

## Получение и подтверждение образования комплекса включения пропофола с гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином

Третьяк Данила Алексеевич

Студент кафедры биотехнологии и промышленной фармацевтики  
Московский государственный технологический университет (МИТХТ).

### Введение

Объём рынка лекарственных препаратов в России, за февраль 2016 года составил 46,2 млрд. рублей с учётом НДС и 315,8 млн. упаковок, причём группа лекарственных препаратов (АТС- N), используемая для лечения заболеваний нервной системы по стоимостному объёму находится на 4 месте (11,00%, т.е. 5,08 млрд рублей), а по натуральному объёму на 2 месте (16,36%, т.е. 51,66 млн. упаковок) [1]. Стоит отметить, что все лекарственные препараты на Российском рынке, содержащие пропофол, являются импортными: Диприван (Великобритания), Рекофол (Финляндия), Пропофол Аббот (США), Пропофол Каби, Пропофол Фрезениус (Германия), и др [2]. По этой причине для обеспечения независимости фармацевтического рынка России, а также достижения всеобщей доступности всех видов лекарственных препаратов, необходимо проводить фундаментальные исследования в области улучшения формы, безопасности и качества уже существующих лекарственных препаратов.

2,6-дииозопропилфенол (пропофол) – диалкильное производное гидроксibenзола (фенола), структурная формула которого представлена на рис. 1(А), при комнатной температуре представляет собой летучую прозрачную жидкость желтоватого оттенка с фруктовым запахом, которая впервые была синтезирована и изучена в 1977 года. На сегодняшний день пропофол (ПРФ) является крайне эффективным анестезирующим агентом, который используется повсеместно в клинической практике для индукции и поддержания наркоза, в качестве препарата для местной анестезии, а также в малых дозах ПРФ способен оказывать седативное действие [3,4].

Механизм действия ПРФ складывается из нескольких составляющих [5]. Во-первых, благодаря своей липофильной природе, ПРФ способен проникать через гематоэнцефалический барьер и взаимодействовать с ГАМК-А рецепторами нейронов, которые по этой причине гиперполяризуются, вследствие чего уменьшается время их активности, т.е. пребывания в открытом состоянии [6,7,8]. Во-вторых, ПРФ взаимодействует с блокаторами натриевых каналов, активируя их, таким образом, снижая активность передачи нервных импульсов между «головой» и «хвостом» нейронов [9].

Анестетик приобрёл широкую популярность благодаря своим свойствам: быстрое введение пациента в состояние наркоза, непродолжительное действие активного вещества (небольшой период времени полувыведения), что позволяет легко контролировать протекание наркоза, т.е. в случае ухудшения самочувствия пациента его можно сразу вывести из под анестезии, минимальные остаточные явления (тошнота, усталость, головокружение) после выхода из наркоза [3,4].

Парентеральные лекарственные формы с ПРФ, ввиду его гидрофобной природы, представлены на фармацевтическом рынке в виде эмульсий типа масло-в-воде [2]. Однако указанные лекарственные формы имеют ряд недостатков:

- болезненное введение эмульсии в организм пациента, особенно в небольшие вены из-за взаимодействия ПРФ с болевым рецептором TRPA1 [10];
- липидная форма солюбилизатора является хорошей питательной средой для размножения болезнетворных микроорганизмов, что вынуждает использовать антисептики, а также срок хранения таких эмульсий по этой причине очень мал;
- нарушается липидный баланс организма;
- местные анестезирующие агенты приводят к дестабилизации липидных мицелл и происходит расслоение эмульсий;
- автоклавирование таких эмульсий после упаковки невозможно из-за их температурной лабильности. [11]

По этим причинам, исключительно актуальной задачей является разработка водорастворимой лекарственной формы с ПРФ, которая не только бы обеспечила снижение болевого порога при инъекциях, но и повысила характеристики безопасности, удобства для персонала медицинских учреждений и качества лекарственного средства.

В данной работе для получения водорастворимой лекарственной формы ПРФ в качестве солюбилизатора предлагается использовать гидроксипропил-β-циклодекстрин (ГП-β-ЦД) (его структурная формула приведена на рис. 1 (Б)). Он хорошо зарекомендовал себя в фармацевтической промышленности [12,13]. ГП-β-ЦД, благодаря своему строению, образует комплексы включения со многими гидрофобными веществами, тем самым, увеличивая их растворимость в воде. В целом, циклодекстрины нетоксичны, биоразлагаемы и позволяют увеличивать стабильность и биодоступность трудно- или нерастворимых в воде лекарственных веществ.

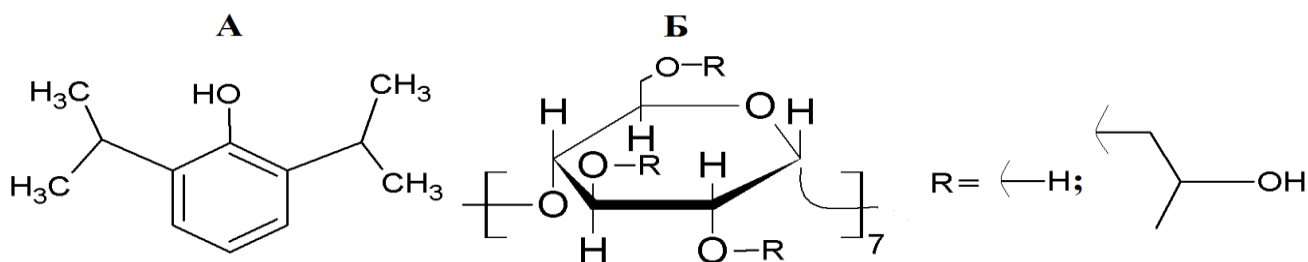


Рис. 1. Структурные формулы (А)- ПРФ, (Б)- ГП-β-ЦД

### Экспериментальная часть

#### Получение комплекса включения ПРФ и ГП-β-ЦД

Комплекс включения получали из ГП-β-ЦД с молекулярной массой 1596 Да и степенью замещения 0,7 (Китай) и ПРФ с молекулярной массой 178 Да (Индия). Навески исходных компонентов, взятые в мольном соотношении ПРФ к ГП-β-ЦД как 1:2 загружались в коническую колбу с обратным водяным холодильником, в неё добавляли спирт этиловый в таком количестве, чтобы массовая доля ГП-β-ЦД в полученном растворе была ≈20 %, и равномерно перемешивали содержимое при температуре 55 °С до полного растворения

компонентов, после чего раствор охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через мембранный фильтр, затем органический растворитель упаривали на роторном испарителе.

#### *Подтверждение образования комплекса включения ПРФ и ГП-β-ЦД методом дифференциальной сканирующей калориметрии*

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии позволяет работать с веществами в различных агрегатных состояниях, и даёт исчерпывающую информацию о фазовых переходах различных соединений, что является основой для подтверждения комплексообразования.

Термограммы ДСК получали в диапазоне температур  $-85 \div 350$  °С на дифференциальном сканирующем калориметре DSC204 F1 Phoenix фирмы "NETZSCH" в потоке аргона со скоростью нагрева 10 °С/мин. Обработку термограмм проводили, соответственно, с помощью программного обеспечения NETZSCH Proteus.

В предварительно взвешенный вместе с перфорированной крышкой пустой стандартный тигель помещали 4 – 8 мг исследуемого образца и запрессовывали. Подготовленные к измерению тигель-эталон (пустой тигель) и тигель с исследуемым образцом помещали в измерительную камеру. Результаты проведённых исследований представлены на рис. 3.

#### *Исследование комплекса включения ПРФ и ГП-β-ЦД спектроскопией ядерного магнитного резонанса*

Универсальный, мощный и точный метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) позволяет провести исследования полученных образцов на предмет отсутствия технологических примесей, а также определить мольное соотношение компонентов в комплексе включений для того, чтобы в дальнейших исследованиях провести оптимизацию процесса производства комплекса и стандартизовать полученный продукт в качестве фармацевтической субстанции.

К точной навеске исследуемого образца (около 50 мг) приливали около 600 мкл воды дейтерированной (дейтерия оксид) (ОФС.1.2.1.1.0007.15). Смесь тщательно перемешивали на вортексе до полного растворения. Полученный раствор переносили в ампулу для ЯМР диаметром 5 мм, закрывали её колпачком и направляли на регистрацию.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры регистрировали на ЯМР спектрометре Avance Bruker DPX-300 с рабочей частотой на протонах 300 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали натриевую соль 3-триметилсилил-1-пропансульфонокислоты (DSS).

Спектры растворов ГП-β-ЦД и комплекса включения ГП-β-ЦД и ПРФ представлены на рис. 4, расшифровка и отнесение сигналов на ЯМР спектрах в табл. 1, условное обозначение атомов углерода в молекулах на рис. 5.

#### *Определение количественного содержания ПРФ в комплексе включения методом УФ-спектрофотометрии*

Комплексы включения - это динамические структуры, их существование зависит от равновесных процессов, которые обеспечиваются слабыми Ван-дер-Ваальсовыми силами [14], поэтому точное количественное содержание «гостей», включившихся внутрь «хозяина», в растворах комплексов заранее предсказать невозможно. По этой причине необходимо проводить количественный анализ включенных веществ в каждой новой синтезированной серии комплекса. В качестве метода определения количественного содержания ПРФ внутри полости ГП-β-ЦД был выбран метод УФ-спектрофотометрии, являющийся достаточно простым и точным.

УФ-спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-104 в диапазоне длин волн 250-300 нм (шаг сканирования 1 нм) при постоянной температуре 20 °С. Коррекция базовой линии проводилась по 96% спирту этиловому. Данные спектрофотометрического анализа обрабатывали с помощью программы UVWin версия 5.1.0.

Количественное содержание ПРФ в комплексе включения определяли с использованием градуировочного графика. Для этого готовили спиртовой раствор комплекса включения с концентрацией 5,42 мг/мл, отбирали аликвоты пробы (120-350 мкл) в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили до метки этиловым спиртом и регистрировали спектр поглощения.

Для построения градуировочного графика, была приготовлена серия из пяти стандартных растворов различных концентраций ПРФ в спирте этиловом (26 мкг/мл – 76 мкг/мл). Для каждого раствора было получено не менее трех параллельных спектрофотометрических измерений. Градуировочный график зависимости интенсивности поглощения светового излучения от концентрации представлен на рис. 2.

Количественное содержание ПРФ в комплексе включения рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V_1 \cdot 10}{k \cdot V_0 \cdot m_{нав}} \cdot 100\% \quad (1)$$

где  $X$  – количественное содержание ПРФ в комплексе включения, %;

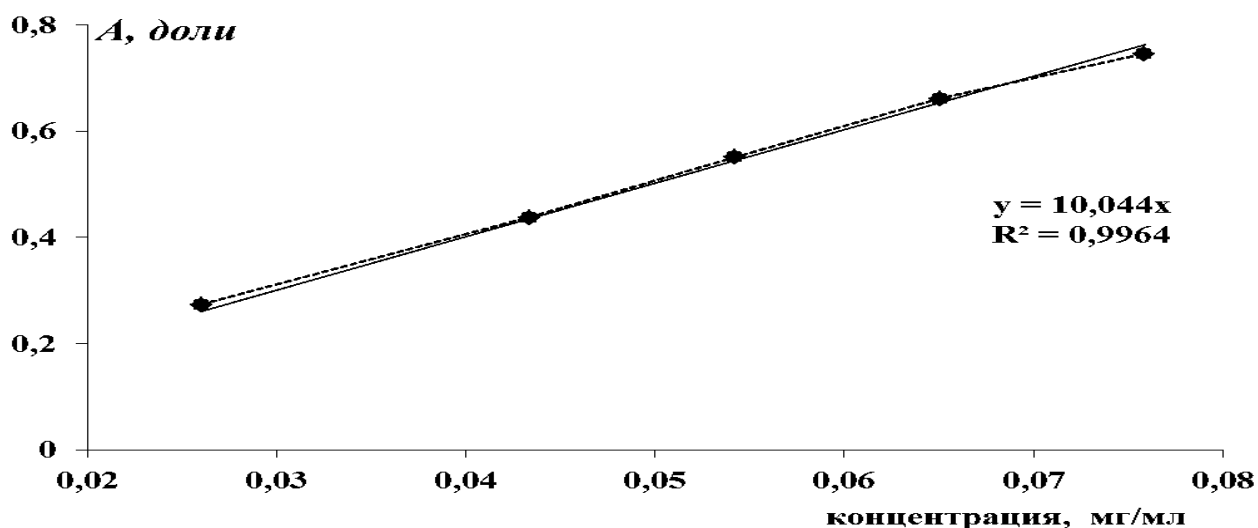
$A$  – интенсивность поглощения светового излучения исследуемым образцом комплекса;

$k$  – угловой коэффициент градуировочной прямой;

$V_0$  – аликвота пробы, используемая для приготовления испытуемого раствора, мл;

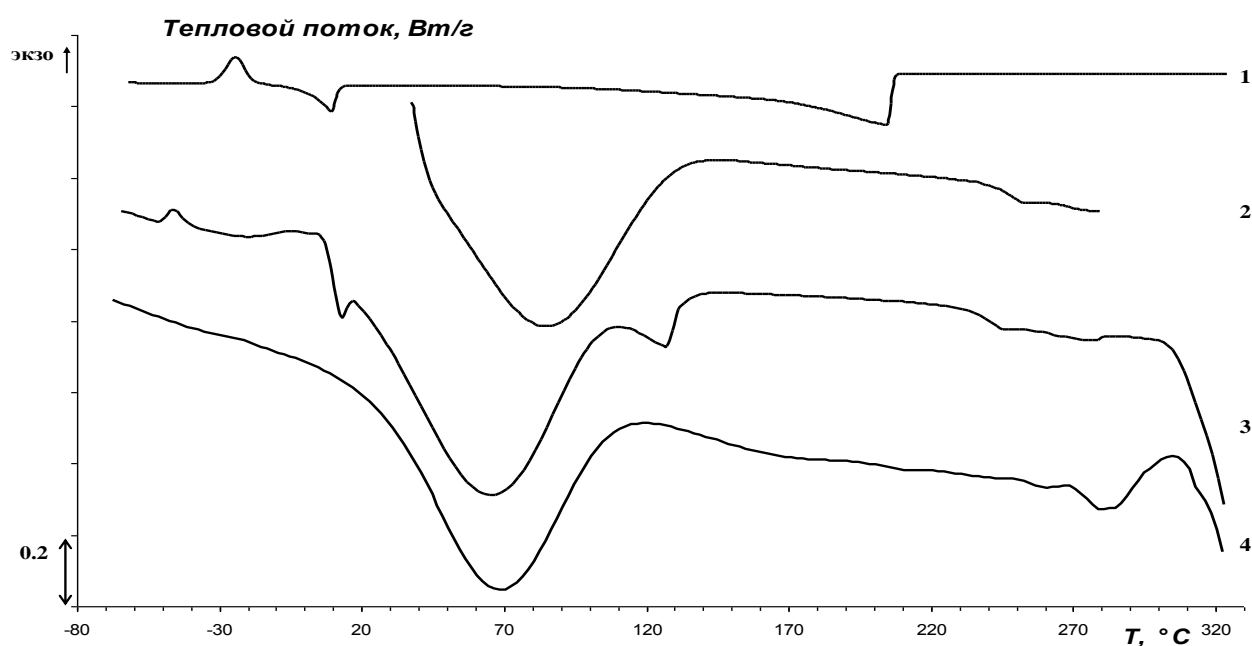
$V_1$  – объем мерной колбы, используемой для приготовления испытуемого раствора, мл.

$m_{нав}$  – масса навески комплекса, мг



**Рис. 2. Зависимость интенсивности поглощения светового излучения ПРФ от его концентрации**

### Результаты и их обсуждение



**Рис.3. Термограммы ДСК исходного вещества ПРФ (1), исходного вещества ГП-β-ЦД (2), физической смеси ПРФ и ГП-β-ЦД (3) и комплекса ПРФ и ГП-β-ЦД (4)**

На термограмме (1) наблюдается: узкий экзотермический пик при температуре  $-24,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , который характеризует кристаллизацию ПРФ, узкий эндотермический пик при температуре  $9,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  характеризует плавление ПРФ, а эндотермический пик в диапазоне температур от  $T_{\text{нач}} 100\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $T_{\text{кон}} 203,9\text{ }^{\circ}\text{C}$  характеризует испарение ПРФ.

На термограмме ГП-β-ЦД (2), наблюдается широкий эндотермический пик с максимумом при  $85,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , который свидетельствует об интенсивном испарении сорбированной воды, неминуемо присутствующей в гигроскопичных

веществах, затем следует ступень стеклования при 247 °С, т.е. температура, при которой ГП-β-ЦД из аморфного твёрдого переходит в аморфное жидкое состояние.

На термограмме комплекса включения (4), полученного в мольном соотношении компонентов ПРФ к ГП-β-ЦД как 1:2 наблюдается отсутствие экзо и эндо эффектов, характерных для ПРФ, что говорит об отсутствии его в свободном виде. На термограмме присутствует широкий эндотермический пик, характеризующий испарение сорбированной ГП-β-ЦД воды и спирта, используемого в процессе получения комплекса в качестве растворителя. Также присутствует ступень стеклования ГП-β-ЦД при температуре 255 °С и сразу за ней эндотермический пик при температуре 275 °С, характеризующий испарение ПРФ и термодеструкцию высвобожденного из внутренней полости ГП-β-ЦД.

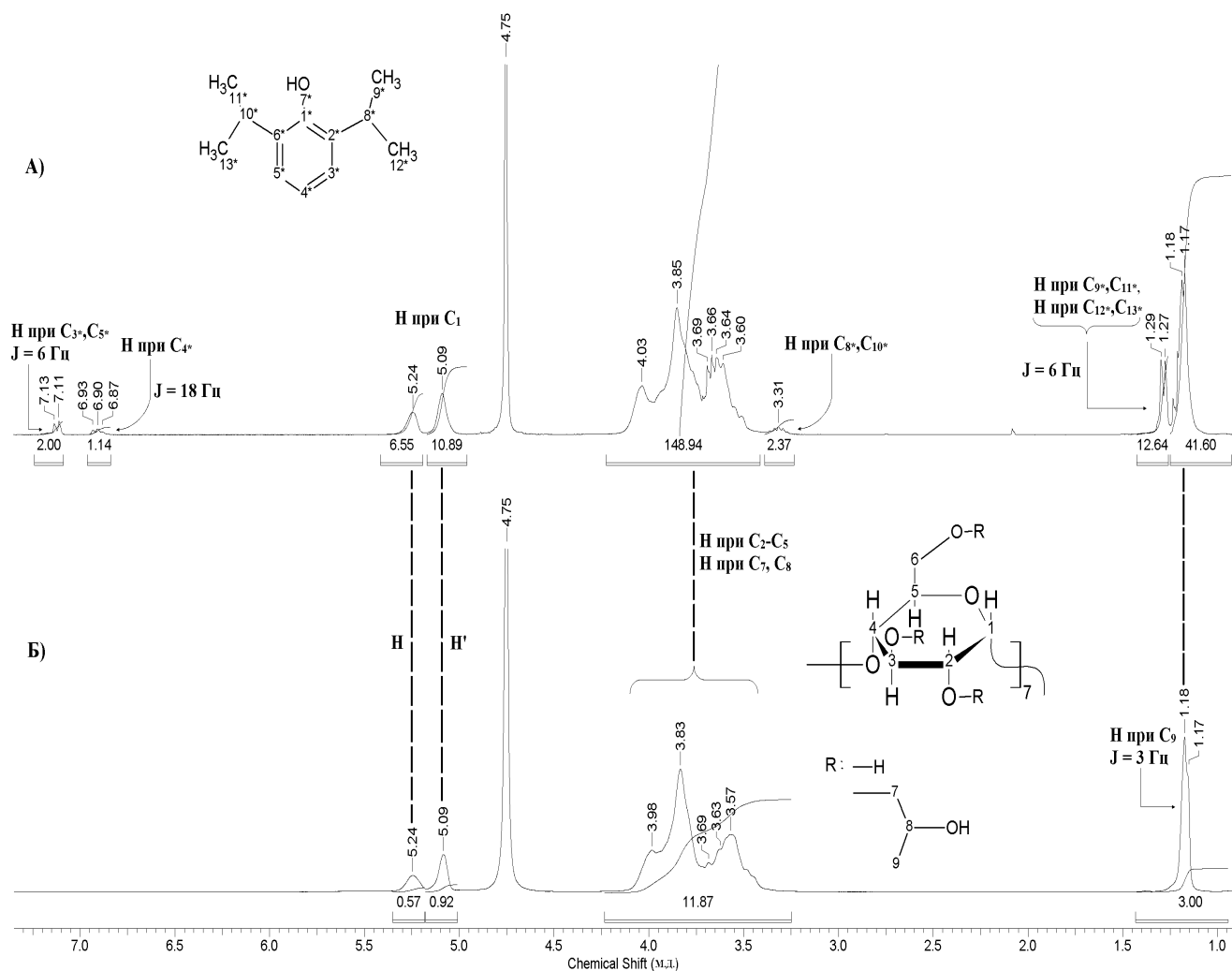
На термограмме физической смеси (3) присутствует широкий эндотермический пик, максимум которого при температуре 64,4 °С и ступень стеклования при температуре 238,8 °С, которые характерны для ГП-β-ЦД, а также узкий экзотермический пик в области температур -40,0 °С, характеризующий кристаллизацию ПРФ, узкий эндотермический пик при 13,6 °С, характеризующий плавление ПРФ и эндотермический пик при температуре 126,9 °С, характеризующий процесс испарение ПРФ.

Следует отметить, что на термограмме физической смеси температура кристаллизации ПРФ смещена в область меньших температур (на 22,5 °С), по сравнению с исходным ПРФ, что, вероятно, связано с взаимодействием ПРФ с внешней поверхностью ГП-β-ЦД, этот факт также объясняет смещение в область уменьшения температуры испарения ПРФ (на 77 °С) и увеличение температуры плавления ПРФ (на 4,3 °С). При этом также наблюдается уменьшение температуры стеклования ГП-β-ЦД (на 8 °С). Также на термограмме физической смеси в области температур выше 240 °С, наблюдается небольшой эндотермический пик, следующий за ступенью стеклования ГП-β-ЦД, по-видимому, характеризующий испарение ПРФ, который взаимодействует с внешней поверхностью ГП-β-ЦД. Само же взаимодействие ПРФ с внешней поверхностью ГП-β-ЦД, может быть объяснено тем, что ГП-β-ЦД способен формировать «ячеистую» (сеткоподобную) структуру за счёт водородных связей между –ОН группами. При достижении физической смесью температуры плавления ПРФ (13 °С) расплав ПРФ проникает в ячейки этой сетки и, таким образом, стабилизируется. Поэтому мы можем сделать вывод, что ПРФ не входит во внутреннюю полость носителя ГП-β-ЦД, как в случае образования комплекса включения, а контактирует с его внешней поверхностью.

Таким образом, проанализировав термограммы 1-4, мы можем сделать вывод о том, что в полученном комплексе включения отсутствует ПРФ в свободном виде, что говорит о его полном включении во внутреннюю полость ГП-β-ЦД.

**Табл. 1. Отнесение сигналов в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР комплекса включения ГП- $\beta$ -ЦД с ПРФ (\*)**

№	Отнесение сигнала или группы сигналов	Химический сдвиг, м.д.	
		ГП- $\beta$ -ЦД	ПРФ
1	Сигналы протонов Н при $\text{C}_1$ (в случае замещенного соседнего атома $\text{C}_2$ )	5.19-5.41	—
2	Сигналы протонов Н' при $\text{C}_1$ (в случае незамещенного соседнего атома $\text{C}_2$ )	4.95-5.17	—
3	Сигналы протонов $\text{C}_2$ - $\text{C}_5$ , $\text{C}_7$ , $\text{C}_8$	3.40-4.22	—
4	Сигналы $\text{C}_9$	0.93-1.23	—
5	Сигналы протонов при $\text{C}_3^*$ , $\text{C}_5^*$	—	7.09-7.24
6	Сигналы протонов при $\text{C}_4^*$	—	6.86-6.96
7	Сигналы $\text{C}_8^*$ , $\text{C}_{10}^*$	—	3.23-3.39
8	Сигналы протонов при $\text{C}_9^*$ , $\text{C}_{11}^*$ - $\text{C}_{13}^*$	—	1.24-1.42



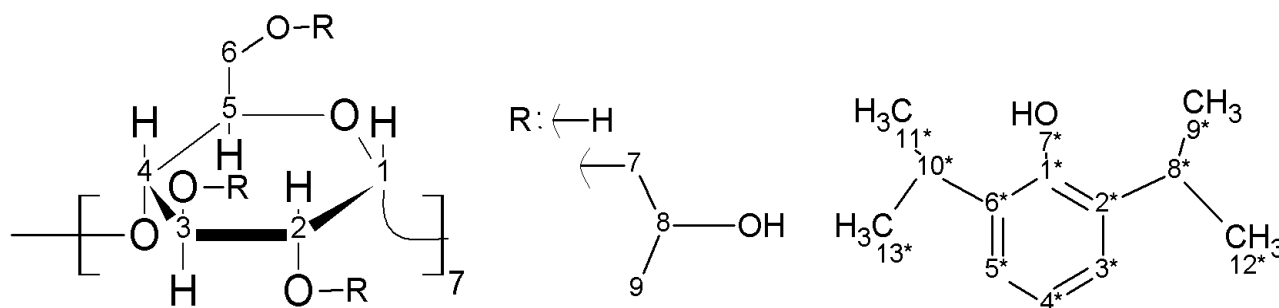
**Рис. 4.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры комплекса включения ГП- $\beta$ -ЦД с ПРФ (А) и ГП- $\beta$ -ЦД (Б)**

Расшифровка и отнесение сигналов в спектре  $^1\text{H}$  ЯМР комплекса включения ГП- $\beta$ -ЦД с ПРФ проведена с использованием спектральной базы данных SDBS [15].

На спектре  $^1\text{H}$  ЯМР комплекса включения ГП- $\beta$ -ЦД с ПРФ наблюдаются сигналы характерные для ГП- $\beta$ -ЦД: дублет ( $J= 3$  Гц) в области химического сдвига 0.93-1.23 м.д., который относится к колебаниям Н при атоме  $\text{C}_9$ ; сигналы в области химического сдвига 3.40-4.22 м.д. могут быть отнесены к совокупности сигналов Н на ядрах  $\text{C}_2$ - $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_7$ ,  $\text{C}_8$ , а также два уширенных сигнала в виде синглетов в области химического сдвига 5.19-5.41 м.д. и 4.95-5.17 м.д., которые относятся, соответственно, к колебаниям Н при атоме  $\text{C}_1$  в случае замещенного соседнего атома  $\text{C}_2$  (Н при  $\text{C}_1$ ) и в случае незамещенного соседнего атома  $\text{C}_2$  (Н' при  $\text{C}_1$ ).

Также, на  $^1\text{H}$  ЯМР спектре комплекса включения ГП- $\beta$ -ЦД с ПРФ наблюдаются сигналы, характерные для ПРФ: дублет ( $J= 6$  Гц) в области химического сдвига 1.24-1.42 м.д, который относится к колебаниям Н при атомах  $\text{C}_9^*$ ,  $\text{C}_{11}^*$ ,  $\text{C}_{12}^*$ ,  $\text{C}_{13}^*$ ; мультиплет в области химического сдвига 3.23-3.39 м.д. с центром 3.31 м.д., который относится к колебаниям Н при атомах  $\text{C}_8^*$ ,  $\text{C}_{10}^*$ ; триплет ( $J= 18$  Гц) в области химического сдвига 6.86-6.96 м.д. с центром 6.90 м.д., который относится к колебаниям Н при атоме  $\text{C}_4^*$  и дублет ( $J= 6$  Гц) в области химического сдвига 7.09-7.24 м.д., который относится к колебаниям Н при атомах  $\text{C}_3^*$ ,  $\text{C}_5^*$ .

Наличие на спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР комплекса включения сигналов, присущих ГП- $\beta$ -ЦД и ПРФ подтверждают образование комплекса включения. и отсутствие каких-либо дополнительных сигналов подтверждает отсутствие химического взаимодействия между исходными компонентами и, как следствие, отсутствие технологических примесей.



**Рис. 5. Условное обозначение атомов углерода в молекулах**

Соотношение компонентов ГП- $\beta$ -ЦД к ПРФ в растворимом продукте определяли по обособленным сигналам протонов при атомах углерода  $\text{C}_1$  в ГП- $\beta$ -ЦД и сигналу протона при атоме  $\text{C}_4^*$  в ПРФ.

$$n = \frac{(I_{\text{H}1} + I_{\text{H}1'}) / 7}{I_{\text{H}4^*} / 1} \quad (2)$$

$I_{\text{H}1}$  - интегральная интенсивность суммы сигналов при  $\text{C}_1$  в случае незамещенного соседнего атома  $\text{C}_2$  в ГП- $\beta$ -ЦД;



$I_{H1'}$  - интегральная интенсивность суммы сигналов при  $C_1$  в случае замещённого соседнего атома  $C_2$  в ГП-β-ЦД;

$I_{H4^*}$  - интегральная интенсивность суммы сигналов протонов при атоме  $C_4^*$  ПРФ;

Согласно расчетам по формуле 2, стехиометрическое соотношение компонентов комплекса ПРФ:ГП-β-ЦД в водорастворимых продуктах, полученных при минимально возможном избытке первого компонента без появления опалесценции, составляет примерно 1:2 с небольшим избытком ГП-β-ЦД.

Количественное содержание ПРФ в комплексе включения согласно расчетам по формуле 1 составило 6,00 %.

В результате проведённых исследований был получен комплекс включения ПРФ с ГП-β-ЦД методом ДСК и ЯМР подтверждено его образование, доказано отсутствие технологических примесей в полученном продукте, а также было установлено точное количественное содержание активного вещества в комплексе включения и молярное соотношение компонентов комплекса. Благодаря полученным данным, возможно продолжение работы по исследованию физико-химических свойств представленного комплекса включения, а также проведение работы по оптимизации процесса его получения, и очистки, а также разработки методов стандартизации качества полученного продукта с тем, чтобы представленную лекарственную форму в дальнейшем можно было бы использовать в клинической практике.

### Список литературы

1. *DSN Group*. Фармацевтический рынок России. Выпуск: февраль 2016. - М.: ЗАО «Группа ДСМ», 2016. - 29 с.

2. [grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D1%84%D0%BE%D0%BB&lf=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&isND=0&order=RegDate&orderType=desc&RegType=&pageNum=2](http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D1%84%D0%BE%D0%BB&lf=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&isND=0&order=RegDate&orderType=desc&RegType=&pageNum=2) / (дата обращения 22.04.2016).

3. *Бабак С.И., Крутой С.В., Злочевский А.Н., Пантес А.В.* Опыт применения препарата ПРФ-Ново в нашей клинике // Медицина неотложных состояний. 2014. №6 (61). С. 110 – 112.

4. *Сорокина Е.Ю.* ПРФ в современной поликомпонентной общей анестезиологии. // Медицина неотложных состояний. 2014. №3 (58). С. 69-75.

5. *Vanlersberghe C, Camu F.* Propofol. // Handbook of Experimental Pharmacology. 2008. Vol 182. P. 227-52.

6. *Watt E.E., Betts B.A., Kotey F.O., Humbert D.J., Griffith T.N., Kelly E.W., Veneskey K.C., Gill N., Rowan K.C., Jenkins A., Hall A.C.* Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABA(A) receptor with the intravenous agent, propofol // Eur. J. Pharmacol. 2008. Vol. 590, № 1–3. P. 120-126.

7. *Trapani G., Altomare C., Liso G., Sanna E., Biggio G.* Propofol in anesthesia. Mechanism of action, structure-activity relationships, and drug delivery // *Curr. Med. Chem.* 2000. Vol. 7, № 2. P. 249-271.

8. *Trapani G., Latrofa A., Franco M., Altomare C., Sanna E., Usala M., Biggio G., Liso G.* Propofol analogues. Synthesis, relationships between structure and affinity at GABA<sub>A</sub> receptor in rat brain, and differential electrophysiological profile at recombinant human GABA<sub>A</sub> receptors. // *Journal of Medicinal Chemistry.* 1998. Vol 41. P. 1846–54.

9. *Haeseler, G; Karst, M; Foadi, N; Gudehus, S; Roeder, A; Hecker, H; Dengler, R; Leuwer, M.* High-affinity blockade of voltage-operated skeletal muscle and neuronal sodium channels by halogenated propofol analogues. // *British Journal of Pharmacology.* 2008. Vol 155. P. 265–75.

10. *Jose A. Matta, Paul M. Cornett, Rosa L. Miyares, Ken Abe, Niaz Sahibzada and Gerard P. Ahern.* General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. // *PNAS.* 2008. Vol. 105 №25. P. 8784-8789.

11. *Пай Срикрант Анапа, Кулькарни Мангеш Маникрао, Дафтари Гаутам Винод.* Водные анестезирующие композиции, содержащие ПРФю Патент ЕАС №14637, 2010.

12. *Викмон М., Сейтли Й., Гаал Й., Хермец И., Хорват А., Мармароши К., Хорват Г., Мункачи И.* Комплекс включения п-этоксикарбонил-3-морфолинсидномина или его соли с циклодекстрином или производным циклодекстрина. РФ № 2111216, 1998.

13. *С.А. Кедик, В.С. Тюкова, Е.С. Жаворонок, А.В. Панов, В.В. Бондарь.* Новый способ получения комплекса включения на основе дисульфирама с гидроксипропил-бэта-циклодекстрином // *Биофармацевтический журнал.* 2015. Т. 7, №4. С. 19 – 23.

14. *Ю.А. Дядин, И.С. Терехова, Т.В. Родионова, Д.В. Солдатов.* Полвека клатратной химии // *Журнал структурной химии.* 1999. Том 40, №5. С. 797-808.

15. Spectral database for organic compounds (SDBS) [Электронный ресурс] [http://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) / (дата обращения 22.04.2016)