

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ТВЕРДЫХ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ АНТИАРИТМИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА АЛЛАПИНИН

© 2025 г. А. А. Шалыбкова¹, Ю. И. Ощепкова^{2, *}, И. М. Ле-Дейген^{1, *},
Н. А. Козырев¹, Н. Л. Клячко¹, Ш. И. Салихов²

¹ Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

² Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,
ул. Мирзо Улугбека, 83, Ташкент, 100125 Узбекистан

*e-mail: joshepkova05@rambler.ru

*e-mail: i.m.deygen@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2025 г.

После доработки 14.09.2025 г.

Принята к публикации 14.09.2025 г.

На сегодняшний день актуальной проблемой является создание новых пролонгированных форм антиаритмических препаратов с улучшенными биофармацевтическими свойствами. В настоящей работе для решения этой проблемы предложен подход к включению антиаритмического малорастворимого препарата аллапинина в твердые липидные наночастицы переменного состава. Проведен подбор параметров методики синтеза твердых липидных наночастиц на основе температурной инверсии фаз. Гидродинамические характеристики частиц и их устойчивость к агрегации контролировали с помощью метода динамического рассеяния света. Наилучшими характеристиками обладали системы, полученные при использовании ядра на основе стеариновой кислоты ПАВ Brij 56. Эффективность включения лекарства составила около 100%. Методом ИК-спектроскопии Фурье показано, что включение аллапинина в ядро частиц дополнительно приводит к образованию нековалентных взаимодействий с полярной частью стеариновой кислоты. Выявлено замедление высвобождения аллапинина за счет включения в частицы в натрий-фосфатном буфере при физиологической температуре 37°C. Полученные результаты могут служить основой для дальнейшей разработки новой формуляции аллапинина с улучшенными биофармацевтическими свойствами.

Ключевые слова: антиаритмические препараты, аллапинин, твердые липидные наночастицы

OPTIMIZATION OF THE COMPOSITION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR DELIVERY OF THE ANTIARRHYTHMIC DRUG ALLAPININ

© 2025 г. А. А. Shalybkova, Yu. I. Oshchepkova, I. M. Le-Deigen, N. A. Kozyrev, N. L. Klyachko, Sh. I. Salikhov

The development of new prolonged forms of antiarrhythmic drugs with improved biopharmaceutical properties is an urgent problem today. The present study proposes a method for the loading the poorly soluble antiarrhythmic drug allapinin into solid lipid nanoparticles of varying composition to solve this problem. The parameters for the method of producing solid lipid nanoparticles by temperature phase inversion were optimized. The hydrodynamic characteristics of the particles and their resistance to aggregation were assessed using dynamic light scattering. The systems based on the stearic acid and surfactant Brij 56 have the most beneficial characteristics. The drug's loading efficiency was almost 100%. ATR-FTIR spectroscopy revealed that the incorporation of allapinin into the particle core leads to the formation of non-covalent bonds with the polar area of stearic acid. The prolonged release of allapinin from particles within sodium phosphate buffer at physiological temperature 37°C was demonstrated. The data obtained may provide a foundation for the advancement of a novel allapinin formulation with enhanced biopharmaceutical characteristics.

Keywords: antiarrhythmic drugs, allapinin, solid lipid nanoparticles

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения сердечного ритма занимают центральное место среди заболеваний сердечно-сосудистой системы, вызывают серьезные осложнения в различных системах организма и служат причиной внезапной смерти. Поиск наиболее безопасных и эффективных методов лечения аритмии является одним из приоритетных направлений современной кардиологии [1–3]. Несмотря на успешное внедрение в клиническую практику современных высокотехнологичных методов лечения, таких как хирургическая аритмология, интервенционная аритмология, а также имплантация автоматических устройств, контролирующих ритм сердца, основным и широко используемым методом коррекции нарушений ритма сердца является фармакотерапия [4–6]. Среди основных задач фармации ведущими являются расширение ассортимента лекарственных препаратов и создание эффективных лекарственных препаратов, обладающих минимальными побочными эффектами. Одним из основных требований, предъявляемых к кардиотропным препаратам, является поддержание эффективной концентрации в крови без появления пиковых участков, ответственных за проявление побочных эффектов. Для большинства применяемых лекарственных антиаритмических препаратов фармакологический эффект однократно принятого препарата сохраняется в среднем в течение 3–6 ч. Продление терапевтического эффекта препарата достигается увеличением дозы лекарственного вещества или кратности его введения, что повышает вероятность развития побочных эффектов, вызванных колебаниями концентрации действующего вещества в крови. Одним из наиболее рациональных путей повышения терапевтической эффективности лекарственных препаратов является применение их в пролонгированных формах, имеющих ряд преимуществ перед обычными препаратами. Применение пролонгированных лекарственных форм приводит к достижению терапевтического эффекта при снижении кратности приемов, позволяет избежать колебаний концентраций

действующего вещества в крови, уменьшает токсичность и вероятность возникновения побочных реакций.

Аллапинин – антиаритмический препарат, разработанный в конце 70-х г. XX века, представляет собой бромистоводородную соль алкалоида лаптаконитина, получаемого из наземной части растений аконита белоустого (*Aconitum leucostomum*) и аконита северного (*Aconitum septentrionale*). Это соединение умеренно растворимо в метаноле, мало растворимо в воде (до 9 мг/мл), очень мало растворимо в хлороформе и спирте (менее 1 мг/мл). Механизм действия лаптаконитина (аллапинина) сводится к блокаде быстрого входящего натриевого тока через мембрану кардиомиоцита, что делает его типичным антиаритмическим средством [7]. Рядом клинических исследований была доказана высокая эффективность длительного применения аллапинина для профилактики угрожающих жизни желудочковых аритмий и внезапной смерти. Препарат включен российскими экспертами в число лекарств, которые рекомендуется использовать у пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП) для лучшего контроля за синусовым ритмом [8]. Кроме того, лаптаконитин фигурирует в перечне жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП), утвержденном распоряжением Правительства РФ.

Однако, препарат обладает рядом внекардиальных побочных эффектов, связанных с влиянием на центральную нервную систему (ЦНС), не позволяющих у части больных в полной мере добиться желаемого антиаритмического действия или при его достижении продолжить лечение [9, 10]. Они проявляются такими симптомами, как головокружение, диплопия, нарушение координации движений. Все эти побочные действия (ПД) имеют отчетливую связь с дозой препарата, усиливаясь при ее увеличении, что определяет в ряде случаев невозможность достижения антиаритмического эффекта препарата, также зависящего от дозы. Описанная картина делает актуальной и практически значимой

задачу поиска путей устранения нежелательных побочных эффектов аллапинина, что возможно через изменение лекарственной формы препарата.

Аллапинин, попадая в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), относительно быстро всасывается, создавая избыточную концентрацию в плазме крови, которая быстро снижается благодаря активному метаболизму в печени и выведению из организма. Именно избыточная концентрация аллапинина определяет его побочные действия и преходящий, часто кратковременный их характер. Таким образом, актуальной является разработка систем пероральной доставки для оптимизации биофармацевтических свойств аллапинина.

Так, в работе Wenxiu et al. продемонстрирована возможность иммобилизации аллапинина в ионный биополимер Iota-carrageenan с эффективностью загрузки 26.18% [11]. Однако, полное время высвобождения препарата из комплекса в водной среде при 37°C и pH 7.4 составляло не более 6 ч, что может являться недостаточным, так как согласно фармакокинетическому профилю стандартного препарата его максимальная концентрация в крови при пероральном применении поддерживается в течении 12 часов [12]. При этом снижение pH раствора инкубации до 6.6 приводит к полному высвобождению вещества за 3 ч, что может негативно сказаться на терапевтическом действии препарата при преодолении кислотного барьера желудка.

В работах [13, 14] были проведены исследования по изучению липосомальной модифицированной формы аллапинина, полученной комплексообразованием с моноаммонийной солью глицирризиновой кислоты (MASGA). Комплекс препарата в мольном соотношении 1 : 4 с MASGA обладает высокой растворимостью и более выраженной антиаритмической активностью в сравнении с простым аллапином и сохраняет восстановленную сократительную активность в течение более длительного времени. В результате проведенных исследований авторы показали, что при

высвобождении комплекса аллапинин-MASGA в липосомальной форме в крови за первые 30 мин высвобождается 32% аллапинина. Скорость высвобождения стабилизировалась в течение 2 ч после введения и практически не снижалась в течение последующих 3 ч эксперимента, что свидетельствует о перспективности использования липосом, нагруженных комплексом аллапинин/MASGA, в качестве лекарственной формы с пролонгированным высвобождением [15].

В работе [16] была изучена возможность инкапсуляции комплекса Аллапинин-MASGA в полиэлектролитные микрокапсулы на основе полиаллиламина и полистиролсульфоната. Было выявлено, что метод сорбции позволяет инкапсулировать в микрокапсулы до 80% Ал : MASGA от исходного содержания вещества в растворе.

Благодаря уникальным свойствам, включая повышенную стабильность, контролируемое высвобождение, улучшенную биодоступность и возможность придания эффекта активного нацеливания на определенные клетки или ткани твердые липидные наночастицы (SLN) привлекли значительное внимание как перспективные носители для доставки лекарств [17, 18]. С химической точки зрения SLN представляют собой коллоидный носитель на основе твердого липидного ядра, стабилизированного слоем поверхностно-активного вещества [19]. Такое строение облегчает инкапсуляцию малорастворимых липофильных соединений, защищая их от преждевременной деградации и увеличивая время циркуляции в кровотоке при системном введении [20, 21]. SLN сочетают преимущества полимерных наночастиц и липосом, но при этом лишены многих их недостатков, таких как недостаточная стабильность при хранении и высокая стоимость производства. Благодаря биосовместимому составу, контролируемому высвобождению лекарства и повышению его биодоступности, SLN рассматриваются как перспективная платформа для доставки лекарственных средств [22]. Так, в опубликованных работах Широких и др. [23] описано успешное применение подобных

систем для доставки лютеина. SLN использовались и для дизайна систем доставки противоопухолевых препаратов тимохинона и доксорубина [24].

Попытка включения антиаритмических препаратов в липидные контейнеры была предпринята в работе Agrawal [25]. Авторы создали систему доставки верапамила, которая характеризовалась эффективностью включения 80.32%, что является достаточно высоким значением для данного типа носителей. Препарат SLN с включенным в них лекарством обладает двухфазным действием: сначала происходит быстрое высвобождение, затем устойчивое высвобождение (75–80%) на протяжении 24 ч. В модели инфаркта миокарда, индуцированного изопроналином, SLN с верапамилом продемонстрировали выраженный кардиопротективный эффект: нормализацию систолического и диастолического давления, снижение маркеров повреждения сердца (CK-MB, LDH), улучшение гемодинамических параметров и уменьшение степени некроза, воспаления и отека по данным гистопатологического анализа.

Guo и др. связали аллапинин с SLN и наноструктурированными липидными носителями (NLC) и использовали трансдермальное введение путем нанесения этих частиц на поверхность кожи [26]. Подобный способ введения препарата позволяет увеличить время высвобождения препарата до 70 ч, однако его концентрация не превышает 200 нг/мл, что является недостаточным для терапевтического эффекта.

В связи с вышесказанным, разработка пероральной системы доставки аллапинина на основе SLN является актуальной и своевременной задачей.

Целью настоящей работы является подбор состава твердых липидных наночастиц для включения аллапинина и исследование их физико-химических свойств, а также профиля высвобождения в модельных условиях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Стеариновая кислота (ч.д.а.), таблетки для приготовления 0.02 М натрий фосфатного буферного раствора pH 7.4 – Sigma-Aldrich (США); поверхностно-активные вещества Tween 20, Tween 80, Brij 30, Brij 56, Brij 58 и Span 60 – SERVA (Германия); Аллапинин® (лаппаконитина гидробромид) (Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова, Республика Узбекистан).

Получение SLN

В расплав стеариновой кислоты массой 100 мг при 70°C добавляли раствор, содержащий определенное количество (25, 50 или 100 мг) ПАВ (Tween 20, Tween 80, Brij 30, Brij 56, Brij 58), также нагретый до 70°C при интенсивном перемешивании. Контроль температуры осуществляли с помощью термопары. Затем смесь резко опускали в емкость со льдом (температура –5°C, контролировали с помощью лабораторного термометра) и подвергали воздействию ультразвука Bandelin Sonopuls 22 кГц с мощностью 50% в течение 10 мин в непрерывном режиме.

Получение нагруженных аллапонином SLN

К расплаву 100 мг стеариновой кислоты добавляли 10 мл раствора аллапинина с концентрацией 0.1 мг/л, содержащего 50 мг Brij 56, при интенсивном перемешивании. Затем смесь резко опускали в емкость со льдом и подвергали воздействию ультразвука Bandelin Sonopuls 22 кГц с мощностью 50% в течение 10 мин.

Метод динамического светорассеяния

Определение размеров и дзета-потенциала частиц проводили с помощью Zetasizer Nano S «Malvern» (Англия) (4 мВт He–Ne-лазер, 633 нм) в термостатируемой ячейке при 22°C. Использовали программное обеспечение Malvern ZetaSizer Software v 3.30 для анализа получаемой автокорреляционной функции и вычисления размера и ζ -потенциала частиц. Для каждого образца проводили 11 повторов, определяли средний гидродинамический диаметр и величину индекса полидисперсности PDI.

ИК-спектроскопия Фурье в режиме нарушенного полного внутреннего отражения

ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Фурье Tensor 27 «Bruker» (Германия), оснащенным МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, с термостатом фирмы «Huber» (США). Измерения проводили в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, BioATR-II, «Bruker», Германия) с использованием кристалла однократного отражения ZnSe при 22°C и постоянной скорости продувки системы сухим воздухом аппаратом «Jun-Air» (Германия). На кристалл ячейки НПВО наносили аликвоту (50 мкл) образца, спектр регистрировали трижды в интервале от 4000 до 950 см^{-1} , с разрешением 1 см^{-1} ; производили 70-кратное сканирование и усреднение. Фон регистрировали аналогично. Спектры анализировали с помощью программы Opus 7.0 Bruker.

Детальный анализ полосы поглощения карбонильной группы проводили методом деконволюции. Для этого спектральную область 1640–1780 см^{-1} вырезали и применяли функцию «вторая производная» для обнаружения основных компонент. Уточняли положение компонент с помощью последующего анализа Curve fit с разложением по Гауссу на 5 компонент (1654.7 см^{-1} , 1681.9 см^{-1} , 1697.6 см^{-1} , 1710.3 см^{-1} , 1727.5 см^{-1}) с ошибкой, не превышающей 2%. Интегрировали площадь полученных компонент и вычисляли интегральную долю каждой из них по методике [27].

Флуоресцентная спектроскопия

Регистрировали спектр эмиссии аллапинина в водных растворах при длине волны возбуждения 260 нм в интервале от 270 нм до 500 нм с помощью спектрометра Spectramax M5. Определяли интенсивность максимума эмиссии при 400 нм.

Определение эффективности включения препарата в частицы

Для определения эффективности включения аллапинина в твердые липидные частицы отделяли невключившийся препарат от частиц с помощью ультрацентрифугирования. Исходную суспензию помещали в центрифужную пробирку, снабженную фильтром для ультрацентрифугирования Amicon с массой отсечения 3 кДа. Центрифугирование проводили по методике, рекомендованной производителем: 10000 об/мин с угловым ротором F-45-12-11 в течение 10 мин с помощью центрифуги Eppendorf Mini spin. От полученного фильтрата регистрировали спектр флуоресценции аллапинина. Концентрацию определяли по калибровочной кривой, полученной в независимом эксперименте. Количество включенного лекарства рассчитывали как разность между массой добавленного препарата на этапе получения частиц и его содержанием в фильтрате.

Исследование кинетики высвобождения аллапинина

Проводили исследования в 0.02 М натрий-фосфатном (pH 7.4) буферном растворе, использовали 1200 мкл образца и 1200 мкл внешнего раствора на свету. Образец частиц переносили в диализную капсулу фирмы SERVA с массой отсечения 3 кДа, помещали в шейкер-инкубатор ES-20 Biosan с частотой колебаний 150 об/мин при температуре 37°C. В течение 3 час отбирали пробы внешнего раствора объемом 60 мкл каждые 20 мин, замещая свежей порцией буферного раствора, детектировали спектр флуоресценции

аллапинина. Определяли содержание лекарственного препарата по калибровочной кривой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация состава твердых липидных частиц (SLN)

Для создания системы доставки аллапинина на основе SLN был проведен подбор состава частиц, а именно стабилизирующего поверхностно-активного вещества (ПАВ) и массового соотношения ядро/ПАВ [28]. В настоящей работе предпринята попытка систематического поиска оптимального состава путем вариации ПАВ (семейства Tween и Brij, а также Span 60) и его массовой доли. Существенной характеристикой ПАВ является гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) [29]. Выбранные ПАВ характеризуются переменным значением ГЛБ (Рис. 1), что может позволить выявить роль данного параметра в дизайне твердых липидных наночастиц.

Рис. 1. Формулы поверхностно-активных соединений, используемых для синтеза SLN, и их ГЛБ.

Ключевыми параметрами SLN являются гидродинамический диаметр частиц после получения и при хранении [30]. При подборе методики синтеза частиц варьировалось количество добавленного ПАВ, что приводило к изменению их гидродинамического диаметра D_h и ζ -потенциала (Таблица 1). Для создания систем пероральной доставки с замедленным высвобождением желательно, чтобы частицы обладали гидродинамическим диаметром менее 500 нм и высокой степенью гомогенности.

Таблица 1. Зависимость гидродинамического диаметра и ζ -потенциала от состава SLN.

Ядро частиц – стеариновая кислота. Варьировали ПАВ и его массовую долю относительно ядра.

ПАВ	Содержание ПАВ относительно массы ядра, %	Dh , нм (SD, $n = 11$)	PDI (SD, n $= 11$)	ζ -потенциал, мВ (SD, $n = 11$)
Tween 20	25	539 ± 18	0.596 ± 0.132	-25.6 ± 1.5
	50	938 ± 66	0.517 ± 0.158	-19.3 ± 1
	100	1199 ± 32	0.658 ± 0.200	-14.0 ± 0.3
Tween 80	25	1241 ± 85	0.748 ± 0.120	–
	50	1408 ± 100	0.552 ± 0.200	-21.0 ± 0.1
	100	2085 ± 414	0.912 ± 0.109	-25.7 ± 0.1
Brij 30	25	1363 ± 515	1.0 ± 0	-31.7 ± 0.5
	50	4038 ± 936	0.471 ± 0.078	-26.2 ± 1.0
	100	2245 ± 495	1.0 ± 0	-33.3 ± 1.0
Brij 56	25	157 ± 21	0.291 ± 0.092	-30.0 ± 1.0
	50	124 ± 4	0.146 ± 0.054	-16.5 ± 1.1
	100	238 ± 34	0.228 ± 0.105	-15.5 ± 1.2
Brij 58	25	1005 ± 309	0.790 ± 0.240	-27.7 ± 1.3
	50	731 ± 77	0.744 ± 0.229	-14.8 ± 0.8
	100	672 ± 62	0.610 ± 0.137	-32.0 ± 1.8
Span 60 10% Brij 30	25	1805 ± 469	0.976 ± 0.039	-29.6 ± 0.7
	50	2360 ± 50	1.0 ± 0	-30.4 ± 1.1
	100	1944 ± 461	1.0 ± 0	-30.3 ± 1.7
Span 60 10%	25	2341 ± 631	1.0 ± 0	-24.3 ± 0.8
	50	9723 ± 1743	1.0 ± 0	-18.0 ± 0.6

Brij 56	100	9118 ± 1284	0.508 ± 0.189	-14.1 ± 0.6
---------	-----	-----------------	-------------------	-----------------

Установлено, что тип ПАВ и его массовая доля оказывают существенное влияние на гидродинамические параметры частиц, в том числе на индекс полидисперсности. Учитывая, что при величине PDI более 0.7 систему нельзя отнести к гомогенным, выбор комбинаций ядра и ПАВ сужается. При этом комбинация ПАВ Span 60 – Brij не дала улучшения свойств. Наиболее подходящие гидродинамические параметры имеют частицы, полученные с использованием чистой стеариновой кислоты в качестве твердого ядра и 25% и 50% по массе относительно массы ядра Brij 56 в качестве поверхностно-активного вещества. При этом для этих частиц индекс PDI характеризовался наименьшим значением, что свидетельствует о формировании популяции частиц, гомогенных по размеру. Для дальнейших экспериментов были выбраны частицы с меньшим содержанием ПАВ. Они имеют средний гидродинамический радиус 157 ± 21 нм и ζ -потенциал -30 ± 1 мВ. Для этих частиц в независимом эксперименте оценивали стабильность при хранении при $+4^\circ\text{C}$. Показано, что за две недели хранения произошли незначительные колебания гидродинамических параметров (в пределах 10%) по данным динамического светорассеяния, при этом не наблюдалось выпадение осадка.

Считается, что при достижении оптимального уровня ГЛБ в процессе производства можно получить мельчайшие капли эмульсии, что позволит получить частицы наименьшего размера с небольшим индексом полидисперсности [31]. В практических рекомендациях по приготовлению эмульсий описано определение “требуемого ГЛБ”. Существует теория, что значение ГЛБ стабилизатора должно максимально соответствовать требуемому значению ГЛБ внутренней фазы для получения мелкодисперсных и физически стабильных эмульсий [32]. Однако А. Kovacevic далее указывает на то, что теория “требуемого ГЛБ” не может быть использована для

объяснения различий между стабилизирующим действием различных ПАВ. Фактически, его результаты доказывают, что разработка мелкодисперсной и физически стабильной системы липидных наночастиц является очень сложной, еще не до конца изученной задачей.

Наши результаты также показывают, что теория “требуемого ГЛБ” не объясняет различий в стабилизирующем действии ПАВ. Так, для стеариновой кислоты характерно значение ГЛБ = 17. В соответствии с этой теорией мы могли бы ожидать получение частиц с наилучшими свойствами при использовании ПАВ Tween 80 (ГЛБ = 16.9). Однако SLN, обладающие наилучшими свойствами, формируются при ГЛБ ПАВ = 12.9 (Brij 56). Использование ПАВ как с большими, так и с меньшими значениями данного показателя существенно ухудшает параметры получаемых частиц. Судя по всему, при неизменном составе ядра есть некоторый оптимум значения данного параметра, соответствующий в данном случае значению ГЛБ для Brij 56 (12.9), однако выявление причин требует дальнейших исследований.

Загрузка аллапинина в SLN и характеристика полученных систем

Выбранный состав частиц (ядро из стеариновой кислоты, стабилизирующий ПАВ – Brij 56) был протестирован для загрузки антиаритмического препарата аллапинина. Для этого его добавляли в раствор ПАВ на этапе синтеза самих частиц в массовом соотношении 1 : 150 в пересчете на стеариновое ядро. Включение препарата приводило к незначительному изменению ζ -потенциала без изменения гидродинамического диаметра (Таблица 2). Существенного влияния на индекс полидисперсности включение аллапинина также не оказывало.

Таблица 2. Сравнение гидродинамических параметров свободных SLN и SLN, нагруженных аллапинином.

Образец	Dh , нм (SD, n = 11)	PDI (SD, n = 11)	ζ -потенциал, мВ (SD, n = 11)
Свободные SLN (контроль)	157 ± 21	0.291 ± 0.092	-30 ± 1
SLN, нагруженные аллапинином	160 ± 20	0.270 ± 0.108	-24 ± 2

Для определения эффективности включения препарата в SLN использовали флуоресцентный анализ, в связи с тем, что аллапинин обладает характерным спектром флуоресценции с максимумом при 400 нм при длине волны возбуждения 260 нм. Была получена соответствующая калибровочная зависимость (Рис. 2), по которой рассчитывали количество включенного препарата. При массовом соотношении лекарство-носитель 1 : 150, эффективность включения составила около 100%, что подтверждает сродство аллапинина к SLN. Полученная в эксперименте эффективность загрузки сопоставима с описанными ранее. Так, в работе [11] авторы демонстрируют загрузку аллапинина в полиэлектролитные комплексы с эффективностью около 25%. Для антиаритмического препарата верапамила сообщают об эффективности загрузки около 80% [33, 34]. Таким образом, системы на основе SLN могут быть более предпочтительны для доставки аллапинина.

Рис. 2. Калибровочная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации аллапинина в водном растворе. Измерения проводились при температуре 25°C. Спектр

эмиссии аллапинина регистрировали при длине волны возбуждения 260 нм в интервале от 270 нм до 500 нм. Определяли интенсивность максимума эмиссии при 400 нм.

Для исследования тонкой структуры SLN, загруженных аллапином, был использован метод ИК-спектроскопии Фурье в режиме нарушенного полного внутреннего отражения, позволяющий анализировать оптически непрозрачные коллоидные системы. Данный метод хорошо зарекомендовал себя как высокоинформативный и экспрессный подход для анализа липидных систем, в том числе SLN [35]. Так, в работе [33] показано включение верапамила, препарата группы блокаторов кальциевых каналов с противоаритмической активностью, в SLN с использованием ИК-спектроскопии.

На Рис. 3 показан общий вид ИК-спектра свободных и загруженных препаратом SLN, полученных в данной работе. Как видно, на спектре присутствуют только полосы, соответствующие компонентам частиц, так как концентрация аллапинина в образцах частиц находится вне предела обнаружения данного метода. Обращают на себя внимание наиболее интенсивные полосы, соответствующие асимметричным и симметричным валентным колебаниям CH_2 групп в жирнокислотных цепях (область $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$), а также полоса поглощения карбонильной группы в области $1650\text{--}1800\text{ см}^{-1}$. При этом, в отличие от типичных ИК-спектров монокомпонентных липидных систем, полоса поглощения карбонильной группы в изучаемых образцах, очевидно, представляет собой комбинацию нескольких полос, что свидетельствует о существовании нескольких популяций карбонильных групп, отличающихся по степени гидратации. Подробно этот спектральный паттерн был изучен нашим коллективом ранее [36]. В настоящей работе для выявления различий мы использовали разработанную методологию на основе деконволюции полосы поглощения карбонильной группы.

Рис. 3. Общий вид ИК-спектра свободных (синий) и нагруженных аллапинином (красный) SLN. Спектры регистрировались при 22°C в водных суспензиях.

На Рис. 4 представлена область поглощения карбонильной группы в спектрах свободных SLN (а) и нагруженных аллапинином (б). Установлено, что при включении препарата происходит изменение микроокружения карбонильных групп в полярной части стеариновой кислоты, связанное с перераспределением по степеням гидратации.

Рис. 4. Деконволюция полосы поглощения карбонильной группы в спектрах (а) свободных SLN и (б) SLN, нагруженных аллапинином (массовое соотношение 1 : 150).

Деконволюция проводилась с помощью Гауссовых кривых. Уточняли положение компонент с помощью последующего анализа Curve fit с разложением по Гауссу на 5 компонент ($1 - 1654.7 \text{ см}^{-1}$, $2 - 1681.9 \text{ см}^{-1}$, $3 - 1697.6 \text{ см}^{-1}$, $4 - 1710.3 \text{ см}^{-1}$, $5 - 1727.5 \text{ см}^{-1}$). Ошибка разложения не превышает 2%. Спектры регистрировались при 22°C в водных суспензиях.

Для количественной оценки влияния аллапинина на микроокружение карбонильных групп проводили интегрирование отдельных компонент соответствующей полосы поглощения и оценивали их интегральную долю. На Рис. 5 приведено распределение компонент по их интегральной доли. Мажорной компонентой в случае и нагруженных, и свободных (контрольных) частиц является компонента при 1681.9 см^{-1} , что свидетельствует о низкой степени гидратации карбонильных групп. Это соответствует агрегатному состоянию твердого липидного ядра стеариновой кислоты. Включение аллапинина в частицы достоверно снижает долю данной компоненты и увеличивает долю

компоненты при 1727.5 см^{-1} , которая соответствует карбонильным группам, образовавшим водородные связи с аллапинином. Несмотря на формально невысокое содержание аллапинина в частицах, наблюдается существенное перераспределение карбонильных групп по степеням гидратации: активная молекула действительно встраивается в ядро из стеариновой кислоты.

Рис. 5. Интегральный вклад отдельных компонент в области поглощения карбонильных групп по данным деконволюции в спектрах свободных SLN (серые столбцы) и SLN, загруженных аллапинином (массовое соотношение 1 : 150) (черные столбцы).

Деконволюция проводилась с помощью Гауссовых кривых. Ошибка разложения не превышает 2%. Спектры регистрировались при 22°C в водных суспензиях.

Таким образом, включение аллапинина в ядро SLN носит не только физический характер, но дополнительно приводит к образованию нековалентных взаимодействий с полярной частью стеариновой кислоты.

Кинетика высвобождения аллапинина

В модельном эксперименте было исследовано высвобождение аллапинина из SLN в натрий-фосфатном буфере с $\text{pH} = 7.4$ при физиологической температуре 37°C . По калибровочной прямой зависимости концентрации аллапинина от интенсивности флуоресценции при длине волны 400 нм определяли концентрацию аллапинина в каждый момент времени. Полученная зависимость представлена на Рис. 6.

Рис. 6. Профиль высвобождения аллапинина из SLN составом стеариновая кислота – Brij 56 в натрий-фосфатном буферном растворе $\text{pH} 7.4$ при 37°C .

Известно, что лекарства, загруженные в SLN, высвобождаются за счет эрозии поверхности липидной матрицы, ее разрушения и диффузии молекул карго, при этом кинетика этого процесса во многом зависит от локализации лекарства в частице [37]. Например, сообщается и о возможности быстрого высвобождения лекарства, и о существенном замедлении (несколько суток) [23, 38]. Ключевую роль в реализации того или иного профиля играет природа самой активной молекулы и соответствующих липидов– компонентов частиц.

Наблюдаемый в данном эксперименте профиль свидетельствует о достаточно быстром высвобождении первой порции аллапинина (40 процентов) в течение двух часов, что является благоприятным для системы пероральной доставки. Подобные кинетические закономерности указывают на распределение аллапинина в частицах, характеризующееся существенным содержанием в приповерхностном слое SLN. Наблюдаемый в работе профиль высвобождения согласуется с таковым для частиц, нагруженных другим антиаритмическим препаратом, верапамилем, для различных составов частиц [33, 34].

Таким образом, включение аллапинина в твердые липидные частицы позволяет создавать системы доставки с замедленным высвобождением и улучшенными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка систем доставки антиаритмических препаратов остается крайне актуальной задачей. Применение таких лекарств ограничено их невысокой растворимостью, а также значительными побочными эффектами. Включение антиаритмических препаратов в носители может обеспечить его пролонгированное действие, тем самым уменьшая необходимую единоразовую дозировку, что, в свою

очередь, позволит повысить качество жизни пациентов за счет уменьшения побочных эффектов.

В настоящей работе разработана методика создания систем доставки антиаритмических препаратов на основе твердых липидных наночастиц. Показано, что полученные системы являются стабильными в водных растворах, а также действительно обеспечивают пролонгированное высвобождение препарата. Высокая эффективность загрузки аллапинина указывает на перспективность использования подхода к включению данной молекулы в твердые липидные наночастицы.

Начатые в данной работе исследования позволяют рассчитывать на будущий еще более существенный прогресс в развитии систем доставки антиаритмических препаратов и их дальнейшее внедрение в широкое производство для повышения качества жизни пациентов, страдающих аритмией.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 22-13-00261П), тем с гос. регистрацией 121041500039-8 и 123032300028-0, программы развития МГУ и средств бюджета Института биоорганической химии имени академика А.С. Садыкова АН РУз.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования на людях или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Благова О.В., Гиляров М.Ю., Недоступ А.В. и др.* Медикаментозное лечение нарушений ритма сердца // Под ред. В. А. Сулимова – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 448 с.
2. *Миронов Н.Ю., Лайович Л.Ю., Миронова Е.С. и др.* Новые достижения в диагностике и лечении фибрилляций предсердий: от экспериментальных исследований до повседневной клинической практики // Терапевтический архив. 2019. Т. 91. № 6. С. 11–18.
<https://doi.org/10.26442/00403660.2019.06.000295>
3. *Brodniewicz T., Gryniewicz G.* Preclinical drug development // Acta Pol. Pharm. 2010. V. 67. № 6. P. 578–585.
4. *Дощицин В.Л., Сыров В.Л., Павлова Т.В.* Применение антиаритмических препаратов: рекомендации и реальная клиническая практика // Consilium Medicum. 2019. Т. 21. №10. С. 86–94.
<https://doi.org/10.26442/20751753.2019.10.190441>
5. *Чазов Е.И.* Защитные системы организма как основа поиска и разработки новых оригинальных лекарственных средств // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 67. № 5. С. 6–7.
6. *Camm A.J.* Hopes and disappointments with antiarrhythmic drugs // International Journal of Cardiology. 2017. V. 237. P. 71–74.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.03.056>
7. *Соколов С.Ф., Джагангиров Ф.Н.* Антиаритмический препарат аллапинин: обзор результатов клинического изучения // Кардиология. 2002. № 7. С. 96–102.
8. *Соколов С.Ф., Бакалов С.А., Миронова Н.А., Рогова М.М., Малкина Т.А., Голицын С.П.* Эффективность и безопасность аллапинина при краткосрочном и длительном лечении больных с доброкачественной желудочковой экстрасистолой // Кардиология. 2014. № 1. С. 20–26.

9. Sokolov S.F., Belyaeva M.M., Bakalov S.A., Golitsin S.P. Comparative efficacy and safety of two medicine forms of lappaconitin hydrobromide in patients with ventricular extrasystole without organic pathology of the hear // *Kardiologiya*. 2017. T. 57. № 4. P. 45–52.

<https://doi.org/10.18565/cardio.2017.4.45-52>

10. Dzhakhangirov F.N., Sokolov S.F. New antiarrhythmic medicine Allapinin (pharmacology and clinical use) // Tashkent, 2004.

11. Sun W.; Saldaña M.D.A.; Zhao Y.; Wu L.; Dong T.; Jin Y.; Zhang J. Hydrophobic lappaconitine loaded into iota-carrageenan by one step self-assembly // *Carbohydr. Polym.* 2016. V. 137. P. 231–238.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.060>

12. Арчакова О.А., Багаева Н.С., Комаров Т.Н., Рогов А.В., Щелгачева Д.С., Суворова А.В., Карнакова П.К., Карпова П.А., Шохин И.Е. Изучение фармакокинетики пролонгированного антиаритмического препарата лаппаконитина гидробромида (Аллафорте®, АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022. Т. 11. № 1. С. 140–147. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-140-147> [Archakova O.A.; Bagaeva N.S.; Komarov T.N.; Rogov A. V.; Shchelgacheva D.S.; Suvorova A. V.; Karnakova P.K.; Karpova P.A.; Shohin I.E. Pharmacokinetics study of the long-acting antiarrhythmic drug of lappaconitine hydrobromide (Allaforte®, JSC “Pharmcenter VILAR”, Russia) // *Drug Dev. Regist.* 2022. V. 11. № 1. P. 140–147.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-140-147>

13. Ziyavitdinov Z.F.; Ishimov U.Z.; Berdiev N.S.; Zhumaev I.Z.; Oshchepkova Y.I.; Usmanov P.B.; Salikhov S.I. Supramolecular Complex of Lappaconitine Hydrobromide and the Monoammonium Salt of Glycyrrhizic Acid: Synthesis, physicochemical characteristics, and antiarrhythmic activity // *Pharm. Chem. J.* 2022. V. 56. № 2. P. 167–173.

<https://doi.org/10.1007/s11094-022-02618-x>

14. *Uzbekov V.V.; Abdullaev B.F.; Jumayev I.Z.; Oshchepkova, Y.I.; Usmanov P.B.; Salikhov S.I.* Comparative study of the antiarrhythmic activity of liposomal forms of lappaconitine hydrobromide and its complex with glycyrrhizic acid monoammonium salt in the aconitine arrhythmia model // *Pharm. Chem. J.* 2023. V. 56. № 2. P. 1327–1332.

<https://doi.org/10.1007/s11094-023-02793-5>

15. *Uzbekov V. V.; Abdullaev B.F.; Ziyavitdinov Z.F.; Ishimov U.Z.; Berdiev N.S.; Oshchepkova Y.I.; Salikhov S.I.* Composition development and experimental study of the liposomal form of an antiarrhythmic drug // *Pharm. Chem. J.* 2022. V. 56. № 8. P. 1064–1069.

<https://doi.org/10.1007/s11094-022-02754-4>

16. *Salikhov S.I.; Musin E.V.; Kim A.L.; Oshchepkova Y.I.; Tikhonenko S.A.* Polyelectrolyte microcapsules: An extended release system for the antiarrhythmic complex of allapinin with glycyrrhizic acid salt // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 5. P. 2652.

<https://doi.org/10.3390/ijms25052652>

17. *Harivardhan Reddy, L.; Murthy, R.S.R.* Etoposide-loaded nanoparticles made from glyceride lipids: Formulation, characterization, *in vitro* drug release, and stability evaluation // *AAPS PharmSciTech.* 2005. V. 6. № 2. P. 24.

<https://doi.org/10.1208/pt060224>

18. *Müller, R.H.; Mäder, K.; Gohla, S.* Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – A review of the state of the art // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000. V. 50. № 1. P. 161–177.

[https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(00\)00087-4](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(00)00087-4)

19. *Cavalli R, Caputo O, Gasco MR.* Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin // *Int. J. Pharm.* 1993. V. 89. № 9. P. 9–12.

20. *Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021. V. 20. № 2. P. 101–124.

<https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>

21. *Paliwal R, Paliwal SR, Kenwat R, Kurmi BD, Sahu MK.* Solid lipid nanoparticles: a review on recent perspectives and patents // *Expert Opin. Ther. Patents.* 2020. V. 30. № 3. P. 179–194.

<https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1720649>

22. *Khairnar S.V.; Pagare P.; Thakre A.; Nambiar A.R.; Junnuthula V.; Abraham M.C.; Kolimi P.; Nyavanandi D.; Dyawanapelly S.* Review on the scale-up methods for the preparation of solid lipid nanoparticles // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. № 9. P. 1886.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091886>

23. *Широких А.Д., Гурулева Ю.А., Маринец Е.А., Королева М.Ю.* Липидные наночастицы для инкапсулирования и доставки лютеина // *Коллоидный журнал.* 2023. Т. 85. № 5. С. 705–714. <https://doi.org/10.31857/S0023291223600530> [*Shirokikh, A.D., Guruleva, Y.A., Marinets, E.A. et al.* Lipid nanoparticles for lutein encapsulation and delivery // *Colloid J.* 2023. V. 85. № 5. P. 817–826.

<https://doi.org/10.1134/S1061933X2360063X>

24. *Мищенко Е.В., Гилёва А.М., Марквичева Е.А., Королева М.Ю.* Наноэмульсии и твердые липидные наночастицы с инкапсулированным доксорубицином и тимохиноном // *Коллоидный журнал.* 2023. Т. 85. №5. С. 619–628. <https://doi.org/10.31857/S002329122360058X> [*Mishchenko, E.V., Gileva, A.M., Markvicheva, E.A. et al.* Nanoemulsions and solid lipid nanoparticles with encapsulated doxorubicin and thymoquinone // *Colloid J.* 2023. V. 85. № 5. P. 736–745.

<https://doi.org/10.1134/S1061933X23600707>

25. Agrawal YO, Husain M, Patil KD, Sodgir V, Patil TS, Agnihotri VV, Mahajan HS, Sharma C, Ojha S, Goyal SN. Verapamil hydrochloride loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, optimization, characterisation, and assessment of cardioprotective effect in experimental model of myocardial infarcted rats. // Biomed. Pharmacother. 2022. V. 154. P. 113429.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113429>
26. Guo T.; Zhang Y.; Zhao J.; Zhu C.; Feng N. Nanostructured lipid carriers for percutaneous administration of alkaloids isolated from *Aconitum sinomontanum* // J. Nanobiotechnology. 2015. V. 13. P. 47.
<https://doi.org/10.1186/s12951-015-0107-3>
27. Deygen I.M. et al. Novel Prodrug of doxorubicin modified by stearyl spermine encapsulated into PEG-chitosan-stabilized liposomes // Langmuir. 2016. V. 32. № 42. P. 10861–10869.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01023>
28. Mohammad Reza Arabestani, Ashkan Bigham, Farideh Kamarehei, Mahya Dini, Fatemeh Gorjikhah, Aref Shariati, Seyed Mostafa Hosseini. Solid lipid nanoparticles and their application in the treatment of bacterial infectious diseases // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2024. V. 174. P. 116433.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116433>
29. Ricardo C. Pasquali, Melina P. Taurozzi, Carlos Bregni. Some considerations about the hydrophilic–lipophilic balance system // International Journal of Pharmaceutics. 2008. V. 356. № 1–2. P. 44–51.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.12.034>
30. Koroleva M., Portnaya I., Mischenko E., Abutbul-Ionita I., Kolik-Shmuel L., Danino D. Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions with solid shell: Physical and thermal stability // Journal of Colloid and Interface Science. 2022. V. 610. P. 61–69.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.12.010>

31. Akbari, Jafar Saeedi, Majid Morteza-Semnani, Katayoun Rostamkaleei, Seyyed Sohrab Asadi, Masoumeh Asare-Addo, Kofi Nokhodchi, Ali. The design of naproxen solid lipid nanoparticles to target skin layers // *Colloids Surf B Biointerfaces*. Elsevier B.V. 2016. V. 145. P. 626–633.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.064>
32. Kovacevic A. Savic, S.Vuleta, G.Müller, R. H. Keck, C. M. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure // *Int J Pharm*. Elsevier B.V., 2011. V. 406. № 1–2. P. 163–172.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.036>
33. Agrawal, Yogeeta O. Husain, Muzammil Patil, Kiran D. Sodgir, Vishal Patil, Tulshidas S. Agnihotri, Vinit V. Mahajan, Hitendra S. Sharma, Charu Ojha, Shreesh Goyal, Sameer N. Verapamil hydrochloride loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, optimization, characterisation, and assessment of cardioprotective effect in experimental model of myocardial infarcted rats // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022. V. 154. № 154. P. 113429.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113429>
34. Pilanya, Urmila Pilaniya, K. Chandrawanshi, H. K. Gupta, N. Rajput, M. S. Formulation and evaluation of verapamil hydrochloride loaded solid lipid microparticles // *Pharmazie*. 2011. V. 66. № 1. P. 24–30.
<https://doi.org/10.1691/ph.2011.0061>
35. Stefania Cometa, Maria Addolorata Bonifacio, Giuseppe Trapani, Sante Di Gioia, Laura Dazzi, Elvira De Giglio, Adriana Trapani. *In vitro* investigations on dopamine loaded solid lipid nanoparticles // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020. V. 185. P. 113257.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113257>
36. Deygen I.M., Kudryashova E.V. Structure and stability of anionic liposomes complexes with PEG-chitosan branched copolymer. // *Russ J Bioorg Chem*. 2014. V. 40. P. 547–557.

<https://doi.org/10.1134/S1068162014050057>

37. *Munir, M., Zaman, M., Waqar, M. A., Khan, M. A., & Alvi, M. N.* (2023). Solid lipid nanoparticles: a versatile approach for controlled release and targeted drug delivery. // *Journal of Liposome Research*. 2023. V. 34. № 2. P. 335–348.

<https://doi.org/10.1080/08982104.2023.2268711>

38. *Zur Mühlen A., Schwarz C., Mehnert W.* Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998. V. 45. № 2. P. 149–155.

[https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(97\)00150-1](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(97)00150-1)

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

Рис. 1. Формулы поверхностно-активных соединений, используемых для синтеза SLN, и их ГЛБ.

Рис. 2. Калибровочная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации аллапинина в водном растворе. Измерения проводились при температуре 25°C. Спектр эмиссии аллапинина регистрировали при длине волны возбуждения 260 нм в интервале от 270 нм до 500 нм. Определяли интенсивность максимума эмиссии при 400 нм.

Рис. 3. Общий вид ИК-спектра свободных (синий) и нагруженных аллапинином (красный) SLN. Спектры регистрировались при 22°C в водных суспензиях.

Рис. 4. Деконволюция полосы поглощения карбонильной группы в спектрах (а) свободных SLN и (б) SLN, нагруженных аллапинином (массовое соотношение 1 : 150). Деконволюция проводилась с помощью Гауссовых кривых. Уточняли положение компонент с помощью последующего анализа Curve fit с разложением по Гауссу на 5 компонент ($1 - 1654.7 \text{ см}^{-1}$, $2 - 1681.9 \text{ см}^{-1}$, $3 - 1697.6 \text{ см}^{-1}$, $4 - 1710.3 \text{ см}^{-1}$, $5 - 1727.5 \text{ см}^{-1}$). Ошибка разложения не превышает 2%. Спектры регистрировались при 22°C в водных суспензиях.

Рис. 5. Интегральный вклад отдельных компонент в области поглощения карбонильных групп по данным деконволюции в спектрах свободных SLN (серые столбцы) и SLN, нагруженных аллапинином (массовое соотношение 1 : 150) (черные столбцы). Деконволюция проводилась с помощью Гауссовых кривых. Ошибка разложения не превышает 2%. Спектры регистрировались при 22°C в водных суспензиях.

Рис. 6. Профиль высвобождения аллапинина из SLN составом стеариновая кислота – Brij 56 в натрий-фосфатном буферном растворе pH 7.4 при 37°C.

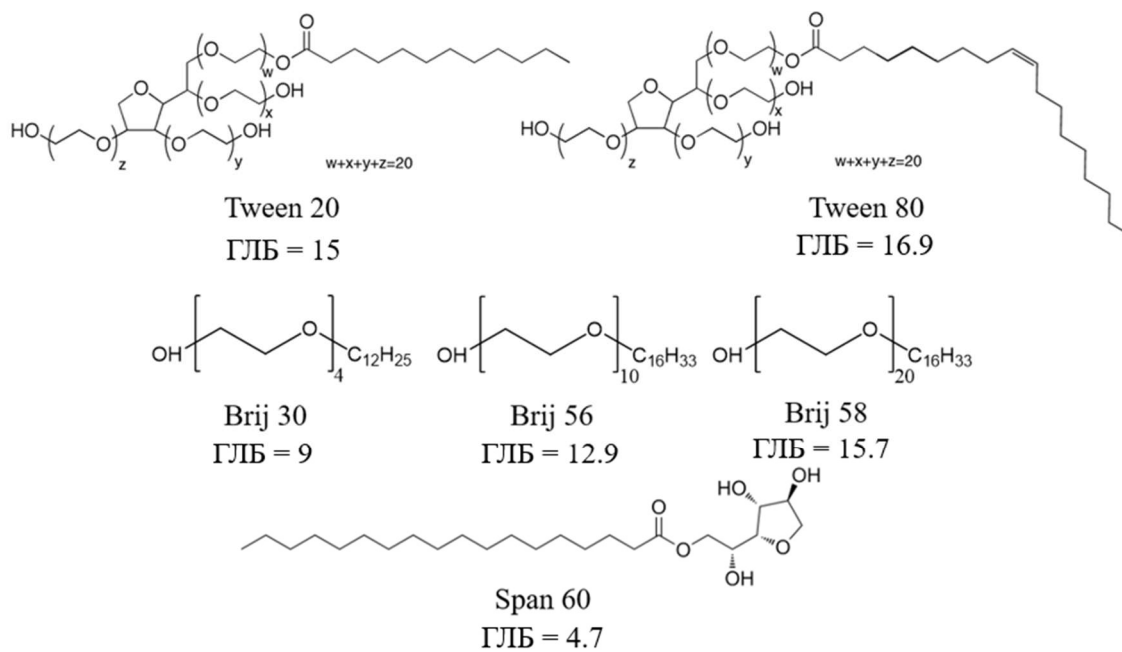


Рисунок 1. Шалыбкова

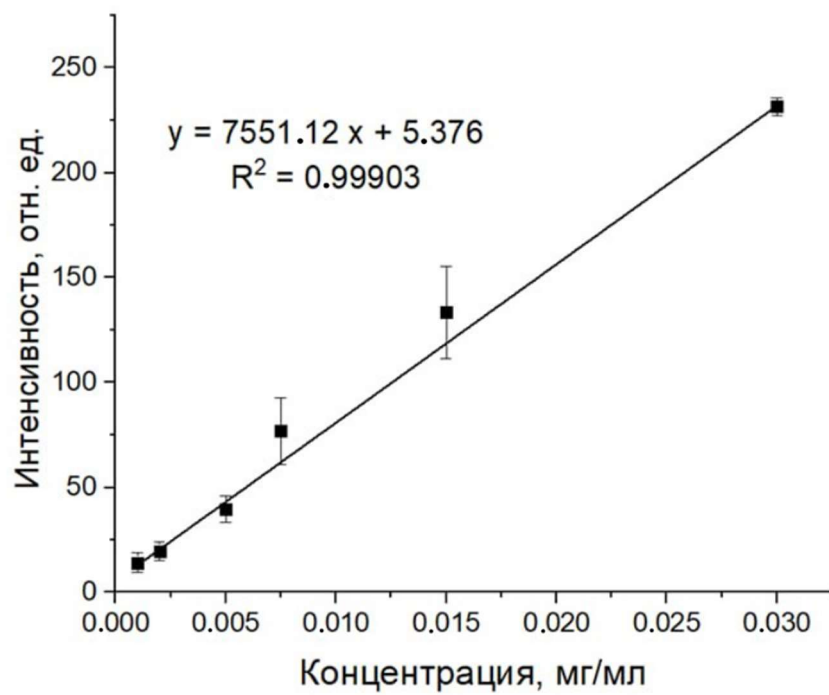


Рисунок 2. Шалыбкова

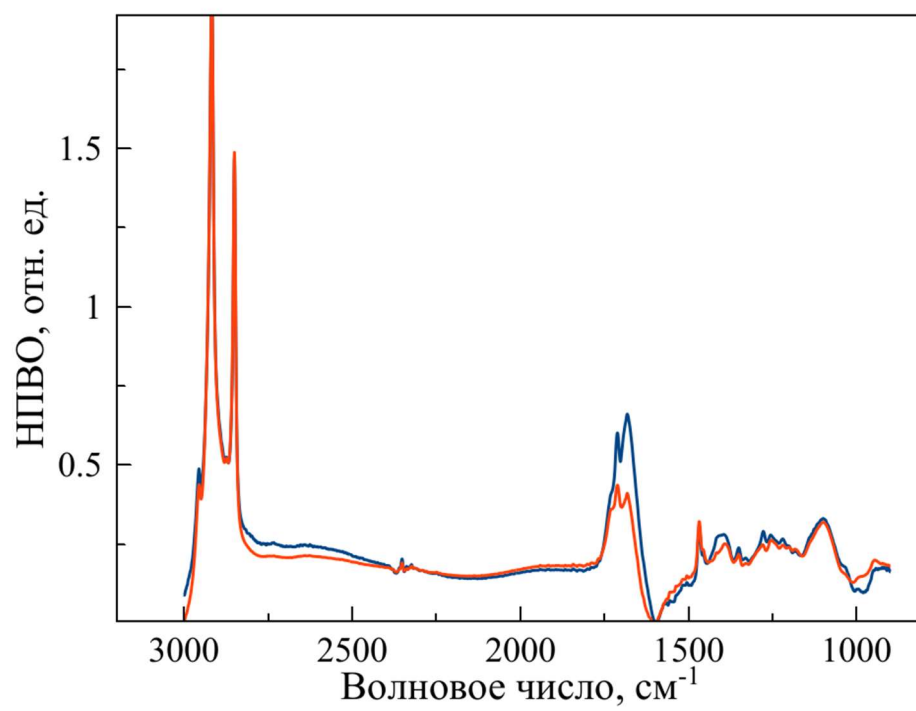


Рисунок 3. Шалыбокова

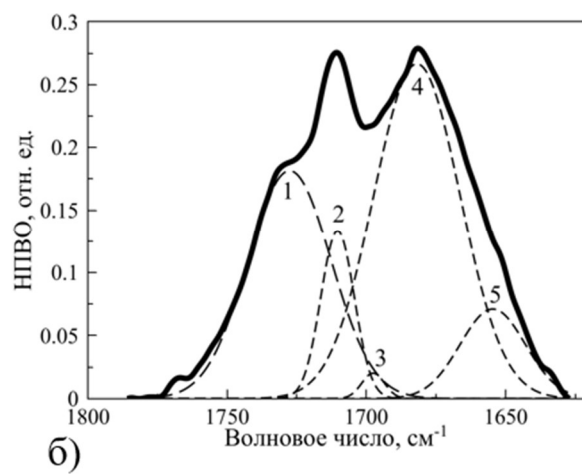
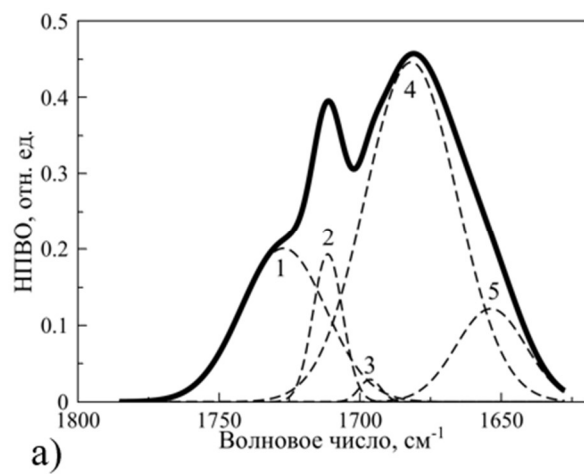


Рисунок 4. Шалыбкова

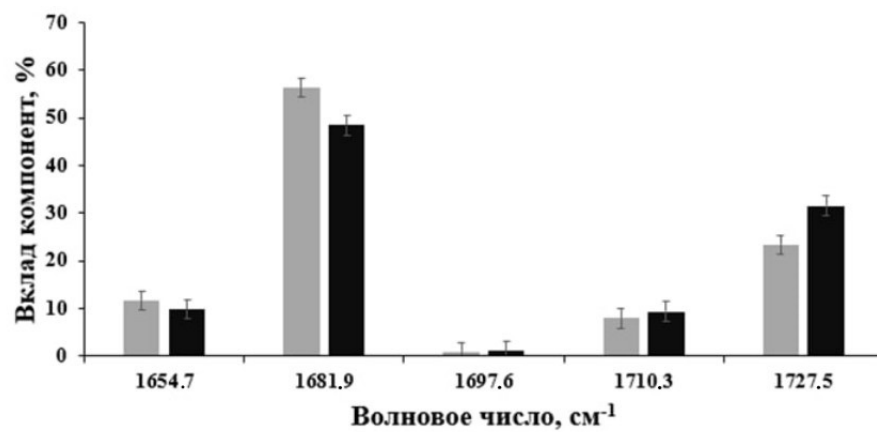


Рисунок 5. Шалыбкова

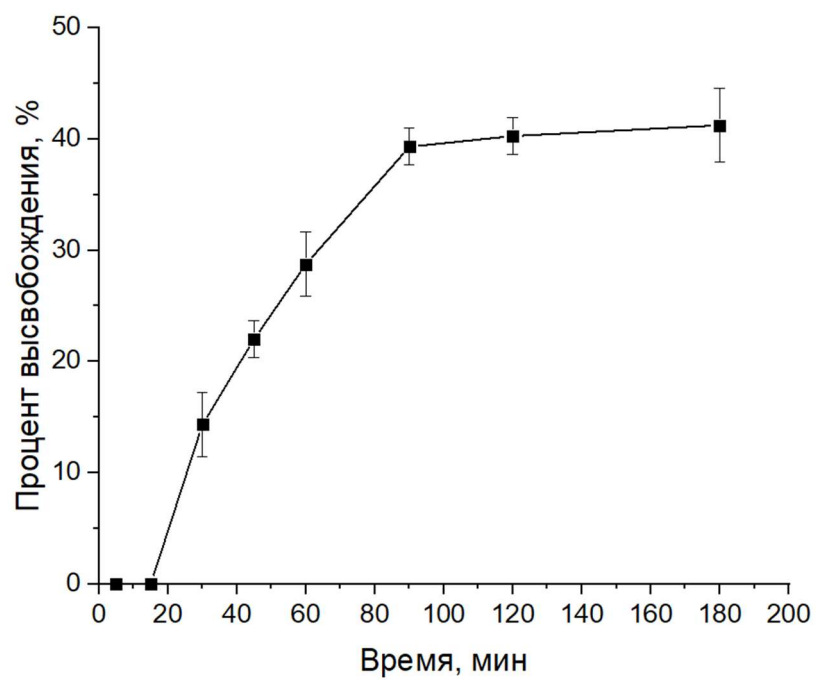


Рисунок 6. Шалыбкова