

вой кислоты, потенциального противоопухолевого соединения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (грант № 14-13-01077).

Л.Л. Николаева¹, А.В. Ланцова¹, Е.В. Санарова¹, И.Д. Гулякин¹, Н.А. Оборотова^{1,2}, Е.В. Игнатьева¹, Н.А. Дмитричева¹, И.В. Ярцева¹, Н.Д. Бунятян², В.В. Мусияк³, Г.Л. Левит³, В.П. Краснов³

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ОРМУСТИНА В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»

Минздрава России, Москва;

³ФГБУН «ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН», Екатеринбург

Введение. Тонкослойная хроматография (ТСХ) является одним из основных методов в таких фармацевтических исследованиях, как установление подлинности препаратов, определение количественного содержания действующего вещества и посторонних нелетучих примесей, контроль высвобождения и т. п. В РОНЦ им. Н.Н. Блохина была разработана лиофилизированная лекарственная форма препарата из класса нитрозомочевин — Ормустин. Для идентификации активного вещества в лекарственной форме возможно использование ТСХ-анализа.

Цель исследования — подбор системы растворителей для определения Ормустина в лиофилизированной лекарственной форме методом ТСХ.

Материалы и методы. Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг (РОНЦ им. Н.Н. Блохина), субстанция Ормустина (ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН), различные органические растворители: этанол, пропанол-2, бутанол, аммиак водный, ледяная уксусная кислота, этилацетат, этиловый эфир, хлороформ. Хроматографическое разделение компонентов проводили на пластинках «Sorbfil» 10 × 15 см (Россия). Леофилизат Ормустина регидратировали водой для инъекций. Стандартный раствор Ормустина получали растворением субстанции Ормустина водой для инъекций. На линию старта наносили раствор препарата и стандарта. После достижения фронтом растворителей линии финиша пластинку вынимали из камеры, подсушивали на воздухе и проявляли раствором нингидрина.

Результаты. В ходе проведенного эксперимента изучены значения величины подвижной фазы в 12 различных системах растворителей. Наиболее четкая идентификация субстанции Ормустина получена в 3 системах: 1) н-бутанол—ледяная уксусная кислота—вода (12:3:5), 2) пропанол-2—аммиак водный (6:4), 3) этанол—аммиак водный (6:4).

Заключение. Проведен подбор систем растворителей для идентификации Ормустина в лекарственной форме. Полученные результаты указывают на возможность применения ТСХ-анализа для идентификации Ормустина в лиофилизате.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 13411.1008799.13.163 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

Л.Л. Николаева¹, И.Д. Гулякин¹, А. В. Ланцова¹, Е.В. Санарова¹, Н.А. Оборотова^{1,2}, Е.В. Игнатьева¹, Н.А. Дмитричева¹, И.В. Ярцева¹, Н.Д. Бунятян²

ОПРЕДЕЛЕНИЕ KOLLIDON 17 PF В ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

Введение. Kollidon 17 PF относится к водорастворимым поливинилпирролидонам, по своим физиологическим свойствам он аналогичен альбумину крови и при введении в кровеносное русло оказывает благоприятное воздействие на системную гемодинамику и микроциркуляцию. Его используют при производстве таблеток, для повышения растворимости активных фармацевтических субстанций, а также при создании инъекционных лекарственных форм, для формирования структуры лиофилизата в процессе сублимационной сушки, и в других областях фармацевтической промышленности. Поскольку Kollidon 17 PF входит в состав множества современных лиофилизированных лекарственных форм, то разработка метода его идентификации является актуальной задачей. Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) достаточно прост в применении, обеспечивает быстрое разделение компонентов, поэтому его применяли для определения Kollidon 17 PF.

Материалы и методы. Kollidon 17 PF (BASF, Германия), ЛХС-1208, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 9 мг (РОНЦ им. Н.Н. Блохина), Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг (РОНЦ им. Н.Н. Блохина), органические растворители: этанол, пропанол-2, бутанол, аммиак водный, ледяная уксусная кислота, этилацетат, этиловый эфир, хлороформ, н-гексан, бензол, ацетон, метанол. В качестве неподвижной фазы использовали пластинки «Sorbfil» 10 × 15 см (Россия). Хроматографирование проводили восходящим способом. Когда расстояние фронта растворителей достигало 12 см, пластинку вынимали из камеры и подсушивали на воздухе. Идентифицировали парами йода (желтое пятно).

Результаты. В ходе эксперимента использованы несколько различных систем растворителей. В 28 случаях Kollidon 17 PF проявлялся на линии старта. Только в 2 системах удалось оторвать исследуемый компонент от стартовой линии — пропанол-2: аммиак водный (6:4) и этанол: аммиак водный (6:4).

Заключение. Подобраны системы растворителей для идентификации Kollidon 17 PF в составе лекарственных форм.

Л.Н. Николаевич, О.И. Голубович, К.Н. Саунина СИНЕРГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АГОНИСТОВ ГЛУТАМАТА И ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Введение. В клинической практике для лечения злокачественных заболеваний применяют агонисты глутамата в комбинации с существующими химиотерапевтическими препаратами. Это позволяет достичь большего цитостатического эффекта по сравнению с применением только од-

ного препарата. В связи с этим возникает необходимость поиска фармакологических агентов, способных избирательно модулировать глутаматные рецепторы.

Цель исследования — изучить влияние монотерапии и сочетанного действия агонистов глутаматных рецепторов и ингибиторов пролиферации на опухолевые клетки в динамике.

Материалы и методы. Работа выполнена на клеточной линии глиомы крысы С6 (экспериментальная модель мультиморфной глиобластомы человека). Использовали методы культивирования клеток *in vitro*, цитологический, статистический. Пролиферацию опухолевых клеток глиомы крысы С6 оценивали по митотическому индексу (МИ, %), количеству генераций популяции клеток (Г), времени удвоения популяции (ВУП, ч), а также оценивали ингибирующую активность изучаемых веществ. Агонисты глутаматных рецепторов — α -глутаминовая кислота в дозах 10 и 1000 мкМ; ингибиторы пролиферации — темозоломид 10, 100, 1000 мкг/мл; цисплатин 0,4; 4; 40 мкг/мл.

Результаты. Митотическая активность опухолевых клеток *in vitro* в условиях острого и пролонгированного действия на них α -глутаминовой кислоты в дозах 10 и 1000 мкМ снижается по сравнению с контролем. В условиях кратковременного (6 ч) воздействия α -глутаминовой кислоты пролиферация клеток снижается на 60 и 54 % соответственно, а при более длительном воздействии (72 ч) на 74 и 81 % по сравнению с контролем. Ингибирующая активность темозоломида сильнее выражена при сочетанном воздействии с α -глутаминовой кислотой на клетки С6 и эффект сохраняется в течение 48 ч. В условиях раздельного действия темозоломид в дозе 1000 мкг/мл подавляет пролиферацию клеток на 82 %, а при воздействии на фоне α -глутаминовой кислоты пролиферативная активность восстанавливается до контрольного уровня. Ингибирующая активность цисплатина также возрастает на фоне изменения функционального состояния глутаматных рецепторов при действии α -глутаминовой кислоты в дозе 10 мкМ.

Заключение. Нарушения функционального состояния глутаматных рецепторов опухолевых клеток С6 α -глутаминовой кислотой усиливает действие цитостатических препаратов темозоломида и цисплатина на пролиферацию клеток и активирует их гибель.

*Л.Н. Николаевич, К.Н. Саунина,
О.И. Голубович, Е.Ф. Полукошко*

КЛОН-ИНДУЦИРОВАННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЛУТАМАТНОЙ «ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ» *IN VITRO*

*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск,
Республика Беларусь*

Введение. Одним из подходов разработки способов регуляции пролиферации клеток являются изучение клональной гетерогенности популяции опухолевых клеток в условиях моделирования глутаматной «эксайтотоксичности» и использование в качестве лекарственных средств естественных возбуждающих медиаторов.

Цель исследования — изучить клон-индуцированную чувствительность опухолевых клеток при моделировании глутаматной «эксайтотоксичности» *in vitro*.

Материалы и методы. Методом клонирования *in vitro* опухолевых клеток С6 проведены исследования на модели глутаматной «эксайтотоксичности». Развитие процесса индуцировали добавлением глутамата натрия, L-глутаминовой кислоты и NMDA в «эксайтотоксических» дозах (2, 20, 200 мкМ; 20, 200 мМ; 100 мкМ соответственно) в монослойную культуру на стадии логарифмического роста. Спустя 24 ч (время удвоения популяции клеток С6) одна часть клеточной популяции была расклонирована на чашки Петри, а другая — субкультивирована во флаконах и в логарифмической фазе роста популяция клеток была расклонирована. Оценивали эффективность клонирования опухолевых клоногенных клеток.

Результаты. Установлено, что инкубирование опухолевых клеток с агонистами глутаматных рецепторов — глутаматом натрия и L-глутаминовой кислотой приводит к гибели клеток по отношению к контролю. Показано, что угнетение пролиферации клоногенных клеток С6 сохраняется после субкультивирования клеток, подвергшихся действию глутамата натрия в дозе 2 мкМ (LD_{79}), L-глутаминовой кислоты в дозе 200 мМ (LD_{90}). В условиях воздействия глутамата натрия и L-глутаминовой кислоты на клоногенные клетки в клонках наблюдается их резистентность. L-глутаминовая кислота в дозах ниже «эксайтотоксических» (10 мкМ) не влияет на пролиферацию клоногенных клеток. Также показано, что клоногенные клетки в клонках резистентны к воздействию агониста глутаматных рецепторов NMDA (N-метил-D-аспартат) в дозе 100 мкМ.

Заключение. Возможно, в механизме нарушения эффективности клонирования опухолевых клеток лежит активация реакции глутаматной «эксайтотоксичности».

*Л.Н. Николаевич, К.Н. Саунина, О.И. Голубович,
Т.А. Хрусталёва, Е.Ф. Полукошко, Е.С. Барашкова*

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТОВ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛОНИРОВАНИЯ И МЕТАБОЛИЗМ ОПУХОЛЕВЫХ КЛОНОГЕННЫХ КЛЕТОК

*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск,
Республика Беларусь*

Введение. Внутриопухолевая гетерогенность, свойственная большинству злокачественных новообразований человека, является основной преградой на пути высокоэффективной диагностики онкологических заболеваний, к успешному прогнозу и лечению.

Цель исследования — изучить влияние фенитоина и ламотригина на эффективность клонирования и метаболизм опухолевых клоногенных клеток.

Материалы и методы. Работа выполнена на перевиваемой линии клеток глиомы крысы С6. В исследовании использовали цитологический метод (анализ эффективности клонирования клеток С6 в клонках), методы культивирования и клонирования клеток *in vitro*, биохимический (определение активности щелочной фосфатазы (ШФ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ)), статистический. В качестве антагонистов глутаматных рецепторов применяли фенитоин (5,5-дифенил-гидантоин, Sigma, США) в дозах 1, 10, 100, 1000 мкг/мл и ламотригин (6-(2,3-ди-