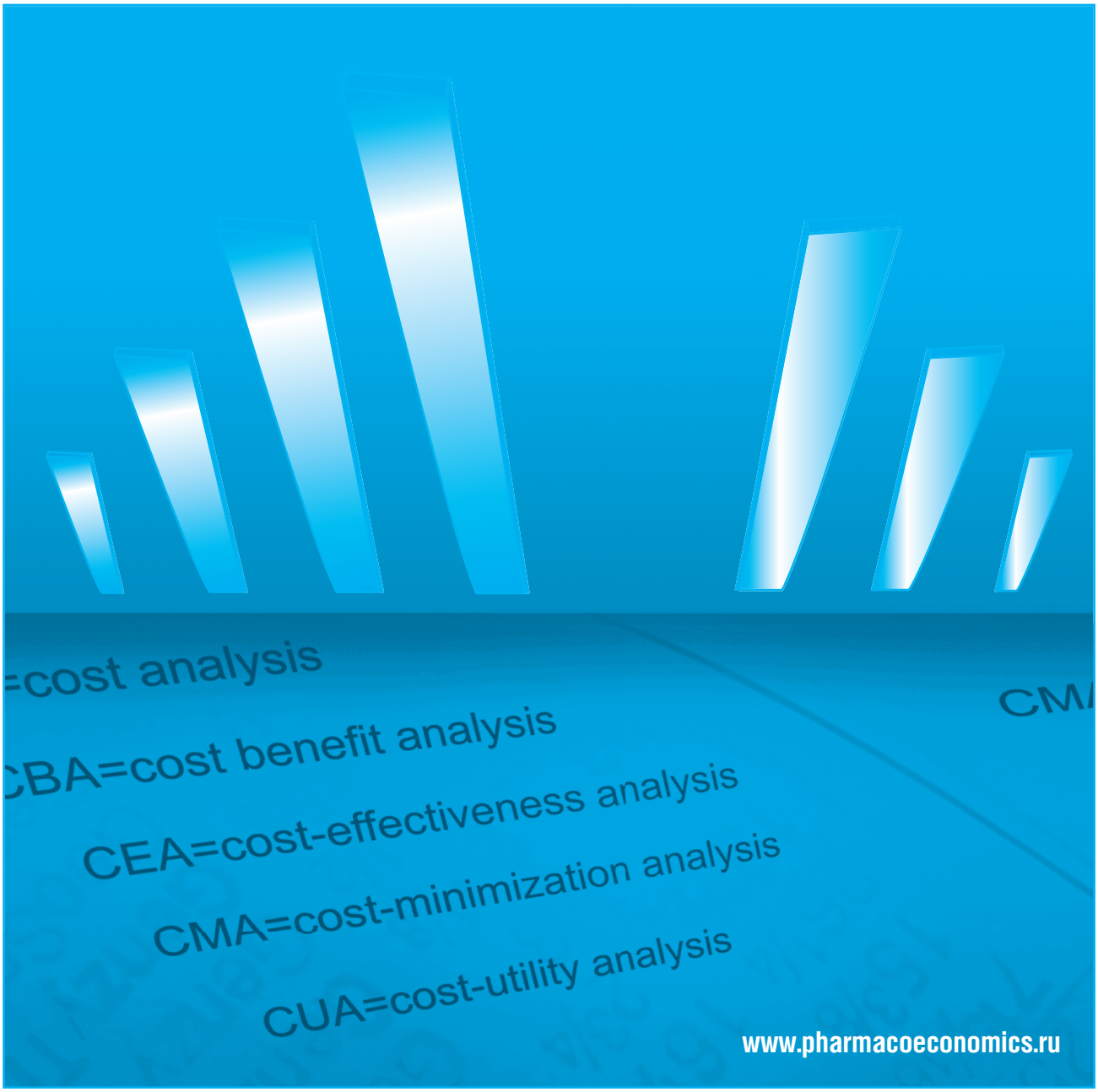
ISSN 2070-4909 (print)
ISSN 2070-4933 (online)

Фармакоэкономика

Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология



FARMAKOEKONOMIKA

Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology

2021 Vol. 14 No. 1

№1

Том 14

2021

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

BY-NC-SA Check for updates

https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2021.083
ISSN 2070-4909 (print)
ISSN 2070-4933 (online)

О различиях в стандартизации лекарственных препаратов на основе экстрактов хондроитина сульфата

Громова О.А.[1,2], Торшин И.Ю.[1,2], Зайчик Б.Ц.[3], Ших Е.В.[4], Ружицкий А.О.[3], Галустян А.Н.[5], Сардарян И.С.[5], Сарвилина И.В.[6]

[1] Институт фармакоинформатики Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» Российской академии наук, (ул. Вавилова, д. 4, Москва 2119333, Россия)

[2] Центр хранения и анализа больших данных Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (Ленинские Горы, д. 1, Москва 119991, Россия)

[3] Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр биотехнологии Российской академии наук (Ленинский пр-т, д. 33, Москва 119071, Россия)

[4] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ул. Трубецкая, д. 8/2, Москва 119991, Россия)

[5] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ул. Литовская, д. 2, Санкт-Петербург 194100, Россия)

[6] ООО «Медицинский центр «Новомедицина» (ул. Социалистическая, д. 74, Ростов-на-Дону 344002, Россия)

***Для контактов:** Торшин Иван Юрьевич, e-mail: tiy135@ccas.ru*

РЕЗЮМЕ

Цель: сравнительный анализ 6 различных хондропротекторов для инъекционного введения, содержащих хондроитина сульфат (ХС).

Материал и методы. Для каждого экстракта ХС изучено по 5 образцов. Сравнение препаратов проведено на основании профилей микроэлементного состава, содержания серы, хроматографического анализа и теста на общий белок. В каждом образце определяли концентрацию 72 элементов, затем проводили усреднение и рассчитывали дисперсии содержания каждого из элементов. Для оценки содержания белковой фракции применяли модифицированный метод Лоури с бицинхолиновой кислотой. Хроматографические профили исследованных экстрактов ХС измеряли для оценки распределения молекулярной массы.

Результаты. Исследованные образцы существенно отличаются друг от друга по суммарному и индивидуальному содержанию серы, токсичных и условно-токсичных микроэлементов. По оценкам анализа на серу и микроэлементы выделен кластер более стандартизированных экстрактов ХС. Показано, что оценки фармацевтического качества исследованных экстрактов, выполненные по элементному профилю, соответствуют оценкам качества по степени очистки от белков и молекулярно-весовым характеристикам экстрактов. В частности, наибольшее суммарное содержание токсичных элементов было найдено для экстрактов ХС-6 (14,87±1,81 мкг/л) и ХС-2 (9,20±1,12 мкг/л), а наименьшие – для ХС-4 (1,46±0,23 мкг/л), ХС-3 (1,92±0,33 мкг/л) и ХС-1 (2,98±0,25 мкг/л). Наибольшее содержание белковых примесей также найдено в экстрактах ХС-6 (9,62 мг/мл) и ХС-2 (6,64 мг/мл), а наименьшее – в ХС-1 (2,87 мг/мл). В то же время наибольшее количество серы выявлено для экстракта ХС-1 (6400 мг/кг) и гораздо меньшее – для ХС-2 (370 мг/кг) и ХС-6 (100 мг/кг). Значительные количества высокомолекулярной фракции ХС (1–40 кДа) были установлены только в экстракте ХС-1, а в экстрактах ХС-2 и ХС-6 присутствовали лишь следовые количества высокомолекулярных форм ХС.

Заключение. Наибольшим содержанием ХС и серы (и в то же время наименьшим содержанием токсичных микроэлементов и белков) отличался экстракт, полученный из трахеи быка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Фармацевтическая стандартизация, хондропротекторы, хроматография, элементный анализ, хондроитина сульфат.

Статья поступила: 25.01.2021 г.; **в доработанном виде:** 24.02.2021 г.; **принята к печати:** 15.03.2021 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии необходимости раскрытия конфликта интересов в отношении данной публикации.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Для цитирования

Громова О.А., Торшин И.Ю., Зайчик Б.Ц., Ших Е.В., Ружицкий А.О., Галустян А.Н., Сардарян И.С. , Сарвилина И.В. О различиях в стандартизации лекарственных препаратов на основе экстрактов хондроитина сульфата. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология.* 2021; 14 (1): 50–62. https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2021.083.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

Differences in the standardization of medicinal products based on extracts of chondroitin sulfate

Gromova O.A.[1,2], Torshin I.Yu.[1,2], Zaychik B.Ts.[3], Shikh E.V.[4], Ruzhitskiy A.O.[3], Galustyan A.N.[5], Sardaryan I.S.[5], Sarvilina I.V.[6]

[1] *Institute of Pharmacoinformatics, Federal Research Center "Informatics and Management", Russian Academy of Sciences (4 Vavilov Str., Moscow 2119333, Russia)*

[2] *Big Data Storage and Analysis Center, Lomonosov Moscow State University (1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia)*

[3] *Bakh Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Biotechnology, Russian Academy of Sciences (33 Leninskiy Prospekt, Moscow 119071, Russia)*

[4] *Sechenov University (8/2 Trubetskaya Str., Moscow 119991, Russia)*

[5] *Saint Petersburg State Pediatric Medical University (2 Litovskaya Str., Saint Petersburg 194100, Russia)*

[6] *Medical Center "Novomeditsina" (74 Sotsialisticheskaya Str., Rostov-on-Don 344002, Russia)*

Corresponding author: *Ivan Yu. Torshin, e-mail: tiu135@ccas.ru*

SUMMARY

Objective: a comparative analysis of 6 different chondroprotectors for injection, containing chondroitin sulfate (CS) based on natural extracts.

Material and methods. Five samples were studied for each CS extract. The preparations were compared on the basis of profiles of trace element composition, sulfur content, chromatographic analysis and test for total protein. In each sample, the concentration of 72 elements was determined, then averaging was performed and the variances of the content of each element were calculated. To assess the content of the protein fraction, a modified Lowry method with bicincholic acid was used. Chromatographic profiles of the studied CS extracts were measured to estimate the molecular weight distribution.

Results. The studied samples differ significantly from each other in the total and individual content of sulfur, toxic and conditionally toxic microelements. According to the analysis of sulfur and trace elements, a cluster of more standardized CS extracts was identified. It was shown that the assessments of the pharmaceutical quality of the studied extracts made by the elemental profile, correspond to the assessments of the quality by the degree of proteins elimination and by the molecular weight characteristics of CS extracts. In particular, the highest total content of toxic elements was found for CS-6 (14.87±1.81 μg/l) and CS-2 (9.20±1.12 μg/l), and the lowest – for CS-4 (1.46±0.23 μg/l), CS-3 (1.92±0.33 μg/l) and CS-1 (2.98±0.25 μg/l). The highest content of protein impurities was also found in CS-6 (9.62 mg/ml) and CS-2 (6.64 mg/ml), and the lowest – in CS-1 (2.87 mg/ml). At the same time, the highest amount of sulfur was found CS-1 (6400 mg/kg) and much less – for CS-2 (370 mg/kg) and CS-6 (100 mg/kg). Significant amounts of the high-molecular fraction of CS (1–40 kDa) were found only in CS-1, and only trace amounts of high-molecular CS forms were present in CS-2 and CS-6.

Conclusion. The highest content of cholesterol and sulfur and, at the same time, the lowest content of toxic microelements and proteins were distinguished by the extract obtained from the trachea of a bovine.

KEYWORDS

Pharmaceutical standardization, chondroprotectors, chromatography, elemental analysis, chondroitin sulfate.

Received: 25.01.2021; **in the revised form:** 24.02.2021; **accepted:** 15.03.2021

Conflict of interests

The authors declare they have nothing to disclose regarding the conflict of interests with respect to this manuscript.

Author's contrubution

The authors contributed equally to this article.

For citation

Gromova O.A., Torshin I.Yu., Zaychik B.Ts., Shikh E.V., Ruzhitskiy A.O., Galustyan A.N., Sardaryan I.S., Sarvilina I.V. Differences in the standardization of medicinal products based on extracts of chondroitin sulfate. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2021; 14 (1): 50–62 (in Russ.). https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2021.083.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Симптоматические медленнодействующие препараты для лечения остеоартрита (англ. symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis, SYSADOA) на основе хондроитина сульфата (ХС) используются в качестве хондропротекторов при остеоартрите. Хондропротекторы на основе ХС не только предоставляют «строительный материал» для реконструкции хряща, но и оказывают выраженный противовоспалительный эффект посредством взаимодействия с рецепторами CD44 и TLR4 на поверхности хондроцитов и других видов клеток. Сырьем для получения экстрактов ХС являются хрящи животных и рыб, которые, как и другие источники природного сырья, существенно отличаются по микроэлементному составу [1, 2]. Экстракты характеризуются весьма широкими диапазонами содержания ХС (от 40% до 99%), различными молекулярными массами ХС (от 3 до 80 кДа), степенью сульфатирования цепей ХС [3] и другими параметрами.

Препараты на основе экстрактов ХС могут выпускаться и как пищевые добавки (которые подвержены менее строгому регулятивному контролю качества), и как продукты фармацевтического качества, предназначенные для внутримышечных инъекций. Хотя все продукты фармацевтического качества должны соответствовать требованиям той или иной фармакопеи, они могут существенно различаться по степени очистки и стандартизации экстрактов. Отметим, что действующими веществами таких лекарственных

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

Основные моменты

Что уже известно об этой теме?

- Препараты на основе хондроитина сульфата (ХС) используются в качестве хондропротекторов при остеоартрите
- Сырьем для получения экстрактов ХС являются хрящи животных и рыб, которые, как и другие источники природного сырья, существенно отличаются по микроэлементному составу
- Экстракты ХС характеризуются весьма широкими диапазонами содержания ХС

Что нового дает статья?

- Исследованные образцы препаратов ХС существенно отличаются друг от друга по суммарному и индивидуальному содержанию серы, токсичных и условно-токсичных микроэлементов
- Оценки фармацевтического качества исследованных экстрактов ХС, выполненные по элементному профилю, соответствуют оценкам качества по степени очистки от белков и молекулярно-весовым характеристикам экстрактов

Как это может повлиять на клиническую практику в обозримом будущем?

- Результаты настоящего исследования позволят сформулировать дополнительные критерии стандартизации состава экстрактов ХС, основанные на данных элементного анализа
- Оценки элементного профиля, степени очистки от белков, молекулярно-весовых характеристик ХС позволяют выявлять препараты с наибольшей эффективностью и безопасностью

Highlights

What is already known about the subject?

- Preparations based on chondroitin sulfate (CS) are used as chondroprotectors in osteoarthritis
- The raw material for obtaining CS extracts is the cartilage of animals and fish which, like other sources of natural raw materials, differ significantly in their trace element composition
- CS extracts are characterized by very wide ranges of CS content

What are the new findings?

- The studied samples of CS preparations significantly differ from each other in the total and individual content of sulfur, toxic and conditionally toxic microelements
- The assessments of the pharmaceutical quality of the studied CS extracts made by the elemental profile correspond to the assessments of the quality by the degree of proteins elimination and by the molecular weight characteristics of the extracts

How might it impact the clinical practice in the foreseeable future?

- The results of this study will make it possible to formulate additional criteria for standardizing the composition of CS extracts based on elemental analysis data
- Evaluations of the elemental profile, the degree of proteins elimination and the molecular weight characteristics of CS make it possible to identify preparations with the highest efficiency and safety

препаратов могут быть как хондроитина сульфат (100 мг/мл), так и биоактивные концентраты или гликозаминогликан-пептидные комплексы (количественное содержание в них ХС обычно не приводится в инструкциях по медицинскому применению). Фармакологическое качество экстрактов ХС очень важно, т.к. недостаточное содержание ХС может повлиять на эффективность препаратов, а недостаточно очищенные формы ХС – существенно снижать безопасность (повышать уровни провоспалительных факторов [4], провоцировать аллергические и аутоиммунные реакции [5] и т.д.). Очевидно, что препараты, содержащие достаточное количество ХС на фоне следовых количеств примесей, более предпочтительны для внутримышечного введения. Следовательно, проведение экспериментальных сравнительных анализов составов экстрактов имеет принципиально важное значение в комплексной оценке хондропротекторов.

Методы анализа образцов экстрактов на чистоту утверждаются соответствующим фармакопейным органом: European Pharmacopoeia Chemical Reference Substances (EP CRS), British Pharmacopoeia Chemical Reference Substances (BP CRS), United States Pharmacopeia Reference Standards (USP RS), государственные стандартные образцы и др. [6–8]. В целом для оценки степени фармацевтической чистоты экстрактов ХС необходимо использовать процедуры количественного определения многих органических веществ. Задача количественного анализа экстрактов существенно осложняется тем, что ХС – это биополимер с вариабельными длиной цепей гликозаминогликанов и различными паттернами сульфатирования этих цепей. Таким образом, процедуры детального анализа состава органической фракции экстрактов ХС крайне затруднены.

Поэтому исследования по вопросам стандартизации экстрактов ХС фармацевтических категорий качества весьма малочисленны. Например, в работе A. Stellavato et al. [9] был проведен сравнительный анализ экстрактов ХС как фармацевтических, так и пищевых категорий. Экстракты изучали с помощью различных хроматографических подходов и с точки зрения влияния на жизнеспособность и функцию клеток в культуре, включая тесты на активность цитокинов (IL-1b, NF-B и т.д.). Продукты фармацевтического качества продемонстрировали наиболее эффективную модуляцию биомаркеров, противодействующих воспалениям и улучшающих жизнеспособность хондроцитов и синовиоцитов. Показано, что в зависимости от наличия примесей некоторые из экстрактов могут проявлять цитотоксичность [9].

Одними из важных примесей в экстрактах ХС (и, однако, одной из наименее изученных) являются микроэлементы, в т.ч. токсичные тяжелые металлы (ртуть, свинец, кадмий, таллий, кобальт и др.). Содержание химических элементов в фармацевтической субстанции/препарате отражает источники сырья, степень очистки и технологию производства этого препарата. Профили уровней микроэлементов в различных экстрактах являются весьма информативными индикаторами степени очистки и стандартизации экстрактов, которые крайне полезны при сравнительной оценке состава экстрактов природного происхождения [1, 2, 10].

При анализе элементного состава экстрактов следует принимать во внимание, что общепринятых фармакопейных методов для оценки качества экстрактов по каждому из химических элементов таблицы Д.И. Менделеева не существует (т.к. включение в фармакопею испытаний на каждый химический элемент представляется чрезвычайно затратным).

Как правило, определяют неорганические анионы (хлориды, сульфаты и др.), причем контроль анионов не проводят, если они входят в состав субстанции. Анализируют содержание серы (уровень сульфатной золы не должен превышать 0,1%) и брома (не более 0,01%). Как указано в консенсусе экспертов по элементным примесям в препаратах, тестирование на железо, медь, магний и алюминий проводят только в том случае, если контроль содержания этих катионов является существенным для качества субстанции. Суммарное содержание ртути, свинца, кадмия, висмута не должно превышать 0,001%, содержание токсичного мышьяка – 0,0001% [7, 8].

В некоторых случаях содержание того или иного элемента измеряется только по специальному указанию. Например, упомяну-

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях. Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

Таблица 1. Исследованные образцы экстрактов хондроитина сульфатов (ХС)
Table 1. Studied samples of chondroitin sulfates (CS) extracts

Экстракт / Extract	Краткая характеристика / Brief description	Дополнительные компоненты / Additional components
ХС-1 / CS-1	Экстракт ХС из хрящевой ткани быка / CS extract from bovine cartilage	Бензиловый спирт, NaOH, натрия метабисульфит / Benzyl alcohol, NaOH, sodium metabisulfite
ХС-2 / CS-2	Концентрат ХС из морской рыбы / CS concentrate from sea fish	Фенол / Phenol
ХС-3 / CS-3	Экстракт ХС, источник неизвестен / CS extract, source unknown	Бензиловый спирт, NaOH / Benzyl alcohol, NaOH
ХС-4 / CS-4	Экстракт ХС, источник неизвестен / CS extract, source unknown	Бензиловый спирт, NaOH, HCl / Benzyl alcohol, NaOH, HCl
ХС-5 / CS-5	Экстракт ХС, источник неизвестен / CS extract, source unknown	Метилпарабен, NaOH / Methylparaben, NaOH
ХС-6 / CS-6	Смесь экстрактов ХС животного происхождения / Mixture of CS extracts of animal origin	Не указаны / Not specified

тое выше тестирование на мышьяк проводят лишь в том случае, если предполагается, что исходное сырье содержит мышьяк или может быть загрязнено им в процессе получения субстанции. При этом совершенно упускается из виду возможность нахождения в сырье, воде, условиях технологической линии и даже стекле ампул для готового препарата не только мышьяка, но и других токсичных элементов (бериллия, никеля, хрома, вольфрама, осмия, урана, тория, таллия, сурьмы, теллура и т.п.). Поэтому количественное определение содержания максимально возможного числа элементов является важным инструментом для сравнительного анализа качества и стандартизации лекарственных препаратов.

В настоящей работе представлены результаты анализа 6 зарегистрированных в РФ лекарственных препаратов в форме растворов для инъекций, содержащих ХС. Проведена кластеризация экстрактов по показателям микроэлементного качества. Результаты оценки микроэлементного качества экстрактов подтверждаются результатами определения количества серы, среднего содержания белка и хроматографической характеристики.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ / MATERIAL AND METHODS

Образцы экстрактов / Samples of extracts

Исследовано 6 лекарственных препаратов, содержащих ХС (**табл. 1**). Препараты были приобретены в государственных аптеках ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы». Все образцы имели нормальный срок годности и были выпущены в течение 2 последних лет. Для каждого экстракта изучено по 5 образцов. Изучены внешний вид и содержание сухого вещества в каждом из них. Для этого образцы помещались в предварительно взвешенные фарфоровые чашки, упаривались при 45 °С в сушильном шкафу в течение 24 ч, после чего проводилось взвешивание.

Определение элементного состава / Determining the elemental composition

В каждом образце определяли концентрацию 72 элементов, затем проводили усреднение и рассчитывали дисперсии содержания каждого из элементов. Исходный скрининговый анализ микроэлементного состава образцов 6 экстрактов ХС выполняли методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) согласно методикам А.Ю. Волкова и Р.Т. Тогузова (2007 г.) [1, 10]. Вкратце, образцы упаривали при температуре 105 °С, взвешивали на аналитических весах Perkin-Elmer AD-6, растворяли в 1 мл 70% HNO_3 (ОСЧ), прошедшей вторичную перегонку, и помещали в микроволновую систему пробоподготовки MD-2000 (CEM, США), после чего 5-кратно разбавляли бидистиллированной водой. Затем проводили съемку масс-спектра с индиевым стандартом (25 мкг/л) на спектрометре VG Plasma Quad PQ2 Turbo (Англия) (рабочая мощность генератора сверхвысоких частот 1,3 кВт, расход аргона 14 л/мин, расход транспортирующего газа 0,89 мл/мин). Единицы измерения — мкг/кг. Элементный анализ образцов выполняли на базе кафедры клинической и лабораторной диагностики ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» [10]. Результаты скринингового анализа были подтверждены определением 18 элементов по методу, принцип которого описан в соответствующем стандарте[1].

Количественное определение содержания белка / Quantification of protein content

Для оценки содержания белковой фракции применяли модифицированный метод Лоури с бицинхолиновой кислотой (англ. bicincholic acid, BCA). Тест BCA включает восстановление иона Cu^{2+} в ион Cu^{+} в щелочном растворе; в результате эксперимента измеряется концентрация ионов Cu+ после проведения реакции. Эта реакция приводит к развитию интенсивного окрашивания пурпурного цвета с максимумом поглощения при 562 нм [11–13]. Поскольку интенсивность образования иона Cu^{+} в тесте Лоури зависит от концентрации белка в растворе образца и от времени инкубации, содержание общего белка в образце может быть количественно определено спектрофотометрически посредством сравнения со стандартом (набор для анализа белка Pierce™ BCA, Thermo Scientific, США) [14, 15].

Для определения содержания белка в исследуемых образцах ХС использованы стандартные растворы реагентов: *реагент А* (бицинхонинат натрия 0,1 г, $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ 2,0 г, дегидрат тартрата натрия 0,16 г, NaOH 0,4 г, $NaHCO_3$ 0,95 г, вода до 100 мл) и *реагент В* ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,4 г в 10 мл воды). Для приготовления тестового раствора смешивали 100 частей реагента А и 2 части реагента В. К 100 мкл водного раствора изучаемого образца добавляли 2 мл тестового раствора, затем смесь инкубировали при 60 °С в течение 30 мин, охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность спектрофотометром Thermo Scientific (при длине волны 562 нм). Тест калибровали с использованием последующих разведений раствора бычьего сывороточного альбумина с начальной концентрацией белка 1 мг/мл.

[1] Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 56219-2014 (ИСО 17294-2:2003) «Вода. Определение содержания 62 элементов методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой».

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях. Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

Хроматографическое исследование / Chromatographic study

Хроматографические профили исследованных экстрактов ХС измеряли для оценки распределения молекулярной массы. Хроматограммы получали посредством высокоэффективной эксклюзионной хроматографии с использованием колонки BioSep-SEC-S 2000 (7,8×300 мм) (Phenomenex, США), установленной в хроматографическом устройстве ProStar HPLC (Varian Inc., США). Наборы стандартов от GE Healthcare (США), Sigma (США) и Serva (Германия) были применены для калибровки. Образцы экстрактов ХС разбавляли в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 6,8), пропускали через гидрофильные фильтры размера 0,45 (Sartorius AG, Германия). Полученные растворы вводили в хроматографическую систему с последующим элюированием 25 мМ раствором фосфата натрия (буфер pH 6,8, скорость потока 1 мл/мин). Ультрафиолетовые детекторы были установлены на 214 и 280 нм [16]. Идентификацию соответствующих молекул проводили по центральным точкам пиков.

Анализ данных по элементному составу экстрактов / Cluster analysis of data on the elemental composition of extracts

Для стандартной обработки результатов исследования использовали методы математической статистики, включающие расчет числовых характеристик случайных величин, проверку статистических гипотез с применением параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение проводили с помощью критерия χ^2, Т-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни и t-теста Стьюдента. Использовали прикладную программу Statistica 6.0 и электронные таблицы Microsoft Excel. Для кластерного анализа применяли метод метрических сгущений (кластеров близколежащих точек) и метрических карт (проекций точек метрических конфигураций на плоскость) [17–19].

В качестве точек рассматривали исследуемые экстракты (см. таблицу 1), расстояния между ними вычисляли на основании данных элементного состава экстрактов. Таким образом была получена метрическая карта экстрактов. «Элементное расстояние» $d_p(i, j)$ между экстрактами i и j вычисляли в соответствии с евклидовой метрикой для n элементов по формуле:

$$d_P(i, j) = \sqrt{\sum_{k=1\ldots n}(F_k(m_{ki}) - F_k(m_{kj}))^2},$$

где m_{ki} – содержание k-го элемента в i-м экстракте; m_{kj} – содержание k-го элемента в j-м экстракте, $Fk: R^+ \rightarrow [0,\ldots,1]$ – эмпирическая функция распределения измеренных значений k-го элемента.

Также определяли расстояния между парами элементов Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, I, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, U. В результате была получена метрическая карта элементов. Расстояние dME(i, j) между элементами i и j вычисляли как коэффициент корреляции между содержанием элементов в исследованных экстрактах с последующей метризаций получаемых таким образом матриц попарных расстояний.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

По результатам анализа сухого веса исследованных экстрактов ХС среднее значение данного показателя составило 97±21 мг и достоверно не отличалось между экстрактами. Достоверные различия были найдены для показателей микронутриентного профиля, качества очистки от белков и молекулярно-весовых характеристик экстрактов.

Элементные профили экстрактов / Elemental profiles of extracts

Методом скринингового исследования микроэлементных профилей в каждом из 6 экстрактов было установлено среднее (по 5 образцам) содержание 72 химических элементов. Анализ метри-

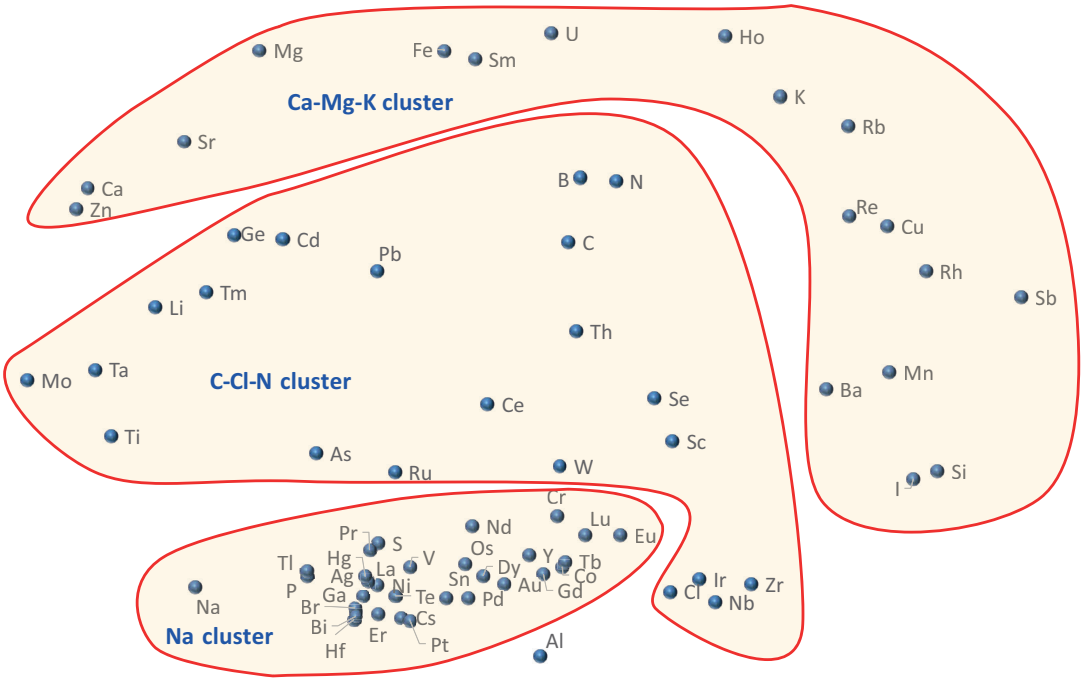


Рисунок 1. Метрическая карта, построенная в результате анализа элементного состава экстрактов хондроитина сульфата. Расстояние между каждой парой точек на метрической карте приблизительно соответствует коэффициенту корреляции между содержанием пары соответствующих элементов в исследованных экстрактах. Анализ метрической карты позволяет сделать выводы о свойствах «сильно взаимодействующих» показателей элементного состава экстрактов

Figure 1. Metric map constructed as a result of analysis of the elemental composition of extracts of chondroitin sulfate. The distance between each pair of points on the metric map approximately corresponds to the correlation coefficient between the content of a pair of corresponding elements in the studied extracts. Analysis of the metric map allows us to draw conclusions about the properties of “strongly interacting” indicators of the elemental composition of extracts

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

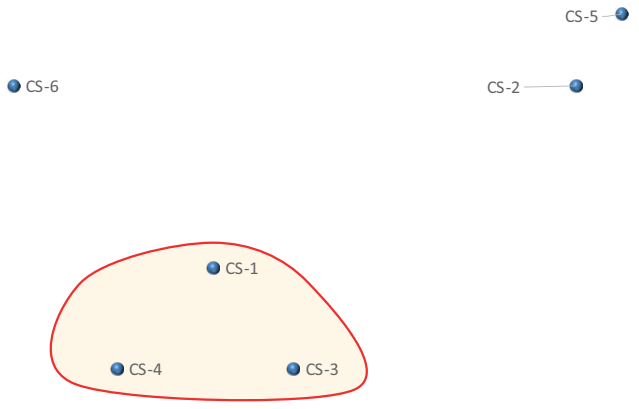


Рисунок 2. Метрическая карта экстрактов хондроитина сульфатов (англ. chondroitin sulfates, CS). Более близкое расстояние между точками на карте означает большую близость элементного состава экстрактов. Указан кластер экстрактов, наиболее близких друг к другу по элементному составу

Figure 2. Metric map of chondroitin sulfate (CS) extracts. A closer distance between points on the map means a greater similarity in the elemental composition of the extracts. A cluster of extracts that are closest to each other in elemental composition is indicated

ческой карты (**рис. 1**) показал наличие трех кластеров элементов, содержание которых коррелировало в исследованных экстрактах. Первый кластер (Na-кластер) включил элементы Na, Er, Nb, Te, Os, Pt, Co, Gd, Ni, Hf, Dy, Tb, Zr, Pd, La, Sc, Hg, Eu, Y, Sb, Pr и др. Во второй кластер (C-Cl-N) вошли элементы Cl, Ta, Ti, Ir, Zr, Nb, Se, Sc, Th, C, B, N, Pb, As, Tm, W и др., а в третий кластер (Ca-Mg-K) – элементы Ca, Mg, Zn, U, Fe, Sr, Mn, K, Cu, Ba, Sm, Ho. Выделение этих кластеров позволило систематически анализировать весь массив корреляций между содержанием различных элементов в исследованных образцах ХС [20–22].

Полученные профили элементного состава экстрактов ХС позволили построить соответствующую метрическую карту, отражающую степень близости элементного состава исследованных экстрактов (**рис. 2**). Анализ этой метрической карты методами поиска метрических сгущений указал на наличие единственного кластера, включающего экстракты ХС-1, ХС-3, ХС-4, и «внекластерные» экстракты ХС-6, ХС-5 и ХС-2. Данный факт позволил сделать весьма важный вывод: элементный состав (а следовательно, и степень очистки, и определенные стадии производства экстрактов) сопоставимы в случае экстрактов ХС-1, ХС-3, ХС-4, ХС-6.

Расшифровка осей метрической карты экстрактов ХС (**рис. 3**) методами метрического анализа данных [20] показала, что в координатах «эссенциальные элементы – токсические элементы» данный кластер сохранялся. В ходе метрического анализа содержание каждого из эссенциальных элементов (V, Se, Co, Cr, I, Li, Mn, Cu, Mo, Mg, Ca, Zn, K, Fe) и токсичных элементов (Al, W, Hg, Bi, Sn, Ni, Tl, As, Sb, Te, Th, Ba, Ti, Ta, Pb, Cd, U) оценивали в процентах от соответствующих максимальных значений. В координатах «эссенциальные элементы – токсические элементы» экстракты ХС-6, ХС-5 и ХС-2, соответствующие более высокому содержанию токсичных элементов, образовывали отдельный кластер.

В **таблице 2** приведены абсолютные значения содержания токсичных элементов, найденных в исследованных экстрактах. Наибольшие показатели установлены для экстрактов ХС-6 (суммарно 14,87±1,81 мкг/л) и ХС-2 (суммарно 9,20±1,12 мкг/л), а наименьшие значения – для экстрактов ХС-4 (суммарно 1,46±0,23 мкг/л), ХС-3 (суммарно 1,92±0,33 мкг/л) и ХС-1 (суммарно 2,98±0,25 мкг/л).

Наличие на метрической карте элементов (см. рис. 2) трех кластеров (Na-кластер, Ca-Mg-K-кластер и C-Cl-N-кластер) свидетель-

Таблица 2. Анализ содержания токсичных и условно-токсичных элементов в составе исследованных экстрактов хондроитина сульфата (ХС), мкг/л

Table 2. Analysis of the content of toxic and conditionally toxic elements in the composition of the studied extracts of chondroitin sulfate (CS), μg/l

Элемент / Element	ХС-1 / CS-1	ХС-2 / CS-2	ХС-3 / CS-3	ХС-4 / CS-4	ХС-5 / CS-5	ХС-6 / CS-6
Al	0,205731	0,348048	0,010618	0,006272	0,276738	0,244451
Ti	0,009113	0,960055	0,011280	0,016210	2,744311	6,211704
Ni	0,010078	0,259976	0,016160	0,032600	0,292929	0,131548
As	0,794531	1,726976	0,211976	0,204850	2,010767	2,904714
Cd	0,004219	0,032125	0,032121	0,080079	0,430438	0,091673
Sn	0,014853	0,491124	0,010242	0,011558	0,407540	0,455297
Sb	0,017908	0,029173	0,011354	0,024567	0,050756	0,022923
Ba	1,704306	4,423789	1,360170	0,924416	1,854619	3,950124
W	0,053920	0,146892	0,055341	0,006539	0,311327	0,133721
Os	0,009892	0,104206	0,008930	0,006215	0,097707	0,021148
Hg	0,047671	0,426244	0,043415	0,045759	0,033900	0,276733
Tl	0,000899	0,066110	0,002197	0,005166	0,094040	0,081170
Pb	0,085658	0,053803	0,095026	0,089022	0,137165	0,229278
Bi	0,001814	0,065049	0,001183	0,001340	0,032012	0,047466
Th	0,002887	0,010484	0,000608	0,000152	0,036464	0,018004
U	0,018780	0,052880	0,049307	0,009385	0,052594	0,047919
Суммарно / Totally	2,98	9,20	1,92	1,46	8,86	14,87

Примечание. *Приведены средние значения содержания элементов в исследованных образцах.*

Note. *The average values of the content of elements in the studied samples are given.*

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

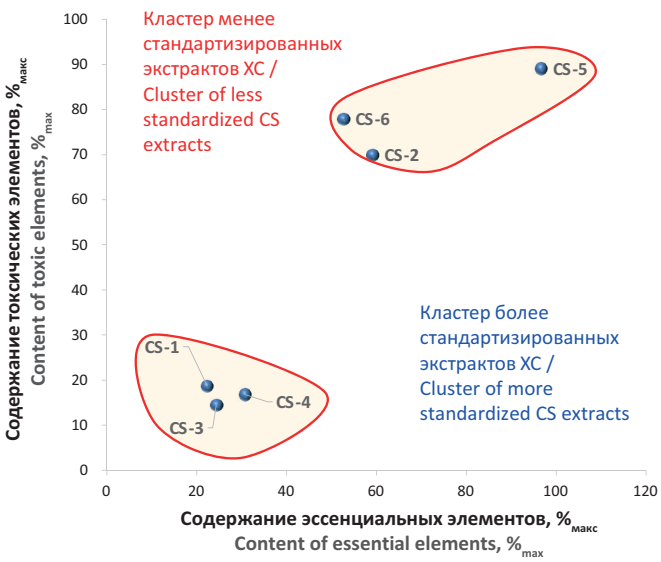


Рисунок 3. Анализ элементного состава экстрактов хондроитина сульфата (англ. chondroitin sulfates, CS) в координатах «эссенциальные элементы – токсичные элементы». Приведены средние значения содержания соответствующих элементов в процентах от максимального значения

Figure 3. Analysis of the elemental composition of extracts of chondroitin sulfate (CS) in the coordinates "essential elements – toxic elements". The average values of the content of the corresponding elements are given as a percentage of the maximum value

ствует о наличии трех важных осей элементного состава: ось Na, ось Ca-Mg-K и ось C-Cl-N. Корреляционная диаграмма содержания химических элементов в координатах «корреляция с кальцием – корреляция с натрием» (**рис. 4**) указывает на вероятные источники микроэлементных примесей в составе исследованных экстрактов ХС. Анализ содержания серы представлен в отдельном разделе.

Анализ корреляционной диаграммы показывает, что, во-первых, концентрации токсичных ртути, кобальта, осмия, висмута, сурьмы, алюминия, вольфрама и олова определяются в очень малых, следовых количествах, положительно коррелируют с концентрациями натрия и хлора (значения коэффициента корреляции более 0,5) и достаточно слабо – с концентрациями кальция и магния. Поэтому эти элементные примеси могут относиться к источникам натрия и хлора и в меньшей степени – к источникам кальция и магния. Минимальные количества токсичных элементов были уставлены в образцах ХС-4, ХС-3 и ХС-1.

Соотношение содержания натрия и хлора – важный показатель элементного состава экстрактов. В настоящем исследовании концентрации натрия и хлора в составе экстрактов ХС коррелировали слабо (r=0,29). Более того, соотношение Na:Cl существенно отличалось для различных экстрактов (на 2–3 порядка). Высокая вариабельность и независимость содержания Na и Cl друг от друга указывают на отличия в технологии производства экстрактов ХС, не связанные с добавлением хлорида натрия.

Известно, что для стандартизации pH инъекционных форм используют растворы щелочей (при избыточной кислотности стандартизируемого раствора) или растворы кислот (при избыточной щелочной реакции стандартизируемого раствора). В качестве щелочи наиболее часто применяют растворы NaOH, а в качестве кислоты – растворы HCl. Соответственно, установленные корреляции указывают на использование кислоты или щелочи для «доведения» pH.

Так, высокие значения отношения Na:Cl для экстрактов ХС-3, ХС-4, ХС-1 (400–500) указывают на использование NaOH, а крайне низкое соотношение Na:Cl в случае экстракта ХС-6 (0,003) – на преимущественное использование HCl. Весьма высокое содержание натрия в экстракте ХС-2 (в 3–40 раз выше, чем во всех других экстрактах) на фоне высокого содержания хлора указывает на возможное применение многочисленных циклов «подкисления и подщелачивания» в процессе стандартизации препарата, что

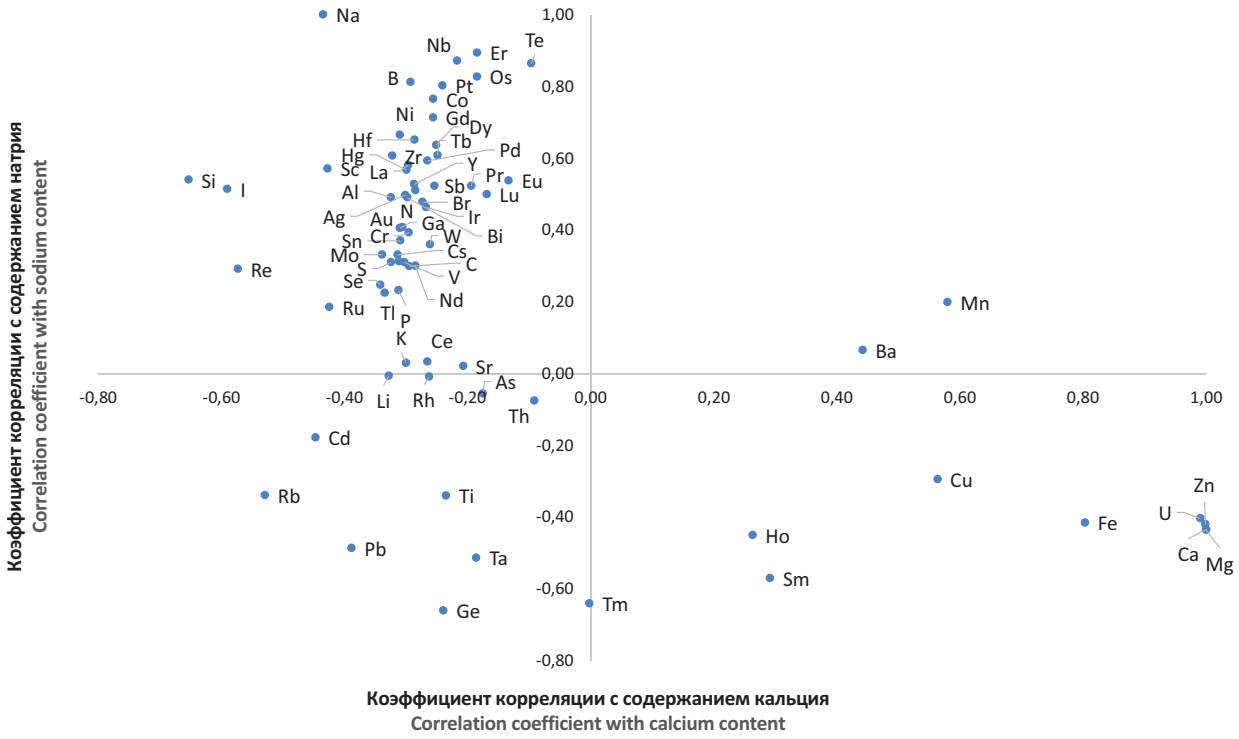


Рисунок 4. Корреляционная диаграмма содержания 72 химических элементов в исследованных экстрактах хондроитина сульфата

Figure 4. Correlation diagram of the content of 72 chemical elements in the investigated extracts of chondroitin sulfate

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

очевидным образом негативно сказывается на качестве стандартизации препарата по натрию, хлору и другим элементам.

Во-вторых, концентрации микроэлементных примесей урана, цинка, железа, меди, марганца и бария значительно коррелировали с содержанием кальция и магния и гораздо слабее – с концентрациями натрия (см. рис. 4). Можно предположить, что источник кальция и магния в составе экстрактов ХС также является и источником урана, цинка, бария и других перечисленных выше микроэлементов. Поскольку при производстве инъекционных экстрактов ХС используется дистиллированная вода, то источником кальция/магния и, соответственно, токсичных урана, марганца и бария является, скорее всего, именно исходное сырье (хрящи животных/рыб). Естественно, более высокое содержание токсичных урана, бария и других тяжелых элементов соответствует ухудшенной стандартизации препарата по микроэлементам.

Действительно, гиалиновый хрящ, составляющий хрящи суставов, ребер, гортани, трахеи и использующийся как сырье для производства субстанций ХС, отличается высоким содержанием кальция [23]. Наибольший показатель выявлен у экстракта ХС-6 (645±33 мкг/л), в то время как в остальных экстрактах кальций встречался в количестве 6–9 мкг/л. Соответственно, содержание урана также было наибольшим в экстракте ХС-6: 0,34±0,30 мкг/л (в остальных экстрактах 0,01–0,05 мкг/л).

Магний также является важным структурным компонентом соединительной ткани. Интересно отметить своего рода «инверсию» отношения Ca:Mg в экстрактах ХС по сравнению с хрящевой тканью. Обычно значение отношения Ca:Mg в хряще и кости составляет 70–200 [24]. В то же время во всех исследованных экстрактах этот показатель был существенно меньше единицы (от 0,11 до 0,42). Такая инверсия связана с процессом гидролиза экстракта: если, например, для начальных стадий гидролиза используются растворы H_2SO_4, то сульфат кальция будет выпадать в осадок, а сульфат магния – сохраняться в растворе.

В-третьих, содержание токсичных свинца, мышьяка, тория, кадмия, таллия, родия, титана достаточно слабо коррелирует с содержанием и натрия, и кальция (абсолютные значения коэффициентов корреляции менее 0,5), т.е. эти примеси слабо зависимы от источников натрия, кальция и хлора в составе экстрактов. Источниками этих элементов могут быть аппараты технологической линии для производства экстрактов ХС, стеклянная тара, используемая для хранения и упаковки ХС и т.д. Соответственно, необходим особый контроль содержания данных микроэлементов на всех стадиях производства экстрактов для повышения качества стандартизации препаратов.

В соответствии с полученными кластерами экстрактов ХС (см. рис. 3) для дальнейшего изучения были выбраны три репрезентативных экстракта: ХС-1 (один из экстрактов ХС, образующий центр кластера стандартизированных экстрактов, см. рис. 2), ХС-2 и ХС-6 (менее стандартизированные экстракты ХС, наиболее отличающиеся друг от друга по микроэлементному составу, см. рис. 1). Образцы экстрактов ХС-1, ХС-2 и ХС-6 были использованы для проведения хроматографических исследований с целью характеризации молекулярных масс компонентов экстрактов. Также были определены общее содержание белка и элементной серы.

Хроматографическое исследование молекулярных масс компонентов экстрактов / Chromatographic study of molecular weights of extracts components

Для количественного определения содержания хондроитина сульфата в экстрактах обычно используется химическая трансформация глюкозамина (например, с помощью антраниловой кислоты) с последующим хроматографическим определением содержимого экстрактов. Однако данный подход весьма затруднен технически. Поэтому в настоящем исследовании была проведена общая хроматографическая характеризация трех экстрактов ХС посредством регистрации хроматограмм ультрафиолетовыми детекторами на частотах 214 и 280 нм. Применение двух разных частот детекции позволяет более точно охарактеризовать расположение пиков на хроматограмме. Детекция на обеих полосах поглощения показала весьма близкие координаты пиков на хроматограммах экстрактов ХС. Для дальнейшего анализа были использованы хроматограммы, полученные на длине волны 214 нм, которые отличались меньшей зашумленностью. Исходные хроматограммы (**рис. 5**) были оцифрованы и откалиброваны, чтобы получить оценки распределения молекулярных масс экстрактов ХС.

Для калибровки хроматограмм, т.е. для перехода от времени удержания к значениям молекулярной массы ХС, были использованы белковые стандарты, а также информация об экстрактах, полученная от производителей. В результате были построены калибровочная кривая для расчета массы ХС и кривая пересчета от белковых стандартов к ХС. Важно отметить, что полученная калибровочная кривая (**рис. 6, a**) практически полностью соответствует результатам независимой работы J.S. Sim et al. (2005 г.) [25]. Кривая пересчета от белковых стандартов к стандартам ХС (**рис. 6, b**) носит квазилинейный характер, так что молекулярная масса ХС составляет приблизительно 1/15=0,067 от значения, вычисленного по белковому стандарту.

В результате применения калибровочной кривой нами были получены оценки распределения молекулярных масс хондроитина сульфатов в исследованных экстрактах ХС (**рис. 7**). Анализ распределения в диапазоне 0–40 кДа показывает, что значительные количества высокомолекулярной фракции ХС (более 1 кДа, менее 40 кДа) были установлены только в экстракте ХС-1. Среднее значение молекулярной массы ХС для ХС-1 составило 15 кДа, что соответствует 15–17 кДа, заявляемым производителем для данного экстракта [3]. В экстрактах ХС-2 и ХС-6 присутствовали только следовые количества высокомолекулярных форм ХС.

Анализ распределения молекулярных масс в диапазоне «легких фракций» (до 1 кДа, см. рис. 7, b) позволяет сделать дополнительные выводы о составе исследованных экстрактов ХС. Интерпретация этих пиков основана на том, что любая молекула ХС образована ХС-дисахаридом, состоящим из глюкозамина и глюкуроновой кислоты (молекулярная масса 475 Да). Также экстракты могут включать отдельные остатки глюкозамина (молекулярная масса 221 Да) и глюкуроновой кислоты (194 Да). Каждая из этих молекул может быть сульфатирована по гидроксильной группе (молекулярная масса сульфат-аниона 96 Да, а при включении в состав другой молекулы – 80 Да).

Экстракту ХС-1 на калиброванной хроматограмме (см. рис. 7, b) соответствуют два пика: 280±56 и 590±140 Да. Первый пик соотносится с сульфатированной глюкуроновой кислотой (276 Да). Т.к. он достаточно широк (стандартное отклонение 56 Да, 95% ДИ 92–380), ему также может соответствовать моносульфатированный глюкозамин (300 Да), незначительные количества неорганического сульфата (96 Да), глюкозамина и глюкуроновой кислоты.

Второй пик экстракта ХС-1 соотносится, прежде всего, с моносульфатированным ХС-дисахаридом (475 Да), причем это могут быть как 4-сульфатированные, так и 6-сульфатированные дисахариды, и, потенциально, с дисульфатированным ХС-дисахаридом (555 Да). Таким образом, низкомолекулярная фракция экстракта ХС-1 преимущественно содержит моносульфатированные ХС-дисахариды, сульфаты глюкозамина и глюкуроновой кислоты.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях. Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

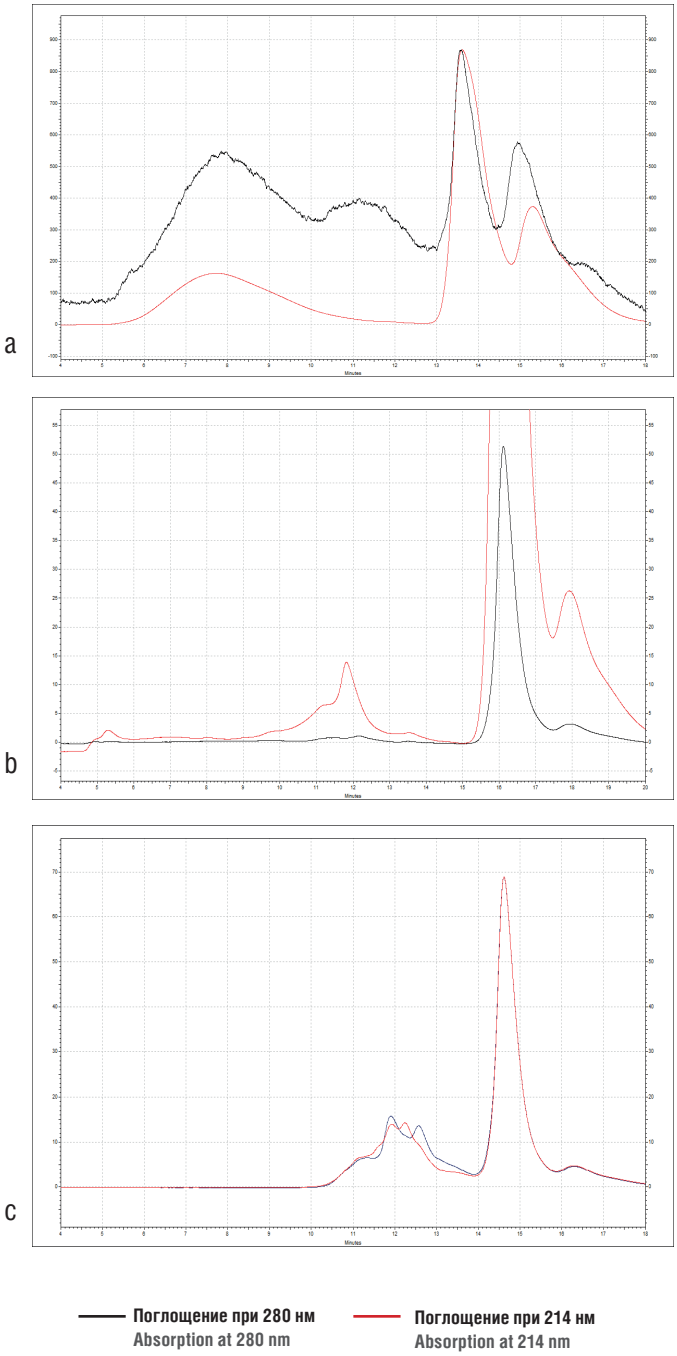


Рисунок 5. Исходные хроматограммы исследованных экстрактов хондроитина сульфата (ХС): ХС-1 (a), ХС-2 (b) и ХС-6 (c)
Figure 5. Initial chromatograms of the investigated extracts of chondroitin sulfate (CS): CS-1 (a), CS-2 (b), and CS-6 (c)

Экстракту ХС-2 на калиброванной хроматограмме соответствовал единственный размытый пик (345±48 Да), который соотносится, скорее всего, с несульфатированным дисахаридом хондроитина (395 Да). Размытость пика позволяет также допустить наличие в экстракте ХС-2 сульфатированной глюкуроновой кислоты (276 Да) и сульфатированного глюкозамина (300 Да). При этом для экстракта ХС-2 площадь под пиком была на порядок ниже, чем для экстракта ХС-1. Из этого следует, что упоминаемые вещества (несульфатированный дисахарид хондроитина, сульфатированная глюкуроновая кислота, сульфатированный глюкозамин) встречаются в экстракте ХС-2 в гораздо меньших количествах, чем в экстракте ХС-1 (приблизительно в 32 раза).

Для экстракта ХС-6 на калиброванной хроматограмме установлено наличие единственного пика (187±22 Да). Этому пику может соответствовать глюкуроновая кислота (194 Да) или глюкозамин (221 Да). По соотношению пиков на рисунке 7, b можно сделать вывод, что суммарное количество этих веществ в 4–5 раз меньше, чем в экстракте ХС-1.

Содержание серы и степень очистки от белков / Sulfur content and degree of proteins elimination

Выводы о составе экстрактов ХС-1, ХС-2 и ХС-6, сделанные выше на основании анализа хроматограмм, подтверждаются результатами анализа этих экстрактов на содержание элементной серы и общее количество белка.

Содержание элементной серы определяли масс-спектрометрически. Наибольшее ее количество выявлено для экстракта ХС-1 (6400 мг/кг) и гораздо меньшее – для ХС-2 (370 мг/кг) и ХС-6 (100 мг/кг). В расчете на каждые 100 мг ХС (стандартная доза ХС в 1 мл) содержание серы в экстракте ХС-1 составило 0,64 мг, что соответствует массовой доле 0,0064. Такая массовая доля содержания серы в хондроитина сульфтах свидетельствует о наличии не менее одной сульфогруппы $-SO_4$ на каждые десять дисахаридов цепи ХС. Поскольку в случае экстрактов ХС-2 и ХС-6 содержание серы было на порядки меньше и в то же время значительный хроматографический сигнал от высокомолекулярных цепей ХС в этих экстрактах отсутствовал (см. предыдущий раздел), о сульфатировании цепей ХС в этих экстрактах говорить не приходится. Наличие серы в экстрактах ХС-2 и ХС-6 может соответствовать сульфатированным формам глюкуроновой кислоты и/или глюкозамина, а также неорганическому сульфат-аниону.

Наконец, для оценки степени очистки экстрактов ХС-1, ХС-2 и ХС-6 были проведены измерения содержания общего белка (модифицированный тест Лоури). В экстракте ХС-1 установлены наименьшие уровни содержания белка (2,87 мг/мл) по сравнению с ХС-2 (6,64 мг/мл) и ХС-6 (9,62 мг/мл).

ОБСУЖДЕНИЕ / DISCUSSION

Полученные результаты сравнительного анализа профилей микроэлементного состава, суммарного и индивидуального содержания серы, данных хроматографического анализа и теста на общий белок в образцах экстрактов ХС свидетельствуют о необходимости учитывать в процессе стандартизации фармацевтических субстанций в составе препаратов-хондропротекторов и в ходе анализа фармацевтической эквивалентности хондропротекторов, содержащих ХС, следующие факты:

– элементный состав в образцах экстрактов ХС сопоставим в случае наличия экстрактов ХС-1, ХС-3, ХС-4, ХС-6 в составе препаратов хондропротекторов;

– в координатах «эссенциальные элементы (V, Se, Co, Cr, I, Li, Mn, Cu, Mo, Mg, Ca, Zn, K, Fe) – токсические элементы (Al, W, Hg, Bi, Sn, Ni, Tl, As, Sb, Te, Th, Ba, Ti, Ta, Pb, Cd, U)» экстракты ХС-6, ХС-5 и ХС-2 соответствуют более высокому содержанию токсичных элементов, а экстракты ХС-1 и ХС-4 – наименьшему содержанию токсических элементов;

– содержание в экстрактах ХС эссенциальных и токсических элементов определяет соотношение трех важных осей элементного состава: ось Na, ось Ca–Mg–K и ось C–Cl–N с высокими значениями отношения Na:Cl для экстрактов ХС-3, ХС-4, ХС-1 и крайне низким соотношением Na:Cl в случае экстракта ХС-6, что указывает на различия в стандартизации pH инъекционных форм препаратов, содержащих экстракт ХС;

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

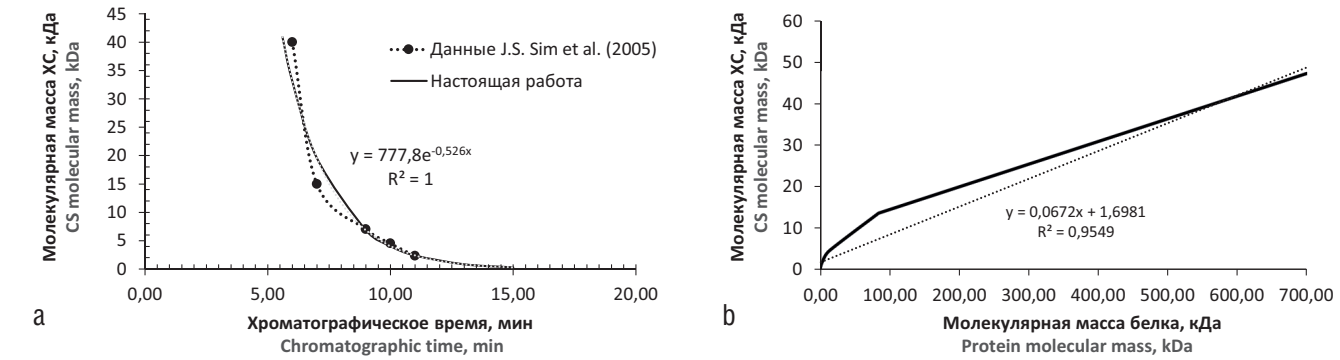


Рисунок 6. Калибровка хроматограмм по молекулярной массе экстрактов хондроитина сульфата (ХС).
a – калибровочная кривая (в сравнении с результатами J.S. Sim et al. (2005 г.) [25]);
b – кривая пересчета масс белков в массы ХС
Figure 6. Calibration of chromatograms by molecular weight of chondroitin sulfate (CS) extracts:
a – calibration curve (in comparison with the results of J.S. Sim et al. (2005) [25]);
b – curve of conversion of protein masses to CS masses

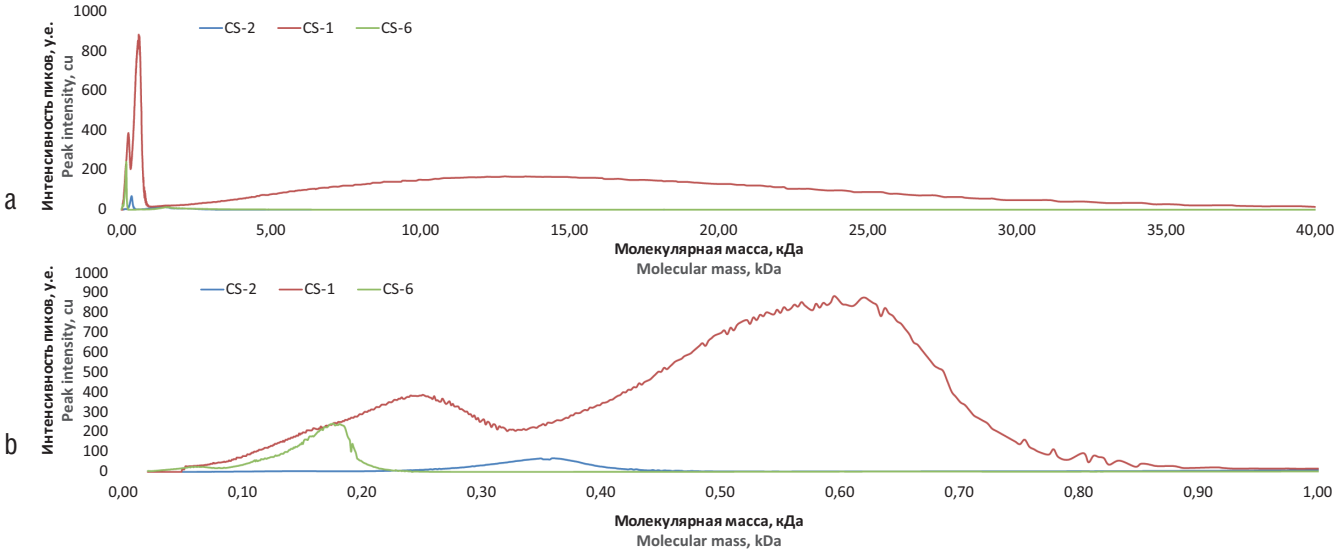


Рисунок 7. Распределение молекулярных масс в исследованных экстрактах хондроитина сульфата (англ. chondroitin sulfates, CS):
a – полное распределение (0–40 кДа);
b – диапазон «легких фракций» (до 1 кДа)
Figure 7. The distribution of molecular weights in the investigated extracts of chondroitin sulfate (CS):
a – complete distribution (0–40 kDa);
b – range of “light fractions” (up to 1 kDa)

– молекулярно-весовые характеристики ХС позволяют выявлять препараты с необходимым молекулярным механизмом действия (влияние на CD44 и TLR-2,4), наибольшей эффективностью и безопасностью применения в клинической практике: значительные количества высокомолекулярной фракции ХС (более 1 кДа, менее 40 кДа) и наличие моносульфатированных ХС-дисахаридов, сульфатов глюкозамина и глюкуроновой кислоты были установлены только в экстракте ХС-1 при меньшей концентрации этих компонентов в ХС-2 и ХС-6;

– о наличии не менее одной сульфогруппы -SO4 на каждые 10 дисахаридов цепи ХС свидетельствует высокое содержание серы в составе ХС-1 по сравнению с крайне низким ее содержанием в составе ХС-2 и ХС-6;

– о высокой степени очистки при производстве экстракта ХС-1 свидетельствуют наименьшие уровни содержания в нем белка по сравнению с аналогичным показателем в ХС-2 и ХС-6.

Все вышеперечисленные факты, зарегистрированные нами в исследовании, определяют свойства хондропротекторов, содержащих экстракты ХС, которые обусловлены их химическим строением и наличием функционально активных группировок, определяющих биологическую активность препаратов: экстракт ХС-1, являющийся действующим началом препарата Хондрогард® (ЗАО «ФармФирма «Сотекс», Россия) и соответствующий необходимым требованиям стандартизации фармацевтической субстанции, наилучшим образом способен реализовать молекулярный механизм действия хондропротектора (предотвращение разрушения экстрацеллюлярного матрикса в хрящевой ткани, процессов гипертрофии и старения хондроцитов, активируемых ХС-4, ХС-6 через систему врожденного иммунитета посредством TLR-2,4).

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют утверждать, что экстракты ХС, отличающиеся наилучшим качеством с точки зрения содержания ХС, серы и общего белка, также характеризуются более высоким качеством с точки зрения стандартизации уровней токсичных и других микроэлементов.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

Следует выделить экстракт ХС-1, изготовленный из хрящевой ткани быка. Для данного экстракта, являющегося действующим началом препарата Хондрогард, заявлена степень очистки более 99%. Действительно, данный экстракт, образующий центр кластера стандартизированных экстрактов ХС (см. рис. 2), отличается достаточно низким суммарным содержанием примесей токсичных микроэлементов (2,98 мкг/л) и самым низким содержанием общего белка (2,87 мг/мл). В то же время данный экстракт содержит значительные количества эффективной и безопасной формы ХС (средняя молекулярная масса 15–17 кДа) и моносульфатированного дисахарида ХС, который также проявляет терапевтическое действие при остеоартрите.

Особо следует подчеркнуть, что концентраты и биоактивные комплексы из сырья животного происхождения не эквивалентны монопрепаратам ХС по содержанию ХС. В них содержатся следовые количества ХС – в десятки раз меньше, чем в монопрепаратах, действующим веществом которых является ХС. Поэтому экстраполировать эффекты ХС на такого рода препараты не представляется возможным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ / CONCLUSION

Препараты SYSADOA, содержащие экстракты ХС, производятся по разным технологиям, в ходе которых исходное природное сырье подвергается гидролизу. Очевидно, что условия выращивания животных, гидролиза, фильтрации, очистки, стандартизации по pH и составу уникальны для каждого экстракта и составляют предмет коммерческой тайны фирм-производителей. Поэтому технологии производства различных экстрактов трудно объективно сравнивать друг с другом для установления их сильных и слабых сторон. Тем не менее для произвольного набора природных экстрактов ХС могут быть изучены универсальные технологические маркеры их очистки: содержание различных химических элементов (элементные профили). Важными объективными характеристиками экстрактов также являются распределение молекулярных масс ХС и содержание белка.

Сравнительный анализ 6 лекарственных препаратов для инъекционного введения, содержащих ХС, был проведен на основании хроматографии, измерений общего содержания белка и профилей элементного состава. Установлены корреляции между содержанием в экстрактах различных химических элементов и степенью очистки от токсичных элементов, выявлен кластер наиболее стандартизированных экстрактов. Проведен анализ возможных источников элементных примесей в их составе.

Оценки фармацевтического качества исследованных экстрактов по микроэлементному профилю соответствуют оценкам качества по степени очистки от белков и молекулярно-весовым характеристикам ХС, определенным в результате хроматографических экспериментов. Наибольшей степенью очистки от токсичных микроэлементов и белков, а также наибольшим содержанием ХС отличался экстракт ХС-1, полученный из трахеи быка.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Тогузов Р.Т., Назаренко О.А., Волков А.Ю. и др. Элементный состав как одна из основ гепатопротекторного действия экстракта прогепар. *Практическая медицина.* 2011; 1: 176.
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Волков А.Ю. и др. Экстракт лаеннек: элементный состав и фармакологическое действие. *Пластическая хирургия и косметология.* 2011; 2: 327–33.
3. Громова О.А., Торшин И.Ю., Лила А.М., Громов А.Н. Молекулярные механизмы глюкозамина сульфата при лечении дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов и позвоночника: результаты протеомного анализа. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2018; 10 (2): 38–44. https://doi.org/10.14412/2074-2711-2018-2-38-44.
4. Martel-Pelletier J., Farran A., Montell E., et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules.* 2015; 20 (3): 4277–89. https://doi.org/10.3390/molecules20034277.
5. Berg P.A., Kaboth U., Becker E.W., Klein R. The analysis of a severe side effect of a cartilage-protective agent by immunological studies. *Dtsch Med Wochenschr.* 1992; 117 (42): 1589–93 (in German). https://doi.org/10.1055/s-2008-1062480.
6. Дудко В.В., Авдеева Е.Ю. Определение чистоты лекарственных средств: методические указания на семинарские и лабораторные занятия. Томск: Лаборатория оперативной полиграфии СибГМУ; 2011.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания. URL: https://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/ (дата обращения 15.03.2021).
8. ICH guideline Q3D (R1) on elemental impurities. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-32.pdf (дата обращения 15.03.2021).
9. Stellavato A., Restaino O.F., Vassallo V., et al. Comparative analyses of pharmaceuticals or food supplements containing chondroitin sulfate: are their bioactivities equivalent? *Adv Ther.* 2019; 36 (11): 3221–37. https://doi.org/10.1007/s12325-019-01064-8.
10. Торшин И.Ю., Громова О.А. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. М.: МЦНМО; 2012.
11. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150 (1): 76–85. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7.
12. Brown R., Jarvis K.L., Hyland K.J., et al. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem.* 1989; 180 (1): 136–9. https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90101-2.
13. Walker J.M. (Ed.) Protein protocols handbook. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2002: 11–4.
14. Adilakshami T., Laine R.O. Ribosomal protein S25 mRNA partners with MTF-1 and La to provide a p53-mediated mechanism for survival or death. *J Biol Chem.* 2002; 277 (6): 4147–51. https://doi.org/10.1074/jbc.M109785200.
15. Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit. User guide. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017135_PierceRapidGoldBCAProteinAssayKit_UG.pdf (дата обращения 15.03.2021).
16. Nikolaev I.V., Sforza S., Lambertini F., et al. Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization. *Food Chem.* 2016; 197 (Pt A): 611–21. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.114.
17. Torshin I.Yu. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. *Pattern Recognit Image Anal.* 2011; 21 (4): 652–62. https://doi.org/10.1134/S1054661811040171.
18. Torshin I.Yu. On solvability, regularity, and locality of the problem of genome annotation. *Pattern Recognit Image Anal.* 2010; 20 (3): 386–95. https://doi.org/10.1134/S1054661810030156.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

19. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 2: density properties. *Pattern Recognit Image Anal.* 2016; 26 (3): 483–96. https://doi.org/10.1134/S1054661816030202.
20. Громова О.А., Калачева А.Г., Торшин И.Ю. и др. Недостаточность магния – достоверный фактор риска коморбидных состояний: результаты крупномасштабного скрининга магниевого статуса в регионах России. *Фарматека.* 2013; 6 (259): 115–29.
21. Лиманова О.А., Торшин И.Ю., Сардарян И.С. и др. Обеспеченность микронутриентами и женское здоровье: интеллектуальный анализ клинико-эпидемиологических данных. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* 2014; 13 (2): 5–15.
22. Торшин И.Ю., Лиманова О.А., Сардарян И.С. и др. Обеспеченность витамином D детей и подростков 7–14 лет и взаимосвязь дефицита витамина D с нарушениями здоровья детей: анализ крупномасштабной выборки пациентов посредством интеллектуального анализа данных. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского.* 2015; 94 (2): 175–84.
23. Барановский Д.С., Демченко А.Г., Оганесян Р.В. и др. Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2017; 72 (4): 254–60. https://doi.org/10.15690/vramn723.
24. Громова О.А., Торшин И.Ю. Магний и «болезни цивилизации». М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018.
25. Sim J.S., Jun G., Toida T., et al. Quantitative analysis of chondroitin sulfate in raw materials, ophthalmicsolutions, soft capsules and liquid preparations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 818 (2): 133–9. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.015.

REFERENCES:

1. Toguzov R.T., Nazarenko O.A., Volkov A.Yu. et al. Elemental composition as one of the bases of the hepatoprotective action of the progepar extract. *Practical Medicine.* 2011; 1: 176 (in Russ.).
2. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Volkov A.Yu. et al. Preparation Laennec: elemental composition and key role in the pharmacological action. *Plastic Surgery and Cosmetology.* 2011; 2: 327–33 (in Russ.).
3. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Lila A.M., Gromov A.N. Molecular mechanisms of action of glucosamine sulfate in the treatment of degenerative-dystrophic diseases of the joints and spine: results of proteomic analysis. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics.* 2018; 10 (2): 38–44 (in Russ.). https://doi.org/10.14412/2074-2711-2018-2-38-44.
4. Martel-Pelletier J., Farran A., Montell E., et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules.* 2015; 20 (3): 4277–89. https://doi.org/10.3390/molecules20034277.
5. Berg P.A., Kaboth U., Becker E.W., Klein R. The analysis of a severe side effect of a cartilage-protective agent by immunological studies. *Dtsch Med Wochenschr.* 1992; 117 (42): 1589–93 (in German). https://doi.org/10.1055/s-2008-1062480.
6. Dudko V.V., Avdeeva E.Yu. Determination of the purity of medicines: guidelines for seminars and laboratory classes. Tomsk:; 2011 (in Russ.).
7. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th edition. Available at: https://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/ (accessed 15.03.2021) (in Russ.).
8. ICH guideline Q3D (R1) on elemental impurities. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-32.pdf (accessed 15.03.2021).
9. Stellavato A., Restaino O.F., Vassallo V., et al. Comparative analyses of pharmaceuticals or food supplements containing chondroitin sulfate: are their bioactivities equivalent? *Adv Ther.* 2019; 36 (11): 3221–37. https://doi.org/10.1007/s12325-019-01064-8.
10. Torshin I.Yu., Gromova O.A. Expert data analysis in molecular pharmacology. Moscow; 2012 (in Russ.).
11. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150 (1): 76–85. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7.
12. Brown R., Jarvis K.L., Hyland K.J., et al. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem.* 1989; 180 (1): 136–9. https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90101-2.
13. Walker J.M. (Ed.) Protein protocols handbook. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2002: 11–4.
14. Adilakshami T., Laine R.O. Ribosomal protein S25 mRNA partners with MTF-1 and La to provide a p53-mediated mechanism for survival or death. *J Biol Chem.* 2002; 277 (6): 4147–51. https://doi.org/10.1074/jbc.M109785200.
15. Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit. User guide. Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017135_PierceRapidGoldBCAProteinAssayKit_UG.pdf (accessed 15.03.2021).
16. Nikolaev I.V., Sforza S., Lambertini F., et al. Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization. *Food Chem.* 2016; 197 (Pt A): 611–21. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.114.
17. Torshin I.Yu. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. *Pattern Recognit Image Anal.* 2011; 21 (4): 652–62. https://doi.org/10.1134/S1054661811040171.
18. Torshin I.Yu. On solvability, regularity, and locality of the problem of genome annotation. *Pattern Recognit Image Anal.* 2010; 20 (3): 386–95. https://doi.org/10.1134/S1054661810030156.
19. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 2: density properties. *Pattern Recognit Image Anal.* 2016; 26 (3): 483–96. https://doi.org/10.1134/S1054661816030202.
20. Gromova O.A., Kalacheva A.G., Torshin I.Yu., et al. Magnesium deficiency – a reliable risk factor for comorbid conditions: results of large-scale screening of magnesium status in the regions of Russia. *Farmateka.* 2013; 6 (259): 115–29 (in Russ.).
21. Limanova O.A., Torshin I.Yu., Sardaryan I.S., et al. Micronutrient provision and women''s health: intellectual analysis of clinicoepidemiological data. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology.* 2014; 13 (2): 5–15 (in Russ.).
22. Torshin I.Yu., Limanova O.A., Sardaryan I.S., et al. Provision of vitamin D in children and adolescents aged 7 to 14 years and the relationship of deficiency of vitamin D with violations of children's health: the analysis of a large-scale sample of patients by means of data mining. *Journal "Pediatria" named after G.N. Speransky.* 2015; 94 (2): 175–84 (in Russ.).
23. Baranovsky D.S., Demchenko A.G., Oganesyan R.V., et al. Acellular tracheal cartilaginous scaffold producing for tissue-engineered constructs. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2017; 72 (4): 254–60 (in Russ.). https://doi.org/10.15690/vramn723.
24. Gromova O.A., Torshin I.Yu. Magnesium and "diseases of civilization". Moscow: GEOTAR-Media; 2018 (in Russ.).
25. Sim J.S., Jun G., Toida T., et al. Quantitative analysis of chondroitin sulfate in raw materials, ophthalmicsolutions, soft capsules and liquid preparations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 818 (2): 133–9. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.015.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

Сведения об авторах

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор, научный руководитель Института фармакоинформатики ФИЦ «Информатика и управление» Российской академии наук, ведущий научный сотрудник Центра хранения и анализа больших данных ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова». ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7663-710X; Scopus Author ID: 7003589812; ResearcherID: J-4946-2017; РИНЦ SPIN-код: 6317-9833.

Торшин Иван Юрьевич – к.ф-м.н., к.х.н., старший научный сотрудник Института фармакоинформатики ФИЦ «Информатика и управление» Российской академии наук; Центр хранения и анализа больших данных ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова». ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2659-7998; Scopus Author ID: 7003300274; ResearcherID: C-7683-2018; РИНЦ SPIN-код: 1375-1114. E-mail: tiy@ccas.ru.

Зайчик Борис Цалерьевич – к.т.н., старший научный сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ биотехнологии РАН. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4934-8801; ResearcherID: J-4946-2017; РИНЦ SPIN-код: 3757-3395.

Ших Евгения Валерьевна – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6589-7654; Scopus Author ID: 6506179061; ResearcherID: B-7786-2018; РИНЦ SPIN-код: 2397-8414.

Ружицкий Александр Олегович – научный сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ биотехнологии РАН. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-1195-4566; Scopus Author ID: 7003589812; ResearcherID: J-4946-2017; РИНЦ SPIN-код: 3757-3395.

Галустян Анна Николаевна – к.м.н., заведующая кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии и фармакоэкономики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9679-632X; РИНЦ SPIN-код: 3303-7650.

Сардарян Иван Суренович – к.м.н., доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии и фармакоэкономики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1528-411X; Scopus Author ID: 572006721; РИНЦ SPIN-код: 9522-9761.

Сарвилина Ирина Владиславовна – д.м.н., профессор, главный врач ООО «Медицинского центра «Новомедицина» (Ростов-на-Дону, Россия). РИНЦ SPIN-код: 7308-6756.

About the authors

Olga A. Gromova – Dr. Med. Sc., Professor, Research Supervisor, Institute of Pharmacoinformatics, Federal Research Center “Informatics and Management”, Russian Academy of Sciences; Leading Researcher, Big Data Storage and Analysis Center, Lomonosov Moscow State University. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7663-710X; Scopus Author ID: 7003589812; ResearcherID: J-4946-2017; RSCI SPIN-code: 6317-9833.

Ivan Yu. Torshin – PhD (Phys. Math.), PhD (Chem.), Senior Researcher, Institute of Pharmacoinformatics, Federal Research Center “Informatics and Management”, Russian Academy of Sciences; Big Data Storage and Analysis Center, Lomonosov Moscow State University. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2659-7998; Scopus Author ID: 7003300274; ResearcherID: C-7683-2018; RSCI SPIN-code: 1375-1114. E-mail: tiy@ccas.ru.

Boris Ts. Zaychik – PhD (Tech.), Senior Researcher, Bakh Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Biotechnology, Russian Academy of Sciences. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4934-8801; ResearcherID: J-4946-2017; RSCI SPIN-code: 3757-3395.

Evgeniya V. Shikh – Dr. Med. Sc., Professor, Chief of Chair of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, Sechenov University. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6589-7654; Scopus Author ID: 6506179061; ResearcherID: B-7786-2018; RSCI SPIN-code: 2397-8414.

Aleksandr O. Ruzhitskiy – Researcher, Bakh Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Biotechnology, Russian Academy of Sciences. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-1195-4566; Scopus Author ID: 7003589812; ResearcherID: J-4946-2017; RSCI SPIN-code: 3757-3395.

Anna N. Galustyan – MD, PhD, Chief of Chair of Pharmacology with a Course in Clinical Pharmacology and Pharmacoeconomics, Saint Petersburg State Pediatric Medical University. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9679-632X; RSCI SPIN-code: 3303-7650.

Ivan S. Sardaryan – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Pharmacology with a Course in Clinical Pharmacology and Pharmacoeconomics, Saint Petersburg State Pediatric Medical University. ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1528-411X; Scopus Author ID: 572006721; RSCI SPIN-code: 9522-9761.

Irina V. Sarvilina –Dr. Med. Sc., Professor, Chief Physician, Medical Center "Novomeditsina" (Rostov-on-Don, Russia). RSCI SPIN-code: 7308-6756.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru