сырья животного происхождения сходны между собой и различаются видом растворителя: вода, солевые или водно-спиртовые растворы, слабые кислоты и щёлочи [4]. Водно-кислотная экстракция оптимальна для извлечения водорастворимых белков и пептидов [5]. Для частичного механического разрушения жесткой структуры соединительной ткани ПЖ необходимо подкислить

среду при помощи соляной или органических кислот (винная, уксусная, молочная) [6]. В результате кислотной обработки молекулы коллагена гидратируются, вода механически иммобилизуется в микро- и макропорах коллагенового волокна [6 – 8]. При этом происходит подавление диссоциации карбоксильных групп, ионизируются основные группы белка, т.е. белок приобретает в целом положительный заряд, в результате чего появляются электростатические силы отталкивания. Преобладание зарядов одного знака вызывает отталкивание концевых заряженных групп боковых цепей. Это способствует облегчению электростатического взаимодействия диполей воды с заряженными центрами белка, т.е. увеличению набухаемости. Добавление кислот приводит также к неравномерному распределению ионов внутри белка и окружающей среде, что обуславливает изменение осмотического давления. При суммарном действии электростатических и осмотических явлений в структуре белка возникают значительные напряжения, приводящие к ослаблению и частичному разрыву некоторых связей, в результате чего происходит разрыхление структуры белка. Эти изменения способствуют деструкции белковых молекул, что повышает их доступность для эндопептидаз.

Добавление солей цинка на этапе получения экстракционной массы обусловлено наличием в измельченной простате цинк-зависимых эндогенных протеаз (желатиназы, коллагеназы). Коллагеназа — цинк-зависимая металлопротеиназа, расщепляющая все три полипептидные цепи тропоколлагена на расстоянии 1/4 их длины от С-конца между глицином и лейцином (изолейцином). Образовавшиеся полипептидные фрагменты растворяются в воде и расщепляются далее различными эндогенными протеазами. Таким образом, ионы цинка катализируют протеолитические реакции по разрушению коллагена и белков внеклеточного матрикса, способствуя более быстрому и полному выходу внутриклеточных компонентов в экстракт [9]. Оптимальный рН для работы коллагеназ и других лизосомальных ферментов составляет 4 – 5 (который обеспечивается добавлением кислоты).

На данном этапе важно подобрать тип кислоты, а также оптимальные концентрации кислот и ионов цинка. Так, чаще всего используется уксусная кислота, поскольку она относится к типу слабодиссоциирующих кислот и не вызывает сильного набухания и дальнейшего гидролиза коллагена [10], поскольку пептидные фракции коллагена не являются целевыми для обеспечения биологической активности экстракта.

Криоструктурирование

Криоструктурирование является необходимой и важной стадией при производстве экстракта простаты. В процессе замораживания происходит образование кристаллов льда, разрывающих клеточную мембрану, в результате цитоплазматические и лизосомальные белки и биологически активные пептиды железы выходят “наружу”. Длительное воздействие низких температур на белковые молекулы нарушает их третич-

ную и четвертичную структуру [11]. На этой стадии происходит частичный ферментный протеолиз белков (за счет эндогенных ферментов), поскольку некоторые ферменты проявляют высокую активность и при низких отрицательных температурах [12]. Это связано с тем, что даже при – 18 °С не происходит полной кристаллизации влаги в сырье, что позволяет поддерживать активность ферментных систем. За счет этого автолитические процессы хоть и замедляются, но не останавливаются. Показано, например, что после 12 мес хранения при –18 °С образца мяса свинины переставал обнаруживаться высокомолекулярный белок парамиозин (молекулярная масса 200 – 240 кДа), что свидетельствует о его разложении на пептиды с меньшей молекулярной массой [11]. Кроме того, процесс замораживания–оттаивания приводит к криоструктурированию полидисперсных частиц соединительной ткани и высокомолекулярных белков, что существенно облегчает последующее отделение экстракта от жмыха.

Стадия выделения пептидов из экстракционной массы

Основных способов выделения пептидов три: технология осаждения ацетоном [13, 14], направленный ферментный гидролиз [15] и ультрафильтрация на полых волокнах [16, 17].

Технология осаждения ацетоном

Органический растворитель ацетон широко используется для выделения белков, поскольку обладает свойством лишать белки и пептиды гидратной оболочки, что приводит к выпадению их в осадок [18]. По мере возрастания концентрации ацетона, используемого для экстракции, снижается способность воды к сольватации заряженных гидрофильных молекул белков и пептидов, что приводит к снижению их растворимости до уровня, при котором начинается агрегация и осаждение. Таким образом, ацетон, меняя диэлектрическую проницаемость среды, ухудшает растворимость белков и пептидов (разрушает гидратные оболочки), которые в результате выпадают в осадок. Важным параметром, влияющим на осаждение, является размер молекулы белка. Чем больше молекула, тем ниже концентрация органического растворителя, вызывающая осаждение белка, хотя гидрофобность и изоэлектрическая точка конкретного белка или пептида также имеют значение. Таким образом, использование технологии получения субстанции из экстракта простаты методом ацетонового осаждения приводит, с одной стороны, к выделению в первую очередь более высокомолекулярной составляющей, а, с другой, даже ступенчатое добавление ацетона не позволяет провести фракционирование строго по молекулярному весу [19].

Поскольку в процессе осаждения ацетоном происходит нарушение гидратной оболочки белков и пептидов, обуславливающей их растворимость в воде, получившийся осадок в дальнейшем растворяется в воде лишь частично, что существенно влияет на биодоступность активных веществ. Кроме того, использование высоких концентраций органического растворителя

для увеличения выхода продукта может приводить к частичной денатурации белков, что связано с изменением молекулярных гидрофобных взаимодействий, стабилизирующих структуру белка, а, следовательно, снижению биологической активности.

При таком выделении в экстракте присутствуют высокомолекулярные примеси и белки, поскольку они осаждаются прежде всего. Напротив, хорошо растворимые короткие регуляторные пептиды в меньшей степени осаждаются ацетоном и удаляются вместе с водно-ацетоновым фильтратом.

Технология направленного ферментного гидролиза

Применение протеолитических ферментов, таких как трипсин и сериновая протеиназа из *S. aureus*, обладающих высокой специфичностью, при высокой ионной силе способствует более полному высвобождению и накоплению пептидов из ацетонового порошка. Ферментативный гидролиз может быть исчерпывающим и ограниченным.

При исчерпывающем ферментативном гидролизе происходит максимальное накопление продуктов промежуточного гидролиза белкового субстрата в виде большого количества короткоцепочечных пептидов. Условием данного вида гидролиза является денатурированное состояние белка, когда все пептидные связи максимально доступны для фермента.

При ограниченном ферментативном гидролизе образуется небольшое число фрагментов, поскольку гидролизу подвергаются только ограниченное число связей, расположенных на поверхности белковой молекулы.

Применение ферментативного гидролиза способствует удалению высокомолекулярных белковых примесей из целевого продукта, а также повышает выход целевого продукта более чем в два раза. Ферментативный гидролиз можно рассматривать как альтернативный вариант методу ультрафильтрации с целью удаления белковых веществ, проявляющих побочные свойства. Следует, однако, иметь в виду, что для инактивации фермента температуру реакционной массы увеличивают до +90 °С и выдерживают в течение около получаса. Поскольку белково-пептидная фракция является термолabileй, тепловая обработка выше 37 °С может негативно сказаться на биологической активности конечного продукта.

Ультрафильтрация на полых волокнах

Фильтрация на полволоконных ультрафильтрационных мембранах с разделением по молекулярной массе может осуществляться в двух режимах: тупиковом и режиме тангенциального фильтрования.

При использовании тупикового режима вся жидкость, подающаяся на пористую мембрану, фильтруется через нее. При этом высокомолекулярные соединения и загрязнения, содержащиеся в исходном растворе, накапливаются на поверхности мембраны, что приводит к существенному изменению фильтрующих свойств мембраны по мере фильтрации. Возможно пе-

риодическое очищение мембраны промывкой “обратным током”.

При тангенциальном режиме фильтрации жидкость течет на мембрану не напрямую, а тангенциально (вдоль мембраны). Создается разница давления по всей мембране, вследствие чего некоторый объем жидкости, содержащей низкомолекулярные соединения, проходит сквозь мембрану в виде фильтрата (пермеата), а остальная часть продолжает движение вдоль мембраны, создавая поток, который очищает стенки мембраны.

Использование тангенциальной фильтрации позволяет частично решить проблему стабилизации фильтрующих свойств мембраны. Интенсивный тангенциальный поток предотвращает образование запирающей пленки на поверхности мембраны и обеспечивает непрерывную фильтрацию и очистку мембраны. Высокомолекулярные соединения остаются внутри трубки фильтра (по сути, концентрируются), в то время как низкомолекулярная фракция проходит через стенку фильтра и составляет целевую жидкость — фильтрат.

Тангенциальный режим применяется для концентрирования, очистки, разделения белковых растворов, разделения сложных смесей биологических веществ и полимерных веществ по критерию молекулярной массы.

При ультрафильтрации таких смесей по критерию молекулярных масс необходимо иметь в виду следующее. Прохождение молекулы через фильтр зависит от молекулярной массы, однако этот процесс имеет вероятностный характер. При этом вероятность прохождения молекулы уменьшается с ростом молекулярной массы и не меняется скачкообразно в точке рейтинга фильтра (фильтр не работает по принципу крана). Рейтинг фильтра — это пороговое значение, после которого появляется зависимость вероятности прохождения молекулой фильтра от ее молекулярной массы. Однако эта зависимость нелинейная, сложная, вероятностная, зависит также и от других свойств молекулы помимо ее молекулярной массы (пространственная конфигурация, заряд, гидрофильность, полярность, способность сжиматься [20] и пр.).

Для фильтра с рейтингом 13 кДа молекулы с молекулярными массами 12 и 14 кДа имеют практически равные шансы прохождения барьера. При этом шансы эти близки к нулю. Так, например, по неопубликованным данным производителя фильтров (фильтр Microza ACP-3053D, Pall Corporation, Германия) при фильтрации через 13 кДа тестового белка цитохрома с молекулярной массой 12,7 кДа проходит не более 2 % вещества, а 98 % удерживаются. С уменьшением молекулярной массы вероятность прохождения нелинейно, плавно увеличивается, но даже при молекулярной массе, существенно меньшей рейтинга фильтра, вероятность прохождения далека от 100 %. Так, для инсулина (молекулярная масса 5,7 кДа) тот же фильтр с рейтингом 13 кДа удерживает 80 % вещества и пропускает не более 20 %.

Если в исходном растворе молекулы равномерно распределены в широком диапазоне молекулярных

масс, то фильтрат будет содержать фракцию с преимущественной молекулярной массой, существенно (кратно) смещенной относительно рейтинга фильтра в сторону низких молекулярных масс. Выбор микронного рейтинга фильтра существенно определяет молекулярно-массовое распределение фильтрата. При этом преимущественная молекулярная масса фильтрованных соединений будет существенно меньше микронного рейтинга фильтра. Таким образом, основное преимущество такой фильтрации — возможность обеспечить контролируемое по молекулярной массе выделение целевого пула веществ.

Совершенно очевидно, что при таком разнообразии технологий получения экстракта простаты конечный продукт также будет отличаться. Даже в рамках одного технологического подхода качество получаемого продукта может сильно отличаться в зависимости от используемых параметров производственного процесса: концентрации уксусной кислоты, количества цинка хлористого, времени и температуры экстракции, времени криоструктурирования, микронного рейтинга используемых фильтров, способе сепарации жмыха (центрифуга, декантер) и т.д. В результате даже в пределах одной производственной площадки изменения параметров работы оборудования могут критическим образом сказаться на физико-химических свойствах получаемого ультрафильтрата.

Это особенно важно понимать, поскольку ряд показателей фармацевтической субстанции может напрямую влиять на безопасность и терапевтическую эффективность готовой лекарственной формы, а нормативная документация не всегда обеспечивает достаточный уровень характеристики по этим показателям.

Экспериментальная часть

Исследуемые препараты

Для иллюстрации влияния технологии на параметры фармацевтической субстанции были протестированы образцы субстанций экстракта простаты, произведенных по разным технологиям, принципиально отличающимися способом выделения пептидов: “Простатилен” субстанция-смесь (серии 2150419, 2200920, 2211020, 2231020), полученная по технологии тангенциальной ультрафильтрации (образец УФ), производства АО “МБНПК “Цитомед” (Санкт-Петербург, Россия) и “Сампрост” субстанция (серия 2851119), полученная по технологии осаждения ацетоном (образец ОА), производства ООО “Самсон-Мед” (Санкт-Петербург, Россия). Чтобы исключить возможное влияние глицина, входящего в состав субстанции-смеси “Простатилен”, для данного исследования были наработаны серии АФС без глицина. Концентрация водорастворимых пептидов в образцах экстракта простаты во всех исследованиях (за исключением специально описанных случаев) составляла 1,33 мг/мл, что соответствует 0,1 и 0,3 мг/мл субстанции образцов ОА и УФ, соответственно. Количество пептидов во всех случаях определялось методом Лоури.

Определение высокомолекулярных соединений, молекулярно-массовое распределение, определение характерного профиля и оценка антиоксидантной активности проводились в АО “МБНПК “Цитомед”.

Определение высокомолекулярных соединений (белков)

Для выявления высокомолекулярной фракции в составе исследуемых образцов применяли качественную реакцию с 10 % трихлоруксусной кислотой (ТХУ).

В ходе эксперимента к 1 мл раствора образцов УФ (серия 2211020) и ОА (серия 2851119) прибавляли 1 мл 10 % раствора ТХУ и через 10 мин проводили наблюдение. Растворы сравнивали с эталоном мутности II согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания (ГФ XIV, 2018), ОФС 1.2.1.0007.15 “Прозрачность и степень мутности жидкостей”.

Молекулярно-массовое распределение

Для изучения молекулярно-массового распределения и выявления высокомолекулярной фракции в составе исследуемых образцов УФ (серия 2211020) и ОА (серия 2851119) применяли гель-электрофорез в соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.2.1.0023.15 “Электрофорез в полиакриламидном геле”.

Условия проведения исследования: Система гель-электрофореза состояла из прибора Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США) с блоками полиакриламидного геля. Источником тока выступал прибор PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad, США) при силе тока 12 мА и стабилизацией по току (напряжение в процессе разделения от 50 до 160 В). Электрофорез проводили, пока полоса бромфенолового синего не достигнет расстояния 1–3 мм от нижнего края геля. Окраска геля — Кумасси бриллиантовый синий.

Определение характерного профиля

Для выявления возможных компонентных отличий в экстрактах простаты, полученных с использованием разных технологий выделения, методом эксклюзионной ВЭЖХ был проведен сравнительный анализ образцов УФ (серия 2211020) и ОА (серия 2851119). Данный метод в выбранных условиях анализа позволяет получить как характерный для экстракта простаты профиль элюирования, так и оценить молекулярно-массовое распределение его компонентов и, руководствуясь спектрами УФ-поглощения, предположить их природу. Детектирование проводили как на 214 нм в области поглощения пептидной связи, так и на длине волны 280 нм, характерной для ароматических аминокислот, прежде всего триптофана.

Хроматографическая система состояла из жидкостного хроматографа LC-20 с диодно-матричным детектором (Shimadzu, Япония), колонки для гель-хроматографии Shodex PROTEIN KW402.5-4F, 4,6 × 300 мм (Shodex, Япония). Подвижная фаза содержала 0,1 М натрий фосфатный буфер с 0,3 М NaCl (pH 6,6). Скорость потока подвижной фазы составляла 0,35 мл/мин при изократическом режиме подачи. Температура колонки — 25 °С. Объем вводимой пробы — 10 мкл. В

качестве реперных соединений использовали: бычий альбумин сывороточный, БСА (Sigma-Aldrich, cat. A1470), α -лактальбумин (Sigma-Aldrich, cat. L6385-1VL), апрогинин (Sigma-Aldrich, cat. A1153) и триптофан (Sigma-Aldrich, cat. T0254).

Оценка антиоксидантной активности

За основу для выявления антиоксидантной активности образцов УФ серии (2200920, 2211020, 2231020) и ОА (серия 2851119) взята методика [21] колориметрии свободных радикалов, основанная на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), растворенного в метаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме:



В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска раствора DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности. Определение проводили спектрофотометрическим методом. Навеску образцов рассчитывали так, чтобы в ней содержалось 5 мг пептидов. Для проведения измерения использовали кварцевые кюветы с толщиной слоя 10 мм. В кюветы помещали 2,0 мл реактива 1 (20,0 мг 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила в метаноле, общий объем 50 мл) и 2,0 мл испытуемого раствора (концентрации по водорастворимым пептидам для образцов УФ и ОА – 0,5 мг/мл), засекали время, плотно закрывали крышкой, тщательно перемешивали и помещали в темное место. Через 15 мин измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 515 нм против раствора сравнения (смесь 2,0 мл метанола и 2,0 мл воды). Антиоксидантную активность (АО) рассчитывали по формуле:

$$\text{АО, \%} = \frac{D_0 - D_1}{D_0} \cdot 100,$$

где D_0 — оптическая плотность реактива 1, полученная при оценке пригодности реактива 1; D_1 — оптическая плотность испытуемого раствора.

Оценка антиагрегантной активности

Исследование проводилось в ФГБНУ “НИИ АГиР им. Д. О. Отта” (Санкт-Петербург, Россия). Влияние образцов УФ (серия 2211020) и ОА (серия 2851119) на аденозиндифосфат (АДФ)-индуцируемую агрегацию тромбоцитов периферической крови оценивалось при помощи метода оптической агрегометрии [22]. Использовали оптический агрегометр “Chrono log 590” (США) и реагенты CHRONO-PAR ADP REAGENT (США, cat. 3493). Донорами периферической крови выступали женщины 18 – 35 лет во второй фазе менструального цикла. В качестве положительного контроля использовалась ацетилсалициловая кислота (АСК; Sigma-Aldrich, cat. A5376), растворенная в физиологическом растворе (0,25 мг/мл). В контрольную отрицательную, контрольную положительную и опытные кюветы вносили по 400 мкл обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP). В опытные кюветы вносили аликвоты растворов исследуемых образцов (по 50 мкл). В

контрольную отрицательную кювету вносили 50 мкл физиологического раствора, используемого для разведения исследуемых образцов. В контрольную положительную кювету вносили 50 мкл раствора АСК. Кюветы инкубировали при температуре 37 °С в течение 3 мин. Во все кюветы вносили раствор АДФ до конечной концентрации 2 мкМ и измеряли степень и скорость агрегации тромбоцитов на оптическом блоке агрегометра в течение 6 мин. Степень оценивали через максимальное значение амплитуды агрегации в течение времени измерения. Скорость оценивали по наклону кривой агрегации на линейном участке в течение первых 30 с измерения.

Оценка антимикробного действия

Исследование проводилось в Испытательном центре ООО “Эксперт Био” (Санкт-Петербург, Россия). Исследовались образцы УФ (серия 2150419) и ОА (серия 2851119), а также цинк хлористый (Panreac Quimica S. L. U., Испания; серия 9R014084) и глицин (Panreac Quimica S. L. U., Испания; серия 0001829582). Определение антимикробного действия оценивалось в соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.2.4.002.18 “Микробиологическая чистота” по стандартной технологии с использованием следующих тест-штаммов: *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella abony* IHE 103/39, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Candida albicans* NCTC 885-653, *Aspergillus brasiliensis* ВКПМ F-824 и *Aspergillus niger* РКПГ F-106. В качестве растворителя использовали фосфатный буферный раствор. Образцы тестировались без разведения и в разведениях 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 и 1:1000. В рамках данного исследования также определялось количественное содержание цинка в образцах УФ и ОА, которое проводилось в Испытательной лаборатории (ЦККЛС) ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия). Содержания цинка оценивалось в соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.2.1.1.0004.15 “Атомно-эмиссионная спектрофотометрия”.

Статистический анализ для оценки антиагрегантного действия выполняли при помощи Statgraphics Plus v.5.1 и GraphPad Prism v.3.0. Проверку характера распределения значений проводили с помощью критерия Шапиро — Уилкса. Гипотезу о равенстве нулю разницы между изучаемыми показателями проверяли одновыборочным критерием Вилкоксона. Разницу считали значимой при $p < 0,01$.

Результаты и их обсуждение

Такие показатели, как наличие высокомолекулярных соединений (белков) в составе фармацевтической субстанции, наличие примесей, их качественный и количественный состав, молекулярно-массовое распределение белково-пептидной фракции могут непосредственно влиять на фармакокинетические параметры лекарственного препарата, его биодоступность, безопасность, развитие побочных реакций.

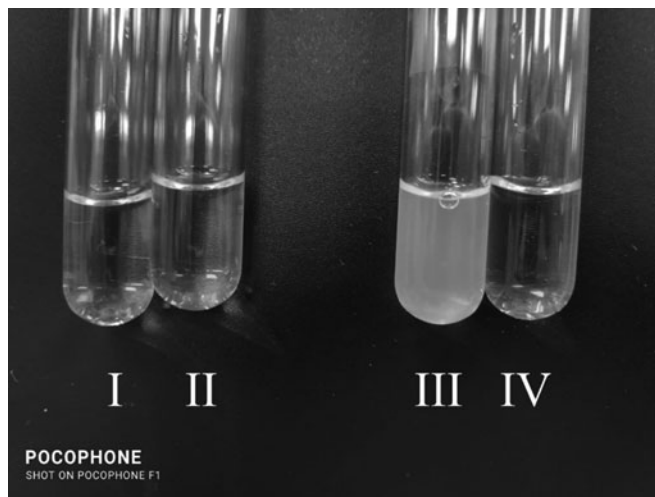


Рис. 1. Сравнительная оценка высокомолекулярных примесей в качественной реакции с ТХУ: I — образец УФ (1 мг/мл); II — образец УФ (3 мг/мл); III — образец ОА (1 мг/мл); IV — эталон мутности II.

Высокомолекулярные белки определяли в качественной реакции с ТХУ, при помощи гель-электрофореза и при помощи эксклюзионной хроматографии. Для исследования биологической активности препараты тестировались на специфическую антиоксидантную активность в реакции DPPH, на антиагрегантные свойства в модели АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов крови и на наличие антимикробного действия. Также препараты проверялись на подлинность (определение характерного профиля) и молекулярно-массовое распределение при помощи эксклюзионной хроматографии и гель-электрофореза.

Определение высокомолекулярных соединений (белков)

Органические кислоты используются для необратимого осаждения белков и продуктов их распада – высокомолекулярных пептидов и пептонов [23]. В данном исследовании белок определяли при помощи добавления к образцам ТХУ с последующим сравнением с эталоном мутности. Особенностью ТХУ является то, что она вызывает осаждение только белков, но не их продуктов распада [24].

Поскольку в данной методике сравнивают мутность растворов, то в качестве эталона сравнения был выбран эталон мутности II (ГФ XIV, ОФС.1.2.1.0007.15 “Прозрачность и степень мутности жидкостей”), который даёт легкую опалесценцию. В результате проведённых опытов было определено, что эталон мутности II соответствует количеству белка (по БСА с молекулярной массой 65 кДа) около 0,066 мг/мл.

На рис. 1 показаны результаты опыта, свидетельствующие о наличии высокомолекулярной фракции в образце ОА и о низком содержании высокомолекулярной фракции в образце УФ. Так, образец УФ соответствует эталону II, тогда как образец ОА значительно превосходит его по мутности. Это означает, что субстанция, полученная осаждением ацетоном, содержит

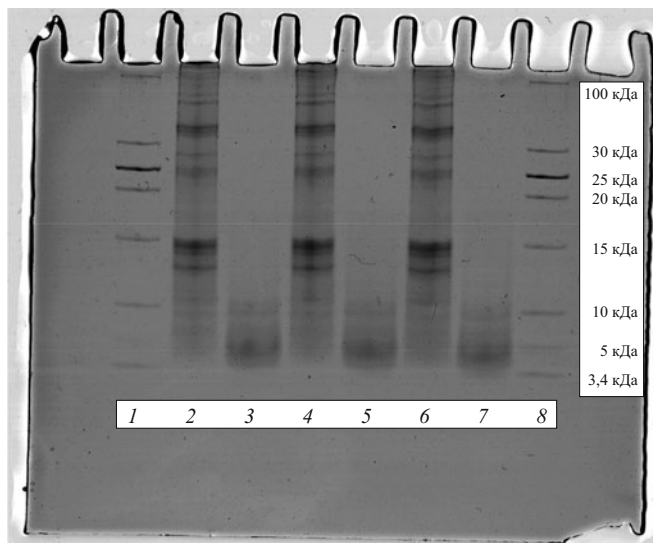


Рис. 2. Гель-электрофореграмма образцов субстанций в сопоставимых концентрациях (по пептидам): 1, 8 — контрольные маркеры; 2, 4, 6 — образец ОА; 3, 5, 7 — образец УФ.

значительное количество высокомолекулярных соединений.

Определение молекулярно-массового распределения

При использовании более точного анализа высокомолекулярных примесей с помощью гель-электрофореза, который также позволяет определить молекулярно-массовое распределение белково-пептидной фракции, было выявлено следующее (рис. 2):

наличие в образце УФ пептидной фракции с молекулярной массой преимущественно в диапазоне 0 – 5 кДа и отсутствие фракции выше 15 кДа;

наличие в образце ОА высокомолекулярных белков и низкое содержание пептидов с массой меньше 5 кДа.

Таким образом, по результатам гель-электрофореза видны различия в характере распределения пептидов между образцами УФ и ОА. В образце УФ основная масса вещества (пептидов) сконцентрирована в области ниже 10 кДа и преимущественно ниже 5 кДа. Напротив, в образце ОА отчетливо наблюдаются полосы выше отметки 10 кДа, что свидетельствует о наличии значительной высокомолекулярной фракции. Этот результат находится в согласии с результатами ТХУ, представленными выше.

Наличие высокомолекулярной примеси в препаратах простаты экстракта могут повышать риски их использования, поскольку существует опасность развития аллергических реакций, а также повышается риск прионного заражения.

Определение характерного профиля

Эксклюзионная хроматография — жидкостная хроматография, основанная на различной способности молекул разного размера проникать в поры неионогенного геля, который служит неподвижной фазой. Эффективным размером макромолекулы при эксклюзионной хроматографии является ее гидродинамический радиус. Располагая эксклюзионной хроматограммой и

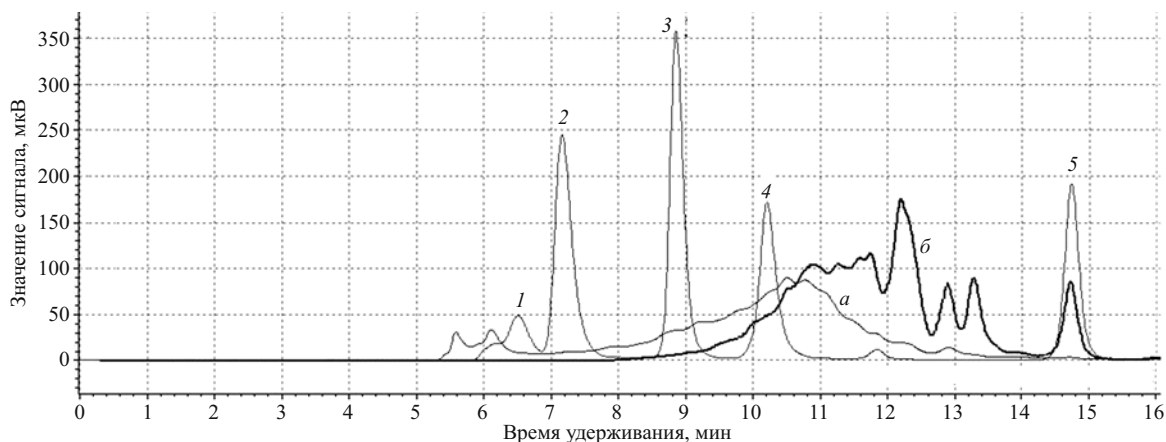


Рис. 3. Хроматограммы образцов ОА, УФ и стандартов реперных соединений (детектирование при 214 нм). Обозначения: *a* — образец ОА; *б* — образец УФ; реперные соединения: 1 — димер БСА (130 кДа), 2 — БСА (65 кДа), 3 — лактальбумин (14 кДа), 4 — аprotинин (6,5 кДа), 5 — триптофан (0,2 кДа).

калибровочной зависимостью логарифма молекулярной массы от объема (времени) удерживания, можно определить молекулярно-массовое распределение исследуемого образца.

На рис. 3 показаны результаты опыта, свидетельствующие о наличии в водорастворимой части образца ОА пептидов и белков с молекулярной массой в диапазоне от 0,2 до 130 кДа с высоким содержанием пептидов с массой 6,5 – 130 кДа. В то же время в образце УФ содержится низкомолекулярная фракция с молекулярной массой в диапазоне от 0,2 до 14 кДа с преимущественным содержанием пептидов с молекулярной массой до 6,5 кДа и незначительного количества пептидов с молекулярной массой до 14 кДа. Таким образом, основная масса пептидов образца ОА имеют молекулярную массу более 6,5 кДа, в том числе существенное количество белков с молекулярной массой более 100 кДа. При этом содержание низкомолекулярной биодоступной пептидной фракции в образце ОА, в отличие от образца УФ, низкое.

Анализ УФ-спектров поглощения низкомолекулярной пептидной фракции образца УФ дает основание предположить наличие триптофан/триптамин-содержащих ароматических соединений. Известно, что в белках соединительной ткани крупного рогатого скота (коллаген, эластин) триптофан содержится либо в очень незначительных количествах, либо не содержится вовсе [25]. Факт наличия триптофан-подобных соединений в образце УФ может свидетельствовать о на-

личии в составе препарата пептидной фракции, полученной из регуляторных биологически активных белков, нежели из белков биологически не активной соединительной ткани.

Оценка антиоксидантной активности

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что образец ОА с концентрацией пептидов 0,5 мг/мл имеет среднюю антиоксидантную активность, равную 31,07 %, образец УФ с той же концентрацией пептидов (по результатам трех серий) — 88,20 % (табл. 1).

Оценка антиагрегантной активности

Оценка степени и скорости агрегации тромбоцитов методом оптической агрегометрии выявила подавление агрегационной активности тромбоцитов образцами УФ и ОА в тесте АДФ-индуцированной агрегации ($p < 0,0001$). Антиагрегантный эффект образца УФ оказался выше, чем у образца ОА. Так, скорость агрегации образца УФ составила 15 %/мин, степень агрегации — 11 %, в то время как для образца ОА данные показатели составили 8 %/мин ($p = 0,01$) и 4 % ($p = 0,003$) соответственно (табл. 2).

Оценка антиагрегантной активности исследуемых препаратов по отношению к препарату сравнения

Таблица 2

Скорость и степень агрегации тромбоцитов методом оптической агрегометрии

	Скорость агрегации (%/мин)			Степень агрегации (%)		
	АСК (0,25 мг/мл)	УФ (1,33 мг/мл)	ОА (1,33 мг/мл)	АСК (0,25 мг/мл)	УФ (1,33 мг/мл)	ОА (1,33 мг/мл)
Пациентов	22	22	22	22	22	22
1 квартиль	-30,75	-21,50	-17,50	-22,25	-15,00	-8,25
Медиана	-23,00	-15,00	-8,000	-18,00	-11,00	-4,00
3 квартиль	-12,50	-10,75	-4,000	-10,25	-7,50	-2,00
Ожидаемая медиана	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
p^*	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0001

* — достоверность отличия от нулевой линии.

Таблица 1
Экспериментальные данные, полученные в ходе определения антиоксидантной активности образцов УФ и ОА

Препарат	Серия	Масса навески, мг	Антиоксидантная активность, %
Образец УФ	2200920	47,03	88,03
	2221020	48,88	88,20
	2231020	49,54	88,38
Образец ОА	2851119	27,56	32,60
		27,10	30,80

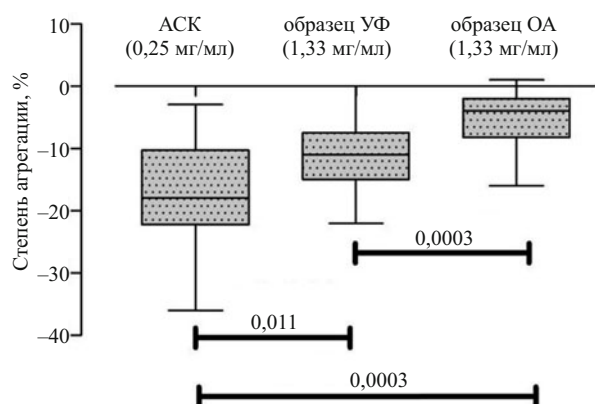


Рис. 4. Значимость различий (результаты одновыборочного теста Вилкоксона) между парами образцов для степени агрегации тромбоцитов.

(АСК) показала, что у образца УФ нет достоверных различий (при пороге значимости 0,01) по влиянию на степень и скорость агрегации (рис. 4 и 5), что может говорить об их схожих эффектах в подавлении агрегации тромбоцитов. Для выяснения механизмов данного явления требуются дальнейшие исследования.

Оценка антимикробного действия

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии в условиях испытаний на микробиологическую чистоту антимикробного действия образца УФ в отношении *Salmonella abony*, которое устраняется при разведении образца 1:10 и об отсутствии антимикробного действия образца ОА. Глицин в данных условиях испытания антимикробным действием не обладает, однако известно, что антимикробным действием могут обладать соли цинка [26]. Результаты данного исследования подтверждают этот факт: цинк хлористый в условиях испытаний на микробиологическую чистоту обладает антимикробным действием в отношении *Bacillus cereus* (разведение 1:50), *Staphylococcus aureus* (разведение 1:100), *Salmonella abony* (без разведения), *Candida albicans* (разведение 1:10) и *Aspergillus brasiliensis* (разведение 1:50). Однако выявленное антимикробное действие образца УФ, скорее всего, не обусловлено наличием цинка в составе субстанции, поскольку его содержание в данной субстанции составляет $0,32 \pm 0,01$ %, тогда как в образце ОА — $2,96 \pm 0,01$ %. Обнаруженное антимикробное действие образца УФ требует дальнейшего изучения.

Проведенное сравнительное исследование физико-химических свойств двух субстанций простаты экстракта, полученных по разным технологиям, убедительно доказывают их неэквивалентность по физико-химическим и биологическим свойствам. Так, субстанция “Сампрост”, в том числе и ее водорастворимая фракция, в отличие от субстанции-смеси “Простагиллен” (содержащей только водорастворимые пептиды), содержит в своем составе значительную фракцию высокомолекулярных белков, которые из готовой лекарственной формы в случае повреждения целостности слизистой прямой кишки (эрозии, анальные

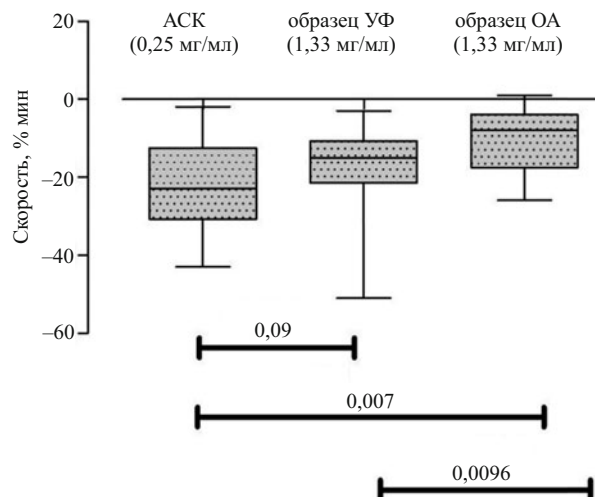


Рис. 5. Значимость различий (результаты одновыборочного теста Вилкоксона) между парами образцов для скорости агрегации тромбоцитов.

трещины, геморрой) могут попадать в кровоток и вызывать нежелательные явления в виде аллергического или иммуногенного ответа.

С другой стороны, значительно более низкие величины антиоксидантной и антиагрегантной активности субстанции “Сампрост” могут снижать эффективность готового ЛС в отношении лечения хронического простатита, где тромбообразование и окислительный стресс являются важными этиологическими факторами [27, 28]. Иными словами, различные технологии и, как следствие, состав простаты экстракта влияют на фармакологические свойства субстанции и ее активность. Таким образом, для повышения качества лекарственного препарата необходимо критически подойти к выбору оптимальных режимов технологического процесса производства входящей в препарат фармацевтической субстанции.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов при работе над статьей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Р. У. Хабриев, Н. О. Камаев, Т. И. Данилова и др., *Вестник Росздравнадзора*, № 6, (2015).
2. B. Westfalewicz, M. A. Dietrich, A. Mostek, et al., *J. Dairy Sci.*, **100**(3), 2282 – 2298 (2017).
3. G. H. Deutscher, *Historical materials from University of Nebraska-Lincoln Extension*, 316 (1980).
4. Е. Г. Артемук, Ю. И. Аветисова, *Аминокислоты и белки*, Брест (2010), с. 6.
5. Патент 2733495 Российская Федерация; Бюл. 31 (2017).
6. Ю. Ф. Галина, *Автореф. дис. канд. техн. наук*, Воронеж (2012).
7. И. О. Васильева, *Автореф. дис. канд. техн. наук*, Москва (2014).
8. О. В. Зинина, Е. В. Гаврилова, *Научный журнал КубГАУ*, **110**(06), 1 – 15 (2015).
9. С. Д. Варфоломеев, А. Е. Пожитков, *Вестн. Моск. ун-та*, **41**(3), 147 – 156 (2000).
10. А. Н. Михайлов, *Химия и физика коллагена кожного покрова*, Легкая индустрия, Москва (1980).

11. А. Б. Лисицын, А. Н. Иванкин, Н. Л. Вострикова и др., *Всё о мясе*, № 2, 36 – 40 (2014).
12. Г. М. Туников, О. В. Серебрякова, С. Н. Есенкина, *Вестник Рязанского гос. аграрного университета*, **1**(45), 57 – 62 (2020).
13. Патент 1417244 Российская Федерация (1994).
14. Патент 2579313 Российская Федерация, Бюл. № 10 (2016).
15. Патент 2669693 Российская Федерация, Бюл. № 29 (2018).
16. Патент 2413525 Российская Федерация, Бюл. № 28 (2005).
17. Патент 2648462 Российская Федерация; Бюл. № 9 (2018).
18. В. Н. Леонтьев, *Биохимия*, БГТУ, Минск (2008), с. 41 – 42.
19. Р. Скоупс, *Методы очистки белков*, Мир, Москва (1985), с. 80.
20. Д. П. Харакоз, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Пушино (1984).
21. Патент № 2680604 Российская Федерация, Бюл. № 6 (2019).
22. Е. А. Пономаренко, А. А. Игнатова, Д. В. Федорова и др., *Вопросы гематологии / онкологии и иммунопатологии в педиатрии*, **18**(3), 112 – 119 (2019).
23. А. П. Писаренко, З. Я. Хавин, *Курс органической химии*, Высшая школа, Москва (1985), с. 337.
24. А. А. Чиркин, *Практикум по биохимии*, Новое знание, Минск (2002), с. 27 – 29.
25. База данных UniProt Knowledgebase; <https://www.uniprot.org/help/uniprotkb>.
26. М. Qayyum, В. Ahmad, S. Nawazish-I-Hussain, et al., *Proceedings S. Z. P. G. M. I.*, **12**(1 – 2), 8 – 12 (1998).
27. А. Г. Горбачев, *Пептидный препарат из предстательной железы: исследование в эксперименте и клинике*, Изд-во СПбГМУ, СПб (2015), с. 18 – 27.
28. G. Paulis, *Research and Reports in Urology*, **10**, 75 – 87 (2018).

Поступила 08.02.22

INFLUENCE OF MANUFACTURING TECHNOLOGY ON THE PROPERTIES OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS OF PROSTATE EXTRACT

S. A. Savelyev^{1,*}, M. Yu. Dorosh¹, T. I. Oparina², I. A. Lagereva¹, S. V. Chepanov², O. A. Tsybalova¹, S. V. Mylnikov³, and S. A. Sel'kov²

¹ "Cytomed" Co., St. Petersburg, 197375 Russia

² D. O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, 199034 Russia

³ "Eco-Vector" LLC, St. Petersburg, 191186 Russia

* e-mail: ssavelyev@cytomed.ru

Important peculiarities of various technologies used for manufacturing the API of prostate extract are described, which determine different qualitative characteristics of the final product. Data on the physicochemical and biological properties of APIs essential for the production of finished dosage forms possessing desired safety and efficacy indices are presented. Comparative analysis of the key quality parameters of APIs produced by various technologies is performed.

Keywords: prostate extract; extraction technology; efficacy; safety.