

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Семенова Ксенія Миколаївна

УДК: 615.322:615.014.2

ДИСЕРТАЦІЯ

**Розробка складу та стандартизація технології комбінованого
ін'єкційного препарату з гіалуроновою кислотою**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О. М. Семенова
(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Алмакаєв Максим Сергійович, кандидат фармацевтичних наук, старший науковий співробітник

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Семенова К. М. Розробка складу та стандартизація технології комбінованого ін'єкційного препарату з гіалуроновою кислотою. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2023.

Дисертаційна робота присвячена дослідженням з розробки складу та технології нового комбінованого препарату на основі гіалуронової кислоти (ГК) в комбінації з антиоксидантом – дигідрокверцетином (ДГК) та L-аргініном для застосування в медичній та косметологічній практиці, зокрема, при процедурах мезотерапії.

У вступі наведено актуальність теми, мету, завдання дослідження, відзначено наукову новизну та практичну значимість отриманих результатів.

Проаналізовано та узагальнено дані джерел літератури щодо сучасного стану застосування комбінованих ін'єкційних препаратів з ГК для застосування в медицині та косметології при процедурі мезотерапії.

В першому розділі розглянуто літературні джерела щодо застосування монопрепаратів в косметологічній практиці та їх недоліки порівняно із комбінованими лікарськими засобами. На сьогоднішній день на світовому фармацевтичному ринку відзначається тенденція до створення і комерціалізації саме комбінованих лікарських засобів, що поєднують дві або більше діючих речовин в одній лікарській формі. Перспективною є розробка комбінованого лікарського засобу у вигляді ін'єкцій з метою збільшення біодоступності. Представлена детальна характеристика ГК, ДГК та L-аргініну.

Застосування комбінованих препаратів більш ефективно в порівнянні з монокомпонентними, оскільки, вони володіють більшою ефективністю, прискореним настанням фармакологічного ефекту, більшою безпекою і кращою переносимістю при порівнянній ефективності за рахунок

застосування більш низьких доз одного або декількох компонентів комбінації, а також зручністю застосування. Крім того, застосування комбінованого препарату в ряді випадків дозволяє зменшити частоту виникнення небажаних реакцій на один з компонентів комбінації або ж здійснювати терапію супутніх захворювань.

У розділі 2 «Об'єкти та методи досліджень» обґрунтовано загальну концепцію досліджень. Представлений науково-методичний підхід щодо розробки комбінованого ін'єкційного лікарського засобу на основі ГК з ДГК, L-аргініном, розроблено та представлено алгоритм досліджень з розробки складу та технології.

Першим етапом експериментальних досліджень є вивчення фізико-хімічних та технологічних властивостей діючих речовин з метою вивчення сумісності.

Наведено характеристику допоміжних речовин, проаналізовано вимоги до створення комбінованих ін'єкційних лікарських засобів. Згідно вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ) здійснено вибір методів дослідження для оцінки якості лікарських засобів, що розробляються.

Розділ 3 «Теоретичне й експериментальне обґрунтування складу комбінованого ін'єкційного лікарського засобу». Основним компонентом комбінованого препарату є ГК або її солі. На основі літературних даних та враховуючи властивості речовин, для комбінованого лікарського засобу були обрані: натрієва сіль ГК, яка є повним аналогом ГК, природний антиоксидант ДГК та L-аргінін.

На сьогодні натрію гіалуронат широко використовується в медичній та косметологічній практиці. Його відмінності полягають як у молекулярній масі (він буває низько-, середньо- і високомолекулярний), так і в поведінці речовини при використанні. Нами були вивчені фізико-хімічні властивості субстанцій натрію гіалуронату. Вивчали розчинність 1% розчинів у воді для ін'єкцій. В результаті проведених досліджень вибраний натрію гіалуронат з молекулярною масою 1,3 - 1,5 МДа.

В третьому розділі також представлені дослідження з розчинності важкорозчинної субстанції ДГК. З метою підвищення розчинності були обрані допоміжні речовини, здатні забезпечити фізико-хімічну і мікробіологічну стабільність отриманого комбінованого розчину. Отримані позитивні результати при використанні амінокислоти із лужним значенням рН – L-аргініну.

Для стабілізації водного розчину ДГК проведені дослідження високомолекулярних сполук. Досліджено фізико-хімічні властивості активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та допоміжних речовин (ДР), вивчені їх фізико-хімічні властивості та можливі фактори нестабільності. В результаті проведених досліджень для комбінованого розчину обрані допоміжні речовини: ПВП К-17, кислота бурштинова, натрію метабісульфіт, натрію едетат. Встановлено, що ПВП К-17 стабілізує іонний асоціат за рахунок гідрофільно-гідрофобної взаємодії, тому і був рекомендований нами як допоміжна речовина, з метою одержання стабільного розчинного комплексу ДГК і L-аргініну.

Теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено склад комбінованого розчину, досліджено технологічні параметри його приготування. Приділено увагу температурному режиму при дослідженні розчинення субстанцій і допоміжних речовин з підбором тривалості й швидкості перемішування, а також послідовності введення інгредієнтів.

Розрахована теоретична осмолярність розчину «Хіаларікс», що складає 188,55 мОсм/л. Також експериментально була визначена осмолярність розчину «Хіаларікс» за зниженням температури замерзання розчину (фармакопейний метод). Встановлено, що осмолярність розчину, яка визначена за допомогою осмометра «The Advanced® Osmometer» Model 303, фірми «AdvancedInstrumentsInc» (США), складає 230,78 мОсмоль/кг.

В розділі 4 «Розробка і стандартизація технології одержання лікарського засобу «Хіаларікс» наведено опис технології виготовлення комбінованого ін'єкційного розчину «Хіаларікс». Визначено критичні стадії

та критичні параметри технологічного процесу. Вивчений вплив фільтруючого матеріалу на показники якості лікарського засобу. При виборі фільтрів враховувалася як характеристика матеріалів фільтрів, так і властивості отриманих розчинів. Обрано оптимальні типи фільтруючих мембран.

Проведені дослідження з вивчення первинного пакування. Встановлено, що скляні ампули та шприци, а також поліетиленові ампули є придатними для первинного пакування розчину «Хіаларікс».

На підставі проведених досліджень обрано оптимальний режим стерилізації комбінованого розчину для ін'єкцій.

З метою поведення валідації визначені критичні параметри і характеристики технологічного процесу виробництва лікарського засобу «Хіаларікс» у вигляді комбінованого розчину для ін'єкцій.

На підставі проведених досліджень було запропоновано технологічну схему отримання препарату «Хіаларікс».

В розділі 5 «Контроль якості лікарського засобу та дослідження специфічної дії та нешкідливості комбінованого ін'єкційного препарату «Хіаларікс». Вперше стандартизовані показники якості препарату «Хіаларікс» в ампулах по 2 мл та скляних шприцах по 2 мл і розроблені методики їх аналізу. За результатами валідаційних досліджень доведена коректність методик ідентифікації та розробленої оригінальної методики кількісного визначення. Методики були апробовані при проведенні контролю якості препарату, виготовленого в умовах промислового виробництва ТОВ «Юрія-Фарм» та Центру персоналізованої фармації «ХЕМОТЕКА», м. Черкаси.

Проведено вивчення стабільності зразків препарату «Хіаларікс» в ампулах по 2 мл та переднаповнених шприцах по 2 мл, одержаних в умовах дослідно-промислового виробництва, які рекомендовано зберігати при кімнатній температурі в захищеному від світла місці. Термін придатності 2 роки. Розроблено проєкт методик контролю якості (МКЯ).

На базі ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» під керівництвом доктора біологічних наук, професорки Малої Н. Г. проведені випробування щодо визначення гострої токсичності препарату «Хіаларікс» на білих нелінійних статевозрілих щурах обох статей при внутрішньочеревному введенні в різних дозах. Аналіз отриманих даних дозволяє віднести препарат за ступенем нешкідливості до відносно нешкідливих препаратів (IV клас).

Наукова новизна роботи полягає в наступному: вперше розроблено склад та технологію оригінального комбінованого ін'єкційного препарату в ампулах по 2 мл та переднаповненому шприці по 2 мл під умовною назвою «Хіаларікс» на основі натрію гіалуронату, ДГК, L-аргініну. Склад та технологія препарату захищена патентом на корисну модель № 1349923 «Антиоксидантна композиція для ін'єкцій» та патентом України на винахід № 124473 «Антиоксидантна композиція для ін'єкцій».

Визначено фізико-хімічні, мікробіологічні характеристики, проведена стандартизація розчину «Хіаларікс».

Ключові слова: гіалуронова кислота, біофлавоноїд, дигідрокверцетин, стандартизація, антиоксидант, ін'єкційний розчин, технологія, солеутворення, допоміжні речовини, склад, валідація.

Список публікацій здобувача:

1. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Обґрунтування цільового профілю якості та оцінювання ризиків для розробки комбінованого препарату для ін'єкцій. *Вісник Фармації*. 2022. Том 103. № 1. С. 1–7. (Особистий внесок: експериментальні дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
2. Семенова К. М., Алмакаєв М. С. Розробка складу та технології комбінованого ін'єкційного розчину для мезотерапії. *Фармацевтичний часопис*. 2022. №4. С.13–20. (Особистий внесок: експериментальні

- дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
3. Семенова К., Носальська Т. Порівняльне дослідження протизгортанної активності комбінованих розчинів дигідрокверцетину з гіалуроновою кислотою. *Анали Мечніковського інституту*. 2023. №2. С.64–66. (Особистий внесок: експериментальні дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
 4. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Мезотерапія. Розробка складу сучасного препарату для мезотерапії. *C91 Moderní aspekty vědy: XXVIII. Díl mezinárodní kolektivní monografie, Ceska Respublika* 2023. С. 584-606. (Особистий внесок: експериментальні дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
 5. Semenova K., Almakaieva L. Research of anti-collective activity of a vitro digydroquercetic insolution. *Danish Scientific Journal (DSJ)*. 2020. Vol. 2. No 35. P. 66–69. (Особистий внесок: експериментальні дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
 6. Алмакаєва Л. Г., Семенова К. М. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій: патент на винахід 124473 Україна. № а 2019 08004; заявл. 12.07.2019; опубл. 22.09.2021, Бюл. № 38. 5 с. (Особистий внесок: проведення інформаційно-патетного пошуку, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, підготовка матеріалів для подання у патентне бюро).
 7. Алмакаєва Л. Г., Семенова К. М. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій: патент на кор. модель 1349923 Україна. № u201908006; заявл. 12.07.2019; опубл. 27.01.2020, Бюл. № 2. 5 с. (Особистий внесок: проведення інформаційно-патетного пошуку, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, підготовка матеріалів для подання у патентне бюро).
 8. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Етапи розробки антиоксидантного ін'єкційного препарату з гіалуроновою кислотою. *Сучасна фармація*:

- історія, реалії та перспективи розвитку*: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, 19-20 вересня 2019 р., Харків: НФаУ, 2019. Т. 1. С. 149-150.
9. Семенова К. Н., Алмакаев М. С. Изучение алергизирующего действия оригинального комбинированного препарата. *European scientific discussions: materials of the 3rd International scientific and practical conference*, February 1-3, 2021, Rome, Italy: PoteredellaragioneEditore, 2021. P. 156.
10. Алмакаева Л. Г., Семенова К. Н. Разработка препаратов на основе гиалуроновой кислоты для биоревитализации. *Актуальні проблеми розвитку галузевої економіки та логістики*: матеріали VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 25-26 жовтня 2018 р., Харків: НФаУ, 2018. С. 119-121.
11. Семенова К. Н., Алмакаева Л. Г. Антиоксидантная композиция гиалуроновой кислоты для мезотерапии. *Науковий підхід до сфери практичної косметології: актуальні питання й тренди*: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., 11 березня 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 182-183.

ABSTRACT

Semenova K. M. Development of the composition and technology standardization of the combined injection medication with hyaluronic acid. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Thesis for the Doctor of Philosophy degree in specialty 226 "Pharmacy, industrial pharmacy" (22 – Health Care) – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The thesis is dedicated to research on the development of the composition and technology of new combined medication based on hyaluronic acid (HA) in combination with antioxidant – dihydroquercetin (DHQ) and L-arginine for using in medical and cosmetology practice, in particular, in mesotherapy procedures.

In the introduction are noted the relevance of the topic, the goal, the research tasks, the scientific novelty and practical significance of the obtained results.

It were analyzed and summarized data of the literature sources regarding the current state of combined using of injectable medications with HA for use in medicine and cosmetology during the mesotherapy procedure.

In the first chapter, literary sources regarding the use of monopreparations in cosmetology practice and their shortcomings compared to combined medicinal products are considered. Nowadays, the global pharmaceutical market is marked by a trend towards the creation and commercialization of combined medicines that combine two or more active substances in one dosage form. The development of a combined medicinal product in the form of injections with the aim of increasing bioavailability is promising. It is presented detailed description of HA, DHA and L-arginine.

The using of combined medications is more effective compared to monocomponent, because they have higher effectiveness, accelerated onset of pharmacological effect, better safety and tolerability with comparable effectiveness due to the use of lower doses of one or more components of the combination, as well as ease of use. In addition, using of combined medication in number cases allows to reduce the frequency of unwanted reactions to one of the combination components or to carry out therapy of comorbid diseases.

Chapter 2 «Research objects and methods» substantiates the general research concept. It is presented scientific and methodological approach to the development of a combined injectable medication based on HA and DHQ, L-arginine, was developed and presented an algorithm of research on the development of composition and technology.

The first stage of experimental research was the study of physico-chemical and technological properties of active substances with the aim of studying compatibility.

The characteristics of auxiliary substances are given, the requirements for the creation of combined injectable drugs are analyzed. According to the requirements

of the State Pharmacopoeia of Ukraine, a selection of research methods was made to assess the quality of medication under development.

Chapter 3 «Theoretical and experimental substantiation of the composition of the combined injectable medicinal product». The main component of the combined drug is HA or its salts. Based on literature data and considering the properties of substances, the following were selected for the combined medication: sodium salt of HA, which is a complete analogue of HA, natural antioxidant DHQ, L-arginine.

Today, sodium hyaluronate is widely used in medical and cosmetology practice. Its differences lie both in molecular weight (it can be low-, medium- and high-molecular), and in the behavior of the substance when used. The physical and chemical properties of sodium hyaluronate substances were studied. It was studied the solubility of 1% solutions in water for injections. As a result of the conducted research, it is recommended to use sodium hyaluronate with a molecular weight of 1.3-1.5 MDa.

The third chapter presents studies on the solubility of the sparingly soluble substance DHQ. In order to increase the solubility, auxiliary substances capable of ensuring the physico-chemical and microbiological stability of the obtained combined solution were selected. Positive results were obtained when using an amino acid with an alkaline pH value - L-arginine.

To stabilize the aqueous solution of DHQ, high molecular weight compounds were studied. The physico-chemical properties of active pharmaceutical ingredients (APIs) and excipients were studied, their physico-chemical properties and possible factors of instability. As a result of the research, auxiliary substances were selected for the combined solution: PVP K-17, succinic acid, sodium metabisulfite, sodium edetate. It was established that PVP K-17 stabilizes the ionic associate due to the hydrophilic-hydrophobic interaction, which is why it was recommended by us as an auxiliary substance to obtain a stable soluble complex of DHA and L-arginine.

The composition of the combined solution was substantiated experimentally. The technological parameters of solution preparation were studied. Attention was paid to the temperature regime of dissolution of substances and auxiliary substances

with the selection of the duration and speed of mixing, as well as the sequence of introduction of ingredients.

The calculated theoretical osmolality of the "Hialarix" solution is 188.55 mOsm/l. The osmolality of the "Hialarix" solution was also determined experimentally by lowering the freezing point of the solution (pharmacopoeia method) [SPU1]. It was established that the osmolality of the solution, determined using the osmometer «The Advanced® Osmometer» Model 303, from «Advanced Instruments Inc.» (USA), is 230.78 mOsmol/kg.

Chapter 4 «Development and technology standardization of the obtaining the medicinal product «Hialarix» provides a description of the manufacturing technology of the combined injection solution «Hialarix». The critical stages and critical parameters of the technological process were determined. The effect of the filter material on the quality indicators of pharmaceuticals has been studied. When choosing filters, both the characteristics of the filter materials and the properties of the resulting solutions were considered. It was selected the optimal types of filter membranes.

Conducted studies of primary packaging. It has been established that glass ampoules and syringes and polyethylene ampoules are suitable as the primary packaging of the «Hialarix» solution.

Based on the conducted studies, was chosen the optimal mode of sterilization of the combined injection solution.

To conduct validation, were determined the critical parameters and characteristics of the technological process of the production of pharmaceuticals in the form of combined solution for injections «Hialarix».

On the basis of the conducted research, a technological scheme for obtaining the drug «Hialarix» was proposed.

In chapter 5 «Drug quality control and study of the specific action and safety of the combined injectable drug «Hialarix».

For the first time, were standardized the quality indicators of the drug «Hialarix» in ampoules of 2 ml and glass syringes of 2 ml and were established and

methods of their analysis. According to the results of validation studies, the correctness of the identification methods and the developed original quantitative determination method were proven. The methods were tested during the quality control of the medication, manufactured in the conditions of industrial production of "Yuriya-Pharm" LLC and the Center of Personalized Pharmacy "CHEMOTeka", Cherkasy.

The study of the stability of «Hialarix» samples in ampoules of 2 ml and pre-filled syringes of 2 ml obtained under the conditions of experimental and industrial production was conducted. It is recommended to store at room temperature in a place protected from light. The shelf life is 2 years. A project of quality control methods has been developed.

On the basis of the State University «Institute of Problems of Endocrine Pathology named after V. Ya. Danyilevskiy National Academy of Sciences of Ukraine» under the supervision of Doctor of Biological Sciences, Professor N. G. Malova carried out work on determining the acute toxicity of the drug «Hialarix». The test was carried out on white non-linear sexually mature rats of both sexes with intraperitoneal administration in different doses. The analysis of the obtained data allows classifying the drug according to the degree of danger to relatively harmless drugs (class IV).

The novelty of the work is as follows. For the first time, it was developed the composition and technology of the original combined injection medication in ampoules of 2 ml and pre-filled syringe under the conventional name «Hialarix» based on sodium hyaluronate, DHQ, L-arginine. The composition and technology of the drug are protected by Ukrainian patent for the invention No. 124473.

The physico-chemical, microbiological characteristics were determined, and the «Hialarix» solution was standardized.

Key words: hyaluronic acid, bioflavonoid, dihydroquercetin, standardization, antioxidant, injection solution, technology, salt formation, excipients, composition, validation.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1 ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ІН'ЄКЦІЙНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ, ДИГІДРОКВЕРЦЕТИНУ ТА L-АРГІНІНУ ЯК ЕФЕКТИВНОГО БІОРЕПРАНТУ В КОСМЕТОЛОГІЧНІЙ ПРАКТИЦІ (Огляд літератури).....	24
1.1 Запалення та оксидативний стрес як універсальні патогенетичні ланки ранового процесу.....	26
2.1 Застосування комбінованих біорепаративів у косметологічній практиці: сучасні реалії та перспективи..	32
2.1.1 Гіалуронова кислота: біологічний контроль над запаленням, процесами репарації та регенерації шкіри.....	33
2.1.2 Клініко-фармакологічна ефективність антиоксиданту дигідрокверцетину.....	39
2.1.3. L-аргінін та його роль в утворенні оксиду азоту і регуляції капілярів.....	44
2.1.4. Біологічна роль високомолекулярної та низькомолекулярної гіалуронової кислоти	48
Висновки до розділу 1.....	49
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	50
2.1 Вибір загальної методології досліджень.....	50
2.2 Об'єкти дослідження.....	54
2.2.1 Фізико-хімічні властивості діючих речовин комбінованого препарату.....	54
2.2.2 Фізико-хімічні властивості допоміжних речовин комбінованого препарату.....	55
2.3 Методи дослідження.....	58
2.4 Методики кількісного визначення діючих речовин в комбінованому лікарському засобі.....	59

2.5	Розрахунок кількості вихідних речовин.....	64
2.6	Методика визначення впливу фільтруючих матеріалів на комбіновані ін'єкційні розчини.....	64
2.7	Дослідження специфічної дії комбінованого розчину.....	65
Висновки до розділу 2.....		67
РОЗДІЛ 3 ТЕОРЕТИЧНЕ Й ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ КОМБІНОВАНОГО ІН'ЄКЦІЙНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....		69
3.1	Дослідження фізико-хімічних і технологічних властивостей діючих речовин.....	69
3.2	Обґрунтування введення до лікарської форми дигідрокверцетину.....	71
3.3	Вибір антиоксиданту для стабілізації розчину.....	75
3.4	Обґрунтування доцільності введення кислоти бурштинової.....	76
3.5	Розрахунок осмолярності розчину «Хіаларікс».....	81
3.6	Розробка способу одержання комбінованого лікарського засобу.....	83
3.7	Вивчення впливу порядку введення компонентів у розчин, часового і температурного режимів на стабільність лікарського засобу.....	84
Висновки до розділу 3.....		88
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ «ХІАЛАРІКС».....		90
4.1	Вивчення технологічних параметрів приготування розчину.....	90
4.2	Вибір оптимального фільтруючого матеріалу для комбінованого розчину «Хіаларікс».....	90
4.3	Дослідження впливу первинного пакування на показники якості розчину «Хіаларікс».....	94

4.4	Дослідження і вибір режиму стерилізації розчину «Хіаларікс».....	97
4.5	Технологічний процес одержання комбінованого лікарського засобу «Хіаларікс» розчин для ін'єкцій.....	99
4.6	Валідація процесу та/або його оцінка.....	103
	Висновки до розділу 4	105
	РОЗДІЛ 5 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ ДІЇ ТА НЕШКІДЛИВОСТІ КОМБІНОВАНОГО ІН'ЄКЦІЙНОГО ПРЕПАРАТУ «ХІАЛАРІКС».....	107
5.1	Обґрунтування критеріїв і методів контролю якості комбінованого препарату.....	107
5.2	Кількісне визначення діючих речовин.....	111
5.2.1	Визначення кількісного вмісту дигідрокверцетину.....	111
5.2.2	Визначення кількісного вмісту натрію гіалуронату.....	115
5.2.3	Визначення кількісного вмісту аргініну.....	120
5.3	Визначення стабільності та терміну придатності комбінованого розчину «Хіаларікс» для ін'єкцій.....	126
5.4	Дослідження специфічної дії комбінованого розчину.....	129
5.5	Вивчення параметрів гострої токсичності та алергізуючої дії оригінального комбінованого ін'єкційного препарату «Хіаларікс».....	131
	Висновки до розділу 5	135
	ВИСНОВКИ.....	137
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	139
	ДОДАТКИ.....	152

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТФ	—	аденозин трифосфат;
АФІ	—	активний фармацевтичний інгредієнт;
АФК	—	активні форми кисню;
БАД	—	біологічно активна добавка;
БАР	—	біологічно активні речовини
ВЕРХ	—	високоєфективна рідинна хроматографія;
ГК	—	гіалуронова кислота;
ДГК	—	дигідрокверцетин;
ДР	—	допоміжні речовини;
ДФУ	—	Державна фармакопея України
ЄФ	—	Європейська фармакопея;
ІЗ	—	ін'єкційний лікарський засіб;
ЛЗ	—	лікарський засіб;
ЛП	—	лікарський препарат;
МБЧ	—	мікробіологічна чистота;
МКЯ	—	методи контролю якості;
НД	—	нормативна документація;
НФаУ	—	Національний фармацевтичний університет;
ОС	—	оксидативний стрес;
ПВП	—	полівінілпіролідон К-17;
ПОЛ	—	перекисне окиснення ліпідів;
РСЗ	—	розчин стандартного зразка;
СОП	—	стандартна операційна процедура;
ТШХ	—	тонкошарова хроматографія;
ФК	—	фармацевтична компанія;
NO	—	оксид азоту;
NOS	—	синтаза оксиду азоту;
RSD	—	відносне стандартне відхилення

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. В останні роки велику увагу приділяють методам омолодження, які позбавлять від необхідності проведення пластичних операцій та їх важких наслідків через роки. Це процедура мезотерапії – комплекс методів впливу на шкіру та шари сполучної тканини для омолодження та розгладження зморшок і інших проблем шкіри, який застосовується для обличчя, а також для тіла. Ін'єкції «краси» вирішують безліч завдань терапевтичної медицини і косметології, що підтверджується численними позитивними відгуками. Залежно від суті проблеми, лікар обирає оптимальну процедуру, сам ін'єкційний препарат та техніку виконання.

Мезотерапія відома, як ін'єкційна терапія – внутрішньошкірне введення препаратів, що містять ГК, вітаміни, мікроелементи, амінокислоти, флавоноїди, пептиди тощо, за допомогою ультратонких голок або безін'єкційним введенням.

При апаратній мезотерапії препарат наноситься на шкіру, а потім це місце обробляється насадкою апарату. Проникність клітинної мембрани під час процедури підвищується майже в 400 разів.

За півстоліття багаторазово вдосконалювалася сама «техніка ін'єкції», були розроблені сотні та тисячі нових дієвих засобів, але сутність методики залишилася незмінною. Девіз мезотерапії – «Не часто, мало і в потрібне місце».

Склад препарату для проведення процедури мезотерапії підбирається індивідуально в кожному конкретному випадку при вирішенні наявної задачі. Найчастіше до складу препарату входить ГК, що сприяє утриманню вологи, рослинні екстракти, вітаміни, амінокислоти, мінерали та ін.

В останні роки відзначається неухильний ріст інтересу розробників і виробників лікарських препаратів (ЛП) до створення і комерціалізації комбінованих лікарських засобів (КЛЗ), що поєднують два або більше діючих компонента в одній лікарській формі. Це пояснюється очікуваними перевагами комбінованих препаратів порівняно з монокомпонентними:

більшою ефективністю, швидким настанням фармакологічного ефекту, вищою безпечністю і кращою переносимістю при порівнянні ефективності за рахунок застосування більш низьких доз одного або декількох компонентів комбінації, а також зручністю застосування. Крім того, застосування КЛЗ в ряді випадків дозволяє зменшити частоту розвитку небажаних побічних реакцій на один з компонентів комбінації або ж здійснювати корекцію супутніх захворювань [1-3]. Тому такі дослідження та розробка оригінальних ін'єкційних препаратів є актуальними.

Основним компонентом комбінованих препаратів є ГК та її солі. На основі літературних даних та враховуючи властивості речовин, для КЛЗ нами були обрані: натрієва сіль ГК, природний антиоксидант – ДГК, амінокислота – L-аргінін.

Стандартизація та впровадження у виробництво нових комбінованих ін'єкційних ЛЗ на основі обраних біологічно активних речовин (БАР) дозволить поповнити асортимент засобів для застосування в медицині та косметології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана у межах запланованої науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету (НФаУ) «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження лікарських засобів на основі природної та синтетичної сировини» (номер держреєстрації 0114U000945) та «Наукове та експериментальне обґрунтування складу і стандартизація технології рідких лікарських засобів для парентерального та орального застосування» (номер держреєстрації 0118U000096).

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – експериментальне обґрунтування складу, розробка і стандартизація технології виготовлення, методик контролю якості (МКЯ), вивчення ефективності та безпечності лікарського засобу у формі комбінованого ін'єкційного лікарського засобу з гіалуроновою кислотою, дигідрокверцетином, L-аргініном для застосування в медичній і косметологічній практиці.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Здійснити аналіз та узагальнити дані інформаційних джерел щодо сучасного стану створення комбінованих ін'єкційних препаратів для лікування проблем шкіри при процедурі мезотерапії.
2. Розробити методологічний підхід до створення комбінованих ін'єкційних засобів на основі гіалуронової кислоти.
3. Вивчити фізико-хімічні та фармако-технологічні властивості діючих та допоміжних речовин.
4. На підставі фізико-хімічних та біофармацевтичних досліджень розробити оптимальний склад комбінованого ін'єкційного препарату.
5. Розробити та стандартизувати технологію одержання комбінованого ін'єкційного препарату, вивчити стабільність в різних видах первинного пакування в процесі зберігання з метою встановлення терміну придатності.
6. Проаналізувати та узагальнити дані біологічних досліджень.
7. Розробити відповідну нормативну документацію та провести апробацію технології за промислових умов.

Об'єкт дослідження: розробка комбінованого препарату на основі натрію гіалуронату, дигідрокверцетину та L-аргініну у вигляді ін'єкційного розчину, дослідження його властивостей, стабільності, розробка методів стандартизації, фармакологічної активності та нешкідливості.

2. *Предмет дослідження:* фармацевтична розробка науково-обґрунтованого складу і технології комбінованого лікарського препарату на основі натрію гіалуронату, дигідрокверцетину та L-аргініну у вигляді ін'єкційного розчину та його стандартизація, вивчення його стабільності в процесі зберігання, розробка нормативної документації, фармакологічні дослідження.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених у роботі завдань згідно з вимогами ДФУ застосовувались такі методи дослідження: ретроспективний, аналітичний, логічний – для проведення аналізу джерел

літератури, нормативно-правової бази та обґрунтування доцільності розробки ЛЗ, фізичні, хімічні та фізико-хімічні, біофармацевтичні, біологічні (фармакологічні та ін.). Потенціометрично визначали рН розчинів. Фармако-технологічні методи застосовували для дослідження впливу фільтруючих матеріалів на показники якості розчинів. Мікробіологічні дослідження при визначенні стерильності ін'єкційних розчинів. Фармакологічні дослідження проводили *in vitro* та *in vivo*. Обробку експериментальних даних здійснювали за допомогою методів математичної статистики згідно ДФУ.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено склад та технологію одержання стабільного комбінованого ін'єкційного препарату на основі натрію гіалуронату, дигідрокверцетину та L-аргініну.

Вивчено стабільність ін'єкційного розчину в ампулах та переднаповнених шприцах по 2 мл під умовною назвою «Хіаларікс». Визначено склад допоміжних речовин, які забезпечують стабільність водних розчинів протягом терміну зберігання – 2 роки.

Розроблено та валідовано сучасні методики ідентифікації, кількісного визначення діючих речовин в ін'єкційному розчині. Розроблено проєкт МКЯ.

Результатами токсикологічних досліджень підтверджена нешкідливість препарату. Проведене дослідження *in vitro* активності комбінованих розчинів щодо впливу на процеси зсідання крові та встановлено, що найбільш виражено на гемостаз впливає комбінований розчин «Хіаларікс».

Наукова новизна складу та технології виробництва комбінованого ін'єкційного препарату «Хіаларікс» захищена патентом України на корисну модель № 1349923 та патентом України на винахід № 124473 «Антиоксидантна композиція для ін'єкцій».

Практичне значення роботи полягає в наступному. В результаті проведених досліджень вперше створено комбінований ін'єкційний препарат на основі натрію гіалуронату з важкорозчинною субстанцією біофлавоноїда

ДГК та солі L-аргініну натрію сукцинату з вдало підібраними допоміжними речовинами, що забезпечують його стабільність.

Вперше в Україні створені та впроваджені у виробництво вітчизняні технології одержання комбінованого ін'єкційного препарату в двох видах первинного пакування: скляних ампулах по 2 мл та переднаповнених шприцах по 2 мл.

Із використанням комплексу сучасних методів розроблено методики ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин в препараті. Розроблено та стандартизовано аналітичну (проекти МКЯ) та технологічну документацію на розчин «Хіаларікс».

Вперше нова технологія виробництва в різному виді пакування (скляні ампули по 2 мл, акт впровадження 21.12.2022 р.) апробована на ТОВ «Юрія-фарм», м. Черкаси та скляні шприци по 2 мл, акт впровадження 16.12.2022 р.) апробована на дільниці Центру персоналізованої фармації «Хемотека», м. Черкаси.

Результати дисертаційної роботи впроваджено в науково-педагогічний процес кафедр ряду вищих навчальних закладів України: аптечної та промислової технології ліків Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (акт впровадження від 20.02.23), технології ліків та біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акт впровадження від 22.02.23), фармацевтичних дисциплін ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (акт впровадження від 21.02.23), технології ліків Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 24.02.23).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійно завершеною науковою працею. Дисертантом особисто проведено патентно-інформаційний пошук та узагальнення літературних даних за темою дисертаційної роботи.

Дисертантом разом з науковим керівником визначено мету та задачі досліджень, теоретично обґрунтовано склад розчинів.

Безпосередньо авторкою здійснено:

- вивчення фізико-хімічних властивостей субстанцій, критичних показників якості, які важливі для ін'єкційних розчинів;
- розробка і стандартизація складу та технології одержання ін'єкційних розчинів;
- підготовка проєкту МКЯ;
- напрацювання зразків розчинів для аналітичних, мікробіологічних та фармакологічних досліджень;
- узагальнення отриманих даних;
- науковий аналіз та систематизація отриманих результатів;
- апробація технологій у двох видах пакування в промислових умовах фармацевтичних підприємств.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантці належить фактичний матеріал та основний творчий доробок. Співавтором наукових праць є науковий керівник, спільно з яким проведені дослідження. Постановка мети і завдань, обговорення результатів проведені разом з науковим керівником. Співавтори наукових праць не захищали дисертацій, які пов'язані з темою цієї дисертаційної роботи.

Апробація матеріалів дисертації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено на: The 3rd International scientific and practical conference «European scientific discussions», (Rome, Italy, 2021 p.), VI науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми розвитку галузевої економіки та логістики» (м. Харків, 2018 p.), конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-й річниці заснування дня фармацевтичного працівника України «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку» (м. Харків, 2019 p.); міжнародній науково-практичній конференції «Науковий підхід до сфери практичної косметології: актуальні питання й тренди (м. Харків, 2020 p.).

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 164 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів,

загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 138 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 34 таблицями, 21 рисунками. Список використаних джерел містить 135 найменувань, з них 21 кирилицею та 124 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ІН'ЄКЦІЙНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ, ДИГІДРОКВЕРЦЕТИНУ ТА L-АРГІНІНУ ЯК ЕФЕКТИВНОГО БІОРЕПАРАНТУ В КОСМЕТОЛОГІЧНІЙ ПРАКТИЦІ (Огляд літератури)

Захворювання шкіри сьогодні належать до найбільш розповсюджених медичних проблем, оскільки кількість таких захворювань постійно зростає, незважаючи на розвиток медичної галузі [4].

Традиційна терапія уражень шкіри базується на застосуванні, в основному, топічних симптоматичних лікарських засобів. На сьогодні отримала «путівку в життя» мезотерапія, як офіційно прийнята технологія, – мікроін'єкційне внутрішньодермальне введення препаратів у вогнище ураження на глибину 1,5-2 мм, де завдяки високій вологоємності дерми вони депонуються (особливо лікарські засоби із високою молекулярною масою) [5].

Одним із важливих аспектів даного виду терапії є зниження ятрогенного ефекту, оскільки лікарський засіб в малих дозах вводять безпосередньо у вогнище ураження, звідки вони обумовлюють терапевтичний ефект, при цьому відсутній негативний вплив на організм. Крім цього, мезотерапія дозволяє проводити патогенетично обґрунтоване лікування, обумовлює загальнорегулюючу дію на організм за рахунок рефлексогенних ділянок та біологічно активних точок [6, 7, 8].

На клітинному рівні мезотерапія сприяє [6, 9]:

- реконструкції та зміцненню дерми (за рахунок посилення метаболічних процесів та відновлення основної речовини);
- стимуляції репаративних процесів;
- відновленню клітинного метаболізму;
- оксигенації шкіри;
- підвищенню енергетичного потенціалу шкіри;
- відновленню гідробалансу шкіри;

- активацію мікроциркуляції (підвищення вазомоторної активності судин, зниження стазу крові);

- створенню оптимального фізіологічного середовища для клітин шкіри.

Застосування мезотерапії є доцільним способом корекції акне, оскільки дозволяє знижувати кількість запальних елементів та досягати стійкої ремісії. На сьогодні мезотерапія активно застосовується в терапії вікових змін шкіри. Також даний вид лікування ефективний в корекції атрофічних рубців постакне, застійних плямах, вторинній постзапальній гіперпігментації тощо [6, 7, 8, 9].

Рани займають одне з основних місць серед хірургічних хвороб, а за частотою виникнення, кількістю пацієнтів, що тимчасового втратити працездатність, матеріальними витратами на лікування і числом віддалених наслідків залишаються актуальною соціальною медичною проблемою, незважаючи на значні досягнення сучасної науки [10, 11].

На сьогодні рана залишається поширеним видом ушкодження, яке трапляється в побуті і на виробництві, а пацієнти з рановою патологією складають 35-45% в загальній структурі хірургічних хворих [12, 13]. Особливої актуальності проблема лікування ран набуває в зв'язку з ростом техногенних і природних катастроф, військових конфліктів і терористичних актів [14, 15, 16, 17, 18, 19].

Лікування цієї патології в найкоротші терміни без гнійних ускладнень можливе лише при достатньому забезпеченні лікувальних закладів сучасними ефективними ранозагоювальними препаратами, які б комплексно впливали на всі ланки патогенезу ранового процесу і, особливою мірою, на процеси загоєння рани [13, 20, 21, 22, 23, 24].

Встановлено, що в результаті пригнічуючого впливу природних лікарських засобів на процеси вільнорадикального окиснення ліпідів і подальшого зниження концентрації токсичних перекисних продуктів досягається прискорення процесів клітинної регенерації. Отже, в процесі активації репаративної регенерації пошкоджених тканин відіграють важливу

роль цілий ряд БАР, що містяться в природних ЛЗ (поліфеноли, кумарини, вітаміни, каротиноїди, макро- і мікроелементи) [25]. Завдяки їх інгібуючому впливу на перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), стабілізацію мембранних структур клітин зупиняється груба деструкція і досягається прискорення мітозу клітин, а, отже, і внутрішньоклітинна регенерація в тканинах [12, 26].

1.1 Запалення та окислативний стрес як універсальні патогенетичні ланки ранового процесу

Рана – це вогнище пошкодження, яке вже містить патологічні інгредієнти, що утворилися в результаті травми. До них відносять первинно некротизовані тканини і ті, що частково втратили життєздатність, екстраклітинні структури зі зруйнованими капілярами і тривалою кровотечею, гематоми, елементи первинного забруднення тощо. Саме ці субстрати ініціюють рановий процес, біологічне значення якого полягає в відмежуванні вогнища травматичної деструкції, видаленні патологічних продуктів, і в ліквідації наслідків пошкодження [2, 27, 28].

Механізм ранового процесу – складний, багатокомпонентний і має фазовий характер, оскільки детермінований цілим комплексом нелінійних зворотних зв'язків (рис. 1.1) [22, 29].

Рановий процес починається з зупинки паренхіматозної кровотечі з пошкоджених тканин на межі первинного некрозу і життєздатних утворень та триває протягом 1-4 діб [30].

Внаслідок наявності тканинного тромбoplastину і фактора Хагемана (факторів зсідання крові), кров зсідается з формуванням «сітки» з ниток фібрину. В ній «застряють» активовані тромбоцити, еритроцити, окремі зруйновані клітини, елементи первинного забруднення, в тому числі і мікроорганізми. Утворений конгломерат фібринових ниток закупорює просвіт капілярів, чим сприяє зупинці капілярної кровотечі [31, 32].

Вищеописаний механізм індукує появу продуктів деградації фібрину і

великої кількості факторів, що виходять з активованих тромбоцитів. Один з них – тромбоксан А2 – викликає вазоконстрикцію і стимулює зсідання крові, сприяючи зупинці кровотечі. Інші фактори активації тромбоцитів (PAF platelets activation factors) викликають вивільнення гістаміну, серотоніну, активують калікреїн-кінінову систему. В результаті збільшується капілярний кровообіг, розкриваються артеріол-венозні анастомози. Однак, ці ж фактори можуть викликати і прямо протилежний ефект – ініціювати тромбози капілярів, що призводить до збільшення маси некротизованих тканин [33, 34].

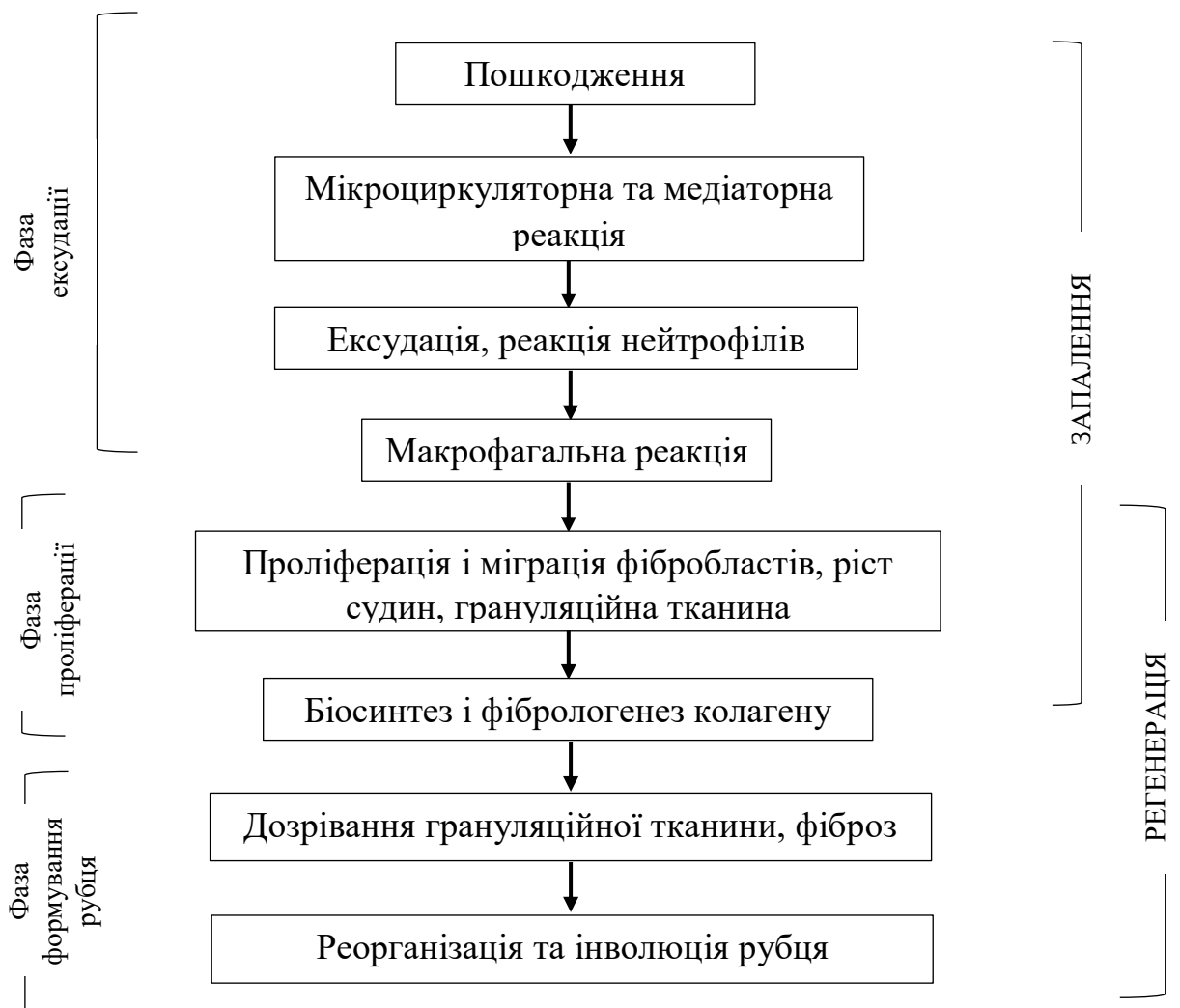


Рис. 1.1 Кінетика запально-репаративної реакції

Плазма починає надходити в рану і викликає гідратацію. Плазма транспортує до пошкоджених тканин відповідні біологічно активні компоненти, в тому числі і фактори природного протиінфекційного захисту. З

іншого боку, сформований набряк викликає підвищення лімфатичного відтоку з рани, забезпечуючи доставку до локальних лімфовузлів разом з рідиною рани компонентів, які, фіксуючись макрофагами і лімфоцитами, індукують каскад міжклітинної взаємодії та імуноцитогенезу [35, 36, 37, 38].

Поступово лімфою транспортуються елементи каскаду гемостазу, внаслідок чого розвивається блокада лімфодренажу, а набряк збільшується і поширюється на все вогнище ушкодження. Разом з хемотаксисом фагоцитів, це один із найважливіших механізмів ізоляції рани від цілісного організму, який необхідний для придушення і подальшого видалення з рани мікроорганізмів та агресивних елементів, що містяться в ній [9, 39, 40].

Для живих клітин така кількість плазми не представляє небезпеки, але в присутності ранових мас, інфікованих скупчень крові і некротизованої м'язової тканини, деякі із фракції комплементу (С3в, С3а, С5а тощо) беруть активну участь в зворотному процесі. За принципом зворотного зв'язку фракція С3 в стимулює утворення в плазмі С3-конвертази, а та знову сприяє продукції в плазмі та транспорту в набрякову рідину С3 в фракції і, крім того, стимулює альтернативний шлях комплементу з вивільненням С3а- і С5а фракцій [9, 11, 23, 39, 40].

С3а- і С5а фракції відіграють в рановому процесі дві важливі ролі. Вони стимулюють хемотаксис лейкоцитів і, будучи анафілотоксинами, викликають вивільнення гістаміну, що сприяє наростаючій локальній вазодилатації і як наслідок – до збільшення набряку. Активація комплементу позасудинного русла призводить до масивного клітинного лізису та вивільненню клітинного вмісту, здатного контактувати з С3 в з підключенням активних фракцій С3а і С5а [9, 39, 41, 42].

Первинна фагоцитарна активність в рані обумовлена поліморфнонуклеарними клітинами із коротким терміном життя. Властива їм фагоцитарна функція реалізується в стані активації, що супроводжується лабілізацією клітинних мембран, екстрацелюлярним вивільненням лізосомальних ферментів і вільних радикалів. В результаті цього

поліморфнонуклеарні клітини швидко руйнуються, що супроводжується виділенням факторів міграції моноцитів і лімфоцитів у рану. Лімфоцити виділяють фактори, які затримують моноцити в рані, їх дозрівання в тканинній (ранові) макрофаги (тривалість від однієї до трьох діб) [9, 39, 43].

Макрофаги здатні фагоцитувати будь-які чужорідні речовини (антигени), від мертвих тканин до бактерій, що складають субстрат первинного мікробного забруднення. Фагоцитоз супроводжується виділенням макрофагами і іншими фагоцитами БАР-інформаторів, що стимулюють запальну реакцію та активують лімфоцити, запускаючи процес імуноцитогенезу. Отже, фагоцитоз лежить в основі формування макрофагально-лімфоцитарного комплексу, здатного продукувати субстанції, які різностороннє впливають на рану і організм в цілому [39, 40]. Крім того, продукти фагоцитуючих клітин, разом з плазмовими факторами, беруть участь в процесах самоочищення рани, а саме, судинній запальній реакції (набряку), формуванні запального ексудату, лізису мертвих тканин, запуску істимуляції імуноцитогенезу. В результаті рана перетворюється на осередок нагноєння (гнійну рану), коли серозний ексудат поповнюється клітинними популяціями (за рахунок мігруючих фагоцитів, лімфоцитів, тромбоцитів, ендотеліоцитів), фрагментами мертвих тканин і елементами первинного забруднення [23].

Ранова інфекція в зв'язку з інвазією патогенними мікроорганізмами перетворюється в запально-деструктивний процес. До цього «нагноєння» є позитивним процесом, який спрямований на самоочищення вогнища ушкодження [44, 45, 46].

Починаючи з 4–5-ої доби, характер загальних реакцій обумовлений переважним впливом парасимпатичної нервової системи, зникають явища запалення й інтоксикації, зменшується біль, знижується підвищена температура, нормалізуються лабораторні показники крові й сечі [43, 47].

Загоєння рани – це комплекс змін, що відбуваються безпосередньо в самій рані й оточуючих її тканинах, процес репарації (від лат. *reparare* – відновлювати, виправляти) ушкоджених тканин з відновленням їхньої

цілісності й функції. Для закриття дефекту, що утворився при uszkodженні, у рані відбуваються три основних процеси (рис.1.2) [48, 49]:

- I фаза – фаза запалення (1-ша–5-та доба);
- II фаза – фаза регенерації (6–14-та доба);
- III фаза – фаза утворення й реорганізації рубця (з 15-ої доби від моменту травми) [35, 50].

ЗАГОЄННЯ ПЕРВИННИМ НАТЯГОМ

ЗАГОЄННЯ ВТОРИННИМ НАТЯГОМ

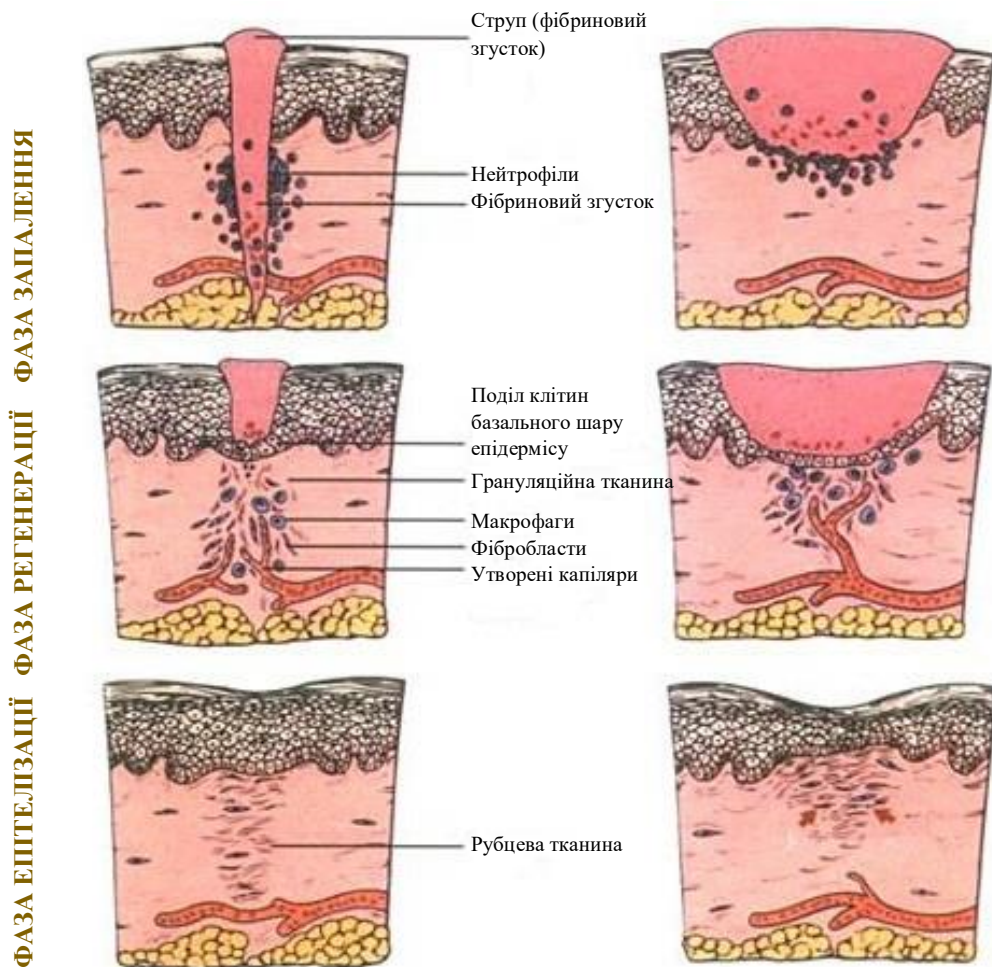


Рис. 1.2 Фази загоєння рани

Фаза запалення триває до 5-ти діб та складається з двох послідовних періодів: судинних змін й очищення рани від некротизованих тканин. У відповідь на травму, крім безпосереднього руйнування кровоносних і лімфатичних судин, що сприяє порушенню відтоку крові й лімфи,

відбувається короткочасний спазм, а потім і стійке розширення мікросудин. Участь у запальній реакції біогенних амінів (брадикінін, гістамін, серотонін), а також системи комплемента призводить до стійкої вазодилатації й підвищення проникності судинної стінки. Це ще більше уповільнює кровотік. Посилюються реологічні властивості крові внаслідок виходу рідкої її частини крізь судинну стінку, адгезії й агрегації тромбоцитів. У результаті відбувається тромбування капілярів і венул. Зниження перфузії призводить до погіршення оксигенації тканин у ділянці рани. Розвивається ацидоз, порушується вуглеводний і білковий обмін. При розпаді клітинних білків із зруйнованих клітин (протеоліз) вивільняються іони калію та гідроксид-іони, що сприяють підвищенню осмотичного тиску в тканинах, відбувається затримка води, розвивається набряк тканин (гідратація), що є основним зовнішнім проявом запалення [51, 52, 53, 54, 55, 56].

Фаза регенерації– триває з 6-ї до 14-ї доби від моменту травми. У рані відбуваються два основних процеси: колагенізація та інтенсивне збільшення кількості кровоносних і лімфатичних судин. Зменшується вміст нейтрофілів і у ділянку рани мігрують фібробласти – клітини сполучної тканини, що мають здатність синтезувати макромолекули позаклітинного матриксу. Крім того, вони синтезують цитокіни, містять рецептори інтерлейкіну-2, фактор росту фібробластів і тромбоцитарний фактор росту. Важлива роль фібробластів при загоєнні рани полягає у синтезі компонентів сполучної тканини й побудові колагенових та еластичних волокон. Основна маса колагену утворюється саме у фазі регенерації. Одночасно в ділянці рани відбуваються реканалізація й ріст кровоносних і лімфатичних судин, що сприяє поліпшенню перфузії тканин і постачання кисню фібробластів. Навколо капілярів концентруються гладкі клітини, які сприяють проліферації капілярів. Для біохімічних процесів у цій фазі характерним є зменшення кислотності, збільшення вмісту іонів кальцію і зменшення концентрації іонів калію, зниження загального обміну речовин. Запальний процес затихає, зменшується або зовсім зникає набряк [55, 57, 58].

Фаза епітелізації й реорганізації рубця– починається приблизно з 15-ої

доби і може тривати до 6 міс. У цій фазі синтетична активність фібробластів та інших клітин знижується й основні процеси зводяться до зміцнення утвореного рубця. Кількість колагену практично не збільшується, однак відбувається його перебудова й утворення поперечних зв'язків між волокнами колагену, за рахунок яких збільшується міцність рубця. Це сприяє не тільки підвищенню міцності рубця, а й зменшенню його розмірів (ретракції). У міру збільшення щільності колагену формування нових кровоносних судин сповільнюється й рубцева тканина поступово блідне. Чіткої межі між регенераційною фазою й рубцюванням немає. Дозрівання сполучної тканини відбувається одночасно з епітелізацією рани. Міцність рубців за відсутності ускладнень до кінця 1-го місяця становить 50% вихідної міцності тканини, до кінця 2-го – 75%, 4-го – 90%. Тканини зі складною будовою (нервова, паренхіматозна, м'язова) менш здатні до регенерації. На місці рани розвивається рубець, який не виконує повністю необхідну функцію. Тканини простої будови (сполучна, покривний епітелій) більше здатні до регенерації [23, 32, 45, 59, 60, 61].

2.1 Застосування комбінованих біорепаративів у косметологічній практиці: сучасні реалії та перспективи

В останні роки відзначається неухильний ріст інтересу розробників і виробників ЛЗ до створення і комерціалізації КЛЗ, що поєднують дві або більше діючих речовин в одній лікарській формі. Це пояснюється очікуваними перевагами комбінованих препаратів порівняно з монокомпонентними: кращою ефективністю, швидким настанням фармакологічного ефекту, вищою безпечністю і кращою переносимістю при порівнянній ефективності за рахунок застосування більш низьких доз одного або декількох компонентів комбінації, а також зручністю застосування. Крім того, застосування КЛЗ в ряді випадків дозволяє зменшити частоту виникнення небажаних реакцій на один з компонентів комбінації або ж здійснювати корекцію супутніх

захворювань [26].

Оскільки патогенез ранового процесу є складним та каскадним, більшість існуючих однокомпонентних косметологічних засобів не проявляють достатньої ефективності, що викликає необхідність розробки КЛЗ, які водночас би охоплювали всі ланки механізму загоєння ран [49, 62].

2.1.1 Гіалуринова кислота: біологічний контроль над запаленням, процесами репарації та регенерації шкіри

В 1918 р. П. Левін та Дж. Лопес-Буарес виділили з пуповинної крові та скловидного тіла полісахарид, що вміщував глікозаміноглікан та ГК з незначними домішками сульфатованих ланцюгів. ГК як високомолекулярний біополісахарид визначив в скловидному тілі в 1934 році Карл Мейер та його асистент Джон Палмер. Назва ГК походить від грецького слова «*hyalos*» (скловидний) та уронова кислота.

ГК – аніонний, однолінійний глікозаміноглікан, який складається з повторюваних залишків D-глюкуронової кислоти і N-ацетил-D-глюкозаміна (рис. 1.3).

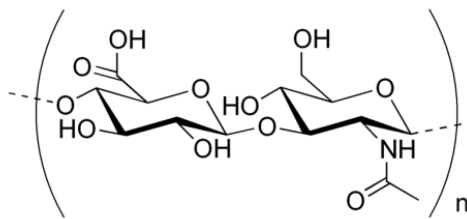


Рис. 1.3 Будова гіалуринової кислоти

Аміноцукор в молекулі ГК зв'язаний з D-глюкуроновою кислотою через -1,3-глікозидний зв'язок, а дисахаридні ланки зв'язані через -1,4-глікозидний зв'язок. Наявність гідроксильних, карбоксильних і ацетамідних груп, що містяться в молекулі ГК, надають їй високу гідрофільну здатність, а також можуть створювати безліч внутрішньо- і міжмолекулярних водневих зв'язків у водному розчині; водневі зв'язки надають певну жорсткість молекулярному

ланцюгу ГК, і в зміненому вигляді вона може мати вигляд подвійної чи одинарної спіралі, витягнутих ланцюгів або петельок. Завдяки наявності полярних і неполярних ланок в макромолекулі, ГК має здатність вступати у взаємодію з різними хімічними сполуками, що дозволяє використовувати її в матеріали різного спектру застосування [63, 64]

ГК – природний полімер, який виконує біологічні функції у бактерій, вищих тварин та організмі людини. Молекулярна маса ГК варіює в широких межах в залежності від джерела отримання. ГК, що виявлена в природних об'єктах, має молекулярну масу від 5000 Да до 20000000 Да. Середня молекулярна маса ГК в синовіальній рідині людини складає з 140000 Да [65].

ГК локалізована в багатьох органах та тканинах. В хрящах вона зв'язана з білком та бере участь в утворенні протеогліканових агрегатів не тільки в синовіальній рідині, а й в скловидному тілі ока та інших тканинах. Встановили, що саме в суглобах ГК відіграє роль речовини, яка зменшує тертя між суглобними поверхнями; може контролювати репаративну регенерацію, клітинну диференціацію, морфогенез, ангиогенез, запалення. Важливою функцією ГК є зв'язування води, тому міжклітинна речовина стає нещільною. ГК має властивість концентрувати навколо себе інші глікозоаміноглікани і утворювати агрегати протеоглікану, які мають більшу гідрофільність і еластичність порівняно з вільними протеогліканами. Завдяки зв'язку з колагеновими, волокнистими, іншими білками і компонентами міжклітинної речовини створюється буферний об'єм, який визначає міцність та пружність механічних тканин. Завдяки в'язкопроникним властивостям ГК може покривати тканини, які були пошкоджені при хірургічних втручаннях. Система ГК – гіалуронідаза – відіграє важливу роль у проникності тканини, оскільки гіалуронідаза призводить до деполімеризації глікозаміногліканів, гідролізу глюкуронової кислоти та білку, підвищуючи проникність сполучної тканини. Тому важливою функцією глюкуронової кислоти є підтримка еластов'язкості сполучної тканини в синовіальній рідині суглоба, рідині ока, контроль за процесами гідратації та переміщення води, утворення

супрамолекулярних сполук протеогліканів в екстрацелюлярному матриксі. Була також визначена рецептор-модулююча роль ГК в порушеннях клітинної взаємодії, мітозі, міграції, розвитку пухлин, метастазів, запаленні. Ендогенна ГК підтримує гемопоез і функцію імунної системи. Деградація ГК гіалуронідазою призводить до значного зниження кількості зрілих мієлоїдних лімфоїдних клітин, а також їх попередників. На культурах клітин уротелію встановлено вплив ГК на імунну систему за рахунок зниження продукції цитокінів, зниження вмісту фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну-1 β , лейкотриєнів, простагландинів, деяких матриксних металопротеаз, що відіграють роль в деградації хрящової тканини [1, 3, 66, 67].

На сьогодні проведено велику кількість досліджень щодо створення біосумісних матриць, на підставі яких можна культивувати та трансплантувати клітини (в тому числі і стовбурові). Найбільш оптимальною основою клітинної біоматриці вважають біополімер ГК. Завдяки унікальним реологічним властивостям, які дозволяють полімеру утворювати в'язкий гель при низьких концентраціях, при біологічній сумісності та неімуногенній природі створюються умови для забезпечення адгезії. Вважають, що біоматрикс на основі ГК може мати унікальні біоінженерні властивості для клітинної адгезії, міграції та мітотичної активності [68, 69, 70].

В процесі безперервного оновлення шкіри важливу роль відіграє метаболізм саме ГК завдяки структурній та регуляторній функціям. Встановлено, що препарати ГК сприяють значному росту клітин, синтезу колагену та амінокислот неструктурованого матриксу головної речовини сполучної тканини шкіри. Велика кількість робіт присвячена дослідженню впливу ГК у формі кремів, гелей, лосьонів, серветок-плівок на різні типи шкіри в косметології. Можливе застосування ГК для внутрішньошкірних ін'єкцій з метою корекції вікових змін шкіри, усунення рубців, стимуляції обмінних процесів. Одним із способів застосування ГК є лазерофорез, що ефективно прискорює мікроциркуляцію обміну крові, підвищує ефективність кисневої ємності клітин шкіри, частково відновлює колаген-еластиновий матрикс

дерми у жінок 48-55 років, зберігаючи цей ефект протягом тривалого часу. ГК відіграє ключову роль в гальмуванні деградації при старінні, що обумовлено здатністю утворювати високов'язкі розчини, брати участь в транспорті і розподілі води в іонному обміні, утворенні позаклітинного матриксу, забезпечувати проникність тканин, підтримувати мігруючі клітини в стані дисперсії, брати участь в заміщенні клітин, підтримці клітинного гомеостазу [64, 71, 72, 73, 74, 75].

Перспективним є розробка косметичних засобів комбінуючи комплекси БАР природних антиоксидантів, таких як ДГК, з ГК, які можна застосовувати для всіх типів шкіри. Проведені дослідження встановили високу переносимість препаратів ГК, модифікованих вітаміном С, амінокислотами (гліцин, пролін, лізин), тому що всі вони підвищують еластичність шкіри, зменшують вираженість мімічних, статичних зморшок, відновлюють колір шкіри обличчя, нівелюють прояви некрозу, нормалізують вологість, жирність, рН. Встановлена ефективність гелей, кремів, сироваток, що були виготовлені не тільки на основі високомолекулярної ГК, а також на основі наногіалуронової кислоти, які поліпшували структуру шкіри через 2 тижні застосування [5, 75, 76].

Відомо, що застосування ГК в офтальмології сприяє не тільки прояву фармакологічної активності, але також реалізації косметологічного ефекту. Так, гіалуронат натрію, як поліелектроліт, затримує воду і тому може застосовуватися як штучна сльоза. Результати експериментального дослідження свідчать, що застосування наноструктурованого біопластичного матеріалу ГК при механічних пошкодженнях рогівки прискорює епітелізацію ерозії на 3-4 добу. При цьому скорочується тривалість ексудативної фази запалення, прискорюється закриття дефекту, формується менше помутніння та спостерігається швидке відновлення після опіку рогівки. В останні роки з метою корекції патологічного лагофталму застосовують гель на основі ГК, що має тривалий ефект (6-12 місяців) [1, 65, 77].

Сучасна медична наука виконує корекцію виду та стану статевих органів,

одним зі способів впливу є ін'єкція гелю ГК між уретрою і вагіною, а також забезпечує жінці чутливість статевих органів, форму і розмір, повертає психологічний комфорт. Доведена доцільність застосування препаратів ГК для індукції пологів та переривання вагітності за рахунок деполімеризації, що призводить до розщеплення колагенових волокон та підвищення гідрофільності тканин шийки матки. ГК застосовують для лікування неінфекційних вагінітів, які вважають проблемою XXI сторіччя. Препарати ГК обумовлюють регенеруючий, зволожуючий ефект, застосовуються інтравагінально у вигляді гелю. При цьому взаємодія ГК з водою сприяє утворенню дисперсійного матриксу, що має значення для підтримки еластичності слизових оболонок, в зв'язку зі створенням оптимальних умов для активації, міграції, проліферації клітин, які беруть участь в регенерації слизових оболонок. ГК при вагініті посилює ангиогенез, місцеву мікроциркуляцію, поліпшує гідродинаміку тканин, сприяє прискоренню клітинної проліферації, регенерації тканин [66, 67].

Терапія за допомогою філерів на основі ГК не порушує функціональний стан мікроциркуляторного русла шийки матки, знижує ризик розвитку ускладнень після корекції істміко-цервікальної недостатності, що є бажаним в плані профілактики можливих ускладнень вагітності. ГК стабілізує ендотеліальний глікокалікс, забезпечує цілісність і регенерацію при пошкодженні, тобто підтримує судинний гомеостаз та забезпечує бар'єрну функцію ендотелію, регулює системну запальну відповідь [67, 78].

ГК також застосовують для лікування чоловічого безпліддя, для збереження функції сперматозоїдів з подальшим їх застосуванням з метою інтрацитоплазматичної ін'єкції в ооцит з метою надалі екстракорпорального запліднення [71].

Відома ефективність захисних плівок для лікування ран, які містять ГК та альгінати, яким притаманна низька адгезивність до ранової поверхні, проникність для газів та непроникність для рідини і бактерій. Хімічно модифіковані похідні ГК застосовують також для виробництва штучної шкіри

і шкірних імплантів для подальшого використання у хірургії. Вибір методу коригувального втручання і закриття дефекту покривних тканин залежить від розміру, глибини рани, гемодинамічних пошкоджень [3].

ГК сприяє формуванню грануляційної тканини навколо елементів сітчастого імпланту м'язово-ангіоневротичного шару передньої черевної стінки за рахунок збільшення об'єму та щільності колагенових волокон, укріплення передньої черевної стінки, а також зменшення запальних процесів в пошкоджених тканинах після операційного втручання. Широкого застосування препарати на основі ГК отримали завдяки дезінфікуючому, ранозагоючому впливу, що призводить до регенерації епітелію. Застосування плівки з модифікованої ГК разом з аміносаліциловою дозволяє знизити частоту утворення спайок в черевній порожнині завдяки відновленню цілісності тканин, обмеженню ранової поверхні, створенню оптимальних умов для прискорення регенерації клітин мезотелію [79, 80].

ГК бере активну участь в проліферації та міграції кератиноцитів, які складають основну масу епідерміса. Завдяки тому, що ГК є гігроскопічною макромолекулою, має високу осмолярність, можливий контроль гідrataції на етапах загоєння рани. При дозріванні грануляційної тканини ГК розпадається. Доведено ранозагоювальний ефект ГК при лікуванні синдрому діабетичної стопи. ГК також призначається в отоларингології, а саме її застосування дозволяє уникнути хірургічних втручань при корекції дефектів носа [60, 75].

Серед ЛЗ сповільненої дії для лікування артрозів певне місце належить препаратам ГК. В суглобі вона відіграє роль лубриканту та речовини, яка зменшує ударний вплив при механічному навантаженні. Адаже при запаленні в синовіальній рідині знижується рівень ГК, що порушує нормальну механіку суглобу, в той час як внутрішньосуглобове введення ГК спрямоване на відновлення ендogenousної концентрації, синтезу та стимуляції хондроїтин сульфату, попередження втрати глікозоаміноглікану та хондроїтинсульфату хрящевим матриксом, зменшення площі пошкодження, стабілізації кількості хондроцитів, поліпшення морфологічних показників суглобу. Взаємодіючи з

клітинними рецепторами CD-44 на поверхні хондроцитів, ГК впливає на проліферацію і функціональну активність. Призначення препаратів ГК в комплексному лікуванні суглобів при остеоартрозі суттєво зменшує біль, має захисний вплив на різні показники деградації хрящової тканини, попереджує проведення ендопротезування [46, 68, 81].

Проблема лікування запальних процесів пародонту є актуальною в світі і потребує нових підходів до лікування. В зв'язку з тим, що в розвитку запалення пародонту відіграє роль дезінтеграція глікозоаміногліканів, внаслідок чого змінюється проникність судин, важливим є застосування простих і високомолекулярних препаратів ГК при пародонтиті. Виявлено лікувальний ефект комбінації ГК з кверцетином в оральному гелі на ясна при запаленні, що викликано ліпополісахаридом, завдяки впливу на неспецифічний імунітет та антиоксидантний захист. Під час дослідження фітогелю з ГК при застосуванні у вигляді аплікації спостерігається пониження активності ферменту еластази, що свідчить про протизапальну дію ЛЗ. ГК успішно застосовується в сучасній стоматологічній імплантології завдяки позитивному впливу на загоєння ран і кісткової тканини [81, 82].

На фармацевтичному ринку світу існує понад 20 препаратів на основі ГК з доведеною фармакологічною ефективністю та безпечністю. Препарати ГК широко призначають в Україні та країнах світу: в офтальмології – гіалгін, гіарал, гіарал плюс, для загоєння рогівки – гіаматрикс, для лікування акне – куріозин, при захворюваннях суглобів, в тому числі нижньої щелепи – синокрот, синокрот форте, сингал, кліпдент-ГЛ, гіалуаль-артро, синоліс-VA, хіопат, остеніл, Пептосак, Русвікс, адекван. Для лікування захворювань слизової оболонки порожнини рота відомі препарати сюрджидерм, гіалуформ, генгігель, гелі, що готують *ex tempore*. З метою введення в порожнину сечового міхура при хронічному циститі призначають інстилан. Для естетичної медицини застосовують препарат гіалуаль, гелі і розчини ГК. В Кокранівській бібліотеці систематичних оглядів наведені наступні препарати гіалуранової кислоти – Adant, Arthrum H, Artz, BuoHy, Durolane, Fermathron,

Hyalgan, Hylan6-F-20, Suvenyl, Orthovisc, Ostenil, Suplasyn, Synject, Go-On [63, 64, 71, 74, 83].

Дослідження лікувальних властивостей ГК та її комбінації з іншими ЛЗ продовжуються, при цьому встановлюються нові біохімічні та фармакологічні ефекти, що роблять ГК перспективним джерелом створення ЛЗ.

2.1.2 Клініко-фармакологічна ефективність антиоксиданту дигідрокверцетину

ДГК є антиоксидантом, який відноситься до класу біофлаваноїдів. За молекулярною будовою і функціями ДГК аналогічний кверцетину та рутину, однак перевершує їх за фармакобіологічною активністю [84, 85].

ДГК вважається еталонним антиоксидантом, оскільки його антиоксидантна активність перевищує активність відомих природних антиоксидантів – вітамінів Е, С, β -каротину, токоферолу – в десятки разів. За літературними даними ДГК нейтралізує підвищений рівень токсичних для організму вільних радикалів, захищаючи від деструкції клітинні мембрани, зменшує шкідливі наслідки ОС [86, 87].

На основі ДГК створено ряд ЛЗ і біологічно активних добавок (БАД), ефективність яких підтверджена доклінічними та клінічними випробуваннями [85, 88].

ДГК проявляє виражену протизапальну і протиалергенну дію, зміцнює і відновлює сполучну тканину, сприяє зниженню рівня холестерину, зміцнює судини і капіляри, покращує мікроциркуляцію крові, перешкоджає утворенню тромбів, знижує запальні явища в простаті, стимулює імунітет, захищає від ушкоджуючих впливів шлунок і печінку, активує процеси регенерації слизової шлунку. Він використовується для профілактики онкологічних станів, серцево-судинних захворювань, хвороб мозку тощо, підвищує опірність тканин організму до ушкоджуючої дії підвищеного рівня глюкози в крові, знижує ймовірність захворювання на цукровий діабет, а також полегшує його

протікання в разі розвитку. ДГК позитивно впливає на нервову систему, активізуючи деякі процеси [85, 89, 90].

ДГК – один із найважливіших антиоксидантів в боротьбі з вільними радикалами. Вільні радикали – нестабільні хімічно активні сполуки з незбалансованим числом електронів, які утворюються в процесі оксигенації клітин. Такі нестабільні молекули прагнуть відновитися, віддавши зайвий електрон або відірвавши бракуючий від іншої молекули. У відповідь інша молекула стає незбалансованою, і виникає ланцюгова реакція [85, 86, 91, 92].

У невеликих кількостях вільні радикали необхідні, оскільки вони беруть участь в хімічних реакціях, які протікають в клітинах. Однак негативний вплив забрудненого навколишнього середовища (зокрема забрудненої питної води), куріння, радіація тощо, призводять до порушень механізмів контролю утворення вільних радикалів в організмі і їх активність різко зростає – вони ушкоджують клітинні мембрани, викликаючи мутації, змінюючи структуру ДНК клітини, провокуючи навіть злоякісний ріст. Вільні радикали здатні зв'язувати кілька молекул, після чого вони втрачають здатність нормально функціонувати. Надмірне утворення в організмі вільних радикалів призводить до ОС в результаті окиснення [87, 91].

ОС – основна причина розвитку понад 60 захворювань, таких як атеросклероз, артеріальна гіпертензія, хвороба Альцгеймера, цукровий діабет, онкологічні захворювання, ішемічна хвороба серця та її ускладнення, інсульт, захворювання шкіри і нервової тканини, а також одна з можливих причин старіння [85, 88].

У деяких випадках ОС є захисним механізмом для організму. Деякі активні форми кисню (АФК) беруть участь в нормальній життєдіяльності організму, залучаючись до фагоцитозу, регуляції клітинного ділення, внутрішньоклітинної сигналізації, синтезу біологічно активних сполук і АТФ [88, 93].

Особливо багато вільних радикалів утворюється під час бактеріальних і вірусних захворювань. Це звичайна реакція «першої лінії» захисту організму

від мікробів, складова частина неспецифічного імунітету, але надмірна кількість утворених радикалів повинна швидко ще до того, як у них з'явиться можливість руйнувати мембрани здорових клітин [84, 88].

Ефект ОС залежить від сили його вираженості. Клітини можуть повернутися до початкового стану при незначних порушеннях. Однак більш виражений ОС викликає клітинну смерть (некроз). Найбільш небезпечним ОС є утворенням АФК (які поєднують вільні радикали та пероксиди) [88, 92, 93].

АФК постійно утворюються в клітині, але їх рівень в нормі настільки незначний, що клітина або інактивує їх за допомогою антиоксидантної системи, або замінює пошкоджені молекули. Однак, якщо рівень АФК перевищує захисні можливості клітини, він викликає незворотні порушення в клітині і, як наслідок, її деструкцію руйнування [88, 89].

Механізм дії антиоксидантів, зокрема ДГК, полягає в обриві ланцюгових реакцій окиснення: молекули антиоксиданту взаємодіють з активними радикалами з утворенням малоактивних радикалів. Але при недостатній ефективності антиоксидантної захисної системи або при інтенсивному впливі на організм радикал-ініціюючих факторів спостерігається гіперпродукція АФК і розвиток ОС. Флавоноїди можуть знижувати утворення АФК, пригнічуючи окисно-відновні ферменти, а також пов'язуючи іони металів зі змінною валентністю, які беруть участь в утворенні кисневих радикалів.

Біологічна активність ДГК (протизапальна, антиалергічна, антивірусна, антиканцерогенна) в значній мірі обумовлена його антиокисними властивостями [85, 88, 89].

Було проведено порівняльне дослідження антиоксидантної ефективності групи близьких за структурою флавоноїдів: катехінів, флавонолів – кверцетину та рутину, ДГК, а також зроблено спробу визначити значення антирадикальних механізмів в реалізації захисної дії досліджених сполук за умов розвитку ОС. Всі досліджені флавоноїди здатні зв'язувати іони металів зі змінною валентністю, утворюючи стабільні комплекси. Ці результати доводять, що флавоноїди здатні зв'язувати АФК, які утворюються в процесі

індукованого ОС в перитонеальних макрофагах, наслідком чого є інгібування реакції за участю АФК [86, 89, 90].

Дані проведеного дослідження свідчать про високу антиоксидантну активність ДГК і про його здатність ефективно захищати фагоцитуючі клітини від факторів завдяки антирадикальної активності по відношенню до аніон-радикалу кисню. Процеси ПОЛ постійно відбуваються в організмі і мають важливе значення для відновлення складу, підтримання функціональних властивостей клітинних мембран і енергетичних процесів. Надмірна активація ланцюгових реакцій вільнорадикального окислення ліпідів призводить до накопичення в тканинах таких продуктів, як ліпоперекиси, радикали жирних кислот, кетони, альдегіди, кетокислоти, що, в свою чергу, пошкоджує і збільшує проникність біомембран, змінює структуру білків, ферментів, результатом чого є активація процесів апоптозу [90].

Основними показаннями до застосування антиоксидантів є надлишково активовані процеси вільнорадикального окиснення, які виникають при різних патологіях. ДГК – активний антиоксидант, унікальний природний акцептор вільних радикалів, гепатопротектор, радіопротектор, імуномодулятор, препарат, що проявляє протизапальні і знеболюючі властивості. За рахунок високих комплексоутворюючих властивостей ДГК виводить з організму важкі метали, в тому числі радіонукліди. ДГК – речовина, яка сприяє розширенню кровоносних судин, уповільнює розвиток атеросклеротичних бляшок за рахунок впливу на ліпопротеїди крові, знижує синтез холестерину [86, 89, 90].

Спектр застосування ДГК досить широкий. Він використовується у фармацевтичній промисловості – для виробництва БАД і ЛЗ (з метою профілактики різних захворювань, ключовою ланкою патогенезу яких є ОС), харчовій промисловості – як антиокисник (сприяє подовженню терміну придатності продукції) [89, 90].

Фармакодинамічні ефекти ДГК. Значення ДГК в фармакології величезне. Регуляторний вплив цієї речовини на ряд реакцій імунної системи організму, протікання запальних процесів характеризує його як протиалергічний і

протизапальний засіб, здатний знижувати шкідливий вплив різних несприятливих факторів зовнішнього середовища – від промислових забруднень і інфекційних агентів до побутових алергенів [85, 88, 89].

ДГК здатний стимулювати ослаблені ланки захисту та нормалізувати надмірно активовані процеси імунної реакції, підвищувати активацію Т-лімфоцитів шляхом стимулювання вироблення інтерферонів. ДГК активує макрофаги, при цьому обмежуючи агресію кисневого вибуху вільних радикалів, що дозволяє активно боротися з чужорідними агентами без деструкції власних тканин [89, 90].

ДГК проявляє захисну дію при різних патологічних станах. Зокрема, при вірусній інфекції він зменшує цитопатогенну дію вірусів, нормалізує функції мітохондрій і стан клітинних мембран, пригнічує розмноження вірусів [89].

З літературних джерел відомо, що ДГК використовується в лікуванні поверхневих ран. Доказом антибактеріальної дії ДГК є дослідження щодо загоєння гнійних ран перев'язувальними засобами, які були насичені ДГК для знезараження гнійних ранових поверхонь. Загоєння ран, зняття запалення і нагноєння відбувалося в кілька разів швидше, ніж зі звичайним перев'язувальним матеріалом [85, 88, 89].

ДГК в ліпосомальній формі запобігає реактивно-запальним явищам в зоні опікових ушкоджень і сприяє інтенсивній регенерації шкірних покривів з відновленням дериватів шкіри після хімічного і термічного опіків II ступеня. Здатність ДГК сприяти процесам утворення фібрил і стабілізації колагену дозволяє його використовувати для загоєння ран, створення біосумісних матеріалів і косметичних засобів [89, 90].

ДГК знайшов широке застосування при серцево-судинних захворюваннях, оскільки клітини серця і судин особливо схильні до дії радикалів. У тривалому процесі розвитку атеросклерозу важлива роль відводиться запаленню судинної стінки і пошкодженню ендотелію, в результаті чого ліпопротеїни крові прикріплюються до пошкоджених стінок, відкладається холестерин, звужуючи просвіт судин, викликаючи ішемію.

Доведено, що ДГК блокує фермент, відповідальний за синтез холестерину, тим самим знижуючи його вироблення в організмі [85, 88, 89].

При комплексній терапії артеріальної гіпертонії з призначенням ДГК відзначено поліпшення показників центральної та периферичної гемодинаміки, оксигенації крові, що підвищувало толерантність до фізичного навантаження і в результаті – до посилення лікувального ефекту.

В складі комплексної терапії пацієнтів, що страждають на цукровий діабет 2 типу, ДГК знижує активацію поліморфно-ядерних нейтрофілів, перешкоджає розвитку ОС і прогресуванню ускладнень у вигляді макро- та мікроангіопатій.

З багатьох фармакологічних ефектів ДГК особливе зацікавлення викликає його протипухлинна, ангіопротекторна і протизапальна дія. На відміну від кверцетину, ДГК не проявляє генотоксичність і не викликає ушкодження ДНК в експериментах *in vivo*. Крім того, у ДГК виявлений антимутагенний ефект. ДГК здатний активувати апоптоз клітин, блокуючи тим самим розвиток в організмі патологічних клітинних популяцій. Вільнорадикальне ПОЛ клітини, в тому числі при контакті органів з канцерогенними речовинами, наприклад бензидином, в присутності ДГК істотно зменшувалася, а, отже, і блокувався один з механізмів канцерогенезу. Також було встановлено, що ДГК безпосередньо бере участь в знешкодженні канцерогенів, активуючи природні ферментні системи детоксикації [85, 88, 89].

2.1.3 L-аргінін та його роль в утворенні оксиду азоту і регуляції капілярів

Аргінін – умовно незамінна амінокислота, вперше виділена в 1886 р Е. Schulze і Е. Steiger, а її структура встановлена Е. Schulze і Е. Winterstein в 1897 році. Середній добовий рівень споживання L-аргініну становить 5,4 г. Фізіологічна потреба тканин і органів в аргініні задовольняється його ендogenous синтезом і/або надходженням з їжею, проте за умов стресу або хвороби ця амінокислота стає есенціальною. Аргінін є необхідним

компонентом для синтезу білків і багатьох БАР (орнітин, пролін, поліаміни, креатин і агматин). Однак ключова роль аргініну в організмі людини – субстрат для синтезу оксиду азоту (NO) [94, 95, 96, 97].

L-аргінін, який надходить в організм з їжею, всмоктується в тонкому кишечнику і транспортується в печінку, де основна його кількість утилізується в орнітиновому циклі. Частина L-аргініну, що не метаболізована печінкою, використовується як субстрат для продукції NO. Основним джерелом ендогенного аргініну є обмін білка в організмі, однак ендогенний синтез аргініну не відіграє важливої ролі в регуляції гомеостазу у здорових дорослих людей [10, 98, 99, 100].

Оксид азоту: фізіологічна роль, характеристика ізоформ NO

Існує кілька ізоформ NO-синтаз, які названі за типом клітин, де вони були вперше виявлені – нейрональна (nNOS, NOS I), ендотеліальна (eNOS, NOS III) і макрофагальна (iNOS, NOS II). eNOS і nNOS постійно наявні у відповідних клітинах (конститутивно експресуються). У серцево-судинній системі eNOS в основному утворюється в ендотеліоцитах, її продукція підтримується БАР – ацетилхоліном і брадикініном, а активність корелює з концентрацією внутрішньоклітинного кальцію. eNOS займає провідну роль в забезпеченні постійного рівня NO, який асоціюють з реалізацією механізмів локальної ендотеліальної цитопротекції і підтриманням судинного гомеостазу, фізіологічною регуляцією артеріального тиску. Крім того, eNOS виявлена і в інших клітинах і тканинах (кардіоміоцитах, еритроцитах, мегакаріоцитах, тромбоцитах [10, 31, 99].

iNOS виявляють в макрофагах, лімфоцитах, ендотеліальних клітинах, клітинах гладких м'язів або фібробластах. Вона активується під впливом бактеріальних ендотоксинів і запальних цитокінів (фактор некрозу пухлини- α і інтерлейкіни) та не залежить від рівня кальцію. iNOS викликає синтез NO у високих концентраціях (до 1000 разів вище порівняно з eNOS). nNOS синтезує NO в фізіологічних кількостях переважно як трансмітера в головному мозку і

периферичній нервовій системі, наприклад в неадренергічних нехолінергічних автономних нервових волокнах [6].

Роль NO в підтримці судинного гомеостазу полягає в регуляції судинного тонуусу, проліферації і апоптозу, а також регуляції оксидантних процесів. Крім того, NO притаманні ангіпротекторні властивості, протизапальна дія (за рахунок інгібування експресії молекул клітинної адгезії ICAM-1 – молекул міжклітинної адгезії 1-го типу, VCAM-1 – молекул адгезії судинного ендотелію 1-го типу і тканинного фактора; пригнічення вивільнення хемокінів; NO блокує агрегацію тромбоцитів і проявляє фібринолітичний ефект [98, 99, 101, 102, 103, 104] (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Роль оксиду азоту в функціонуванні різних систем організму

Функціональні системи організму	Фізіологічні реакції
Серцево-судинна система	Релаксація кровоносних судин мозку, сітківки ока, серця, легень, нирок, кишечника, кавернозної тканини, м'язів серця
Дихальна система	Релаксація гладком'язової тканини трахеї, шлунку, кишечника, сечового міхура, матки
Центральна та периферична нервова система	Нейромодуюча активність, яка визначає довгострокове потенціювання, формування пам'яті, сприйняття болю, зоровий аналіз
Ендокринна система	Регуляція синтезу і секреції гормонів: інсуліну, пролактину, тиреоїдного гормону, паратиреоїдного гормону, гормонів надниркових залоз, гормонів репродуктивного циклу
Система гемостазу	Регуляція взаємодії лейкоцитів зі стінками судин, регуляція активності тромбоцитів
Імунна система	Антипатогенні реакції, неспецифічна цитотоксичність, протипухлинний захист, токсемія, відторгнення трансплантата

На сьогодні, широкого застосування L-аргінін здобув в косметологічній практиці завдяки значній кількості фармакологічних ефектів, що підтверджується працями вітчизняних та зарубіжних авторів [97].

2.1.4 Біологічна роль високомолекулярної та низькомолекулярної гіалуронової кислоти

Синтез ГК (гіалуронана) проводиться трьома різними, але спорідненими гіалуронан-синтазами, які є трансмембранними білками плазматичної мембрани. У людини виділяють три гіалуронан-синтази: HAS1, HAS2 і HAS3, які кодуються різними генами та локалізовані в різних хромосомах. Кожен з синтезованих HAS-білків відіграє специфічну роль в біосинтезі ГК: HAS1-білок здійснює повільний синтез високомолекулярного гіалуронана; HAS2-білок значно активніший за HAS1, також синтезує високомолекулярну ГК з молекулярною масою до 2 млн Да; HAS3-білок, який синтезує коротші ланцюги з молекулярною масою $(2-3) \times 10^5$ Да [63].

Молекула ГК є енергетично стабільною завдяки стереохімії дисахаридів, що входять до її складу. За рахунок міжмолекулярної взаємодії гнучкі молекули ГК утворюють трьохвимірну структуру, яка відіграє роль «сита», а дисперсний матрикс формує каналіці для селективної дифузії водорозчинних молекул. В макромолекулі регулярно повторюються гідрофобні ділянки, що сприяють взаємодії з клітинними мембранами та білками гідрофобного типу [1, 69, 71, 77]. Макромолекули ГК з різною молекулярною масою по-різному впливають на поведінку клітин. Передбачається, що це відіграє найважливішу роль в механізмах фізіологічної регуляції [66, 69, 75].

Низькомолекулярна ГК (молекулярна маса менше 10 000 Да) добре проникає в шкіру, діє на генорегуляторну функцію білків, включаючи ті, що відповідають за диференціацію кератоцитів, формування міжклітинних комплексів, продукція яких з віком знижується; проявляє протизапальну дію, індукуює ангіогенез (розростання кровоносних і лімфатичних судин) [63, 69].

Високомолекулярна ГК (молекулярна маса 50 000 – 100 000 Да) впливає на незначну кількість генів, гірше проникає в шкіру, запобігає сухості шкіри, її вводять шляхом ін'єкцій та електрофорезу. Вона стимулює клітинну проліферацію, активує міграцію клітин. Фракція ГК з молекулярною масою понад 500 000 Да пригнічує ангиогенез, клітинну проліферацію, блокує синтез інтерлейкіну-1 β і простагландину – E2 (медіаторів запалення). Експериментально доведена ефективність захисту фібробластів від цитотоксичної дії вільних радикалів при збільшенні розміру макромолекули ГК [65, 69, 83]. Отримані авторами дані свідчать про унікальну здатність макромолекул ГК з різною довжиною полісахаридного ланцюга надавати прямо протилежні ефекти на молекулярному і клітинному рівні. Отже, значення такого параметра як молекулярна маса ГК при створенні нового ЛЗ має першорядне значення [45, 64, 105].

Висновки до розділу 1

1. Проаналізовано та узагальнено дані вітчизняних та зарубіжних наукових джерел щодо універсальних ланок патогенезу ранового процесу та процесів загоєння.

2. Опрацьовано досвід застосування монопрепаратів в косметологічній практиці та їх недоліки порівняно із КЛЗ. На сьогоднішній день на світовому фармацевтичному ринку відзначається тенденція до створення і комерціалізації саме КЛЗ, що поєднують дві або більше діючих речовин в одній лікарській формі.

3. Перспективною є розробка КЛЗ у вигляді ін'єкцій з метою збільшення біодоступності. Представлена детальна характеристика ГК, ДГК та L-аргініну.

4. Для одержання ін'єкційної композиції ГК, ДГК та L-аргініну необхідно провести комплекс досліджень з фармацевтичної розробки, які базуються на сучасних методах починаючи з вивчення фізико-хімічних показників діючих і допоміжних компонентів до взаємодії первинного пакування з композицією та терміну придатності.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Вибір загальної методології досліджень

Ефективність комбінованих ін'єкційних ЛЗ залежить від впливу цілого комплексу взаємопов'язаних факторів, найважливішим з яких є терапевтична ефективність, що залежить від якості розробки складу препарату та технології його виготовлення.

Першочерговим завданням є вибір ефективних та безпечних субстанцій і допоміжних речовин, вивчення їх фізико-хімічних властивостей.

Процес одержання ін'єкційних розчинів на основі малорозчинних субстанцій шляхом переведення їх у солі або комплексні сполуки у процесі приготування відомий. Але в кожному конкретному випадку необхідно проводити дослідження з вивчення умов протікання реакцій і визначення оптимальних параметрів ведення процесу. Це такі як порядок введення інгредієнтів у реакційне середовище та їхні кількісні співвідношення, температурний і часовий режими, створення і підтримка необхідного рівня рН середовища, що забезпечує заданий напрямок реакції.

Метою роботи є розробка складу та технології нового комбінованого препарату ГК з ДГК, L-аргініном для застосування в медичній та косметологічній практиці.

Для досягнення поставленої мети необхідно провести наступні етапи досліджень.

Етап 1. Проаналізувати та узагальнити сучасні літературні дані щодо комбінованих ін'єкційних препаратів ГК з іншими БАР та їх застосування в медичній та косметологічній практиці.

Етап 2. Дослідження з вибору оптимальних концентрацій діючих речовин та можливості одержання комбінованих ін'єкційних розчинів на їх основі.

Важливим етапом при розробці складу ЛЗ має бути обґрунтування параметрів приготування розчину, що включає: порядок введення діючих і допоміжних інгредієнтів; дотримання встановленого температурного і часового режимів; швидкість перемішування розчину.

Етап 3. Розробка складу комбінованих ін'єкційних ЛЗ. Даний етап розроблений у вигляді алгоритму на рис. 2.1, з якого видно основні етапи досліджень.

Етап 4. Розробка та обґрунтування раціональної технології одержання комбінованих ін'єкційних ЛЗ і стандартизація їх виробництва:

- розробка технологічних параметрів одержання розчинів;
- вивчення критичних точок технологічних процесів;
- дослідження з вибору фільтруючих матеріалів і режиму фільтрації отриманих розчинів;
- контроль ЛЗ за показником «Механічні включення»;
- вибір режиму стерилізації розчинів;
- дослідження із сумісності первинного пакування з ЛЗ;
- розробка технологічної документації.

Етап 5. Аналітичне забезпечення технологічних процесів:

- вивчення стабільності отриманих розчинів;
- методи визначення кількісного вмісту діючих речовин, розробка нормативної документації МКЯ;
- мікробіологічні та біологічні методи дослідження зразків ЛЗ;

Етап 6. Аналіз матеріалів доклінічного вивчення специфічної дії комбінованих ін'єкційних ЛЗ.

Для розробки комбінованого ін'єкційного ЛЗ нами був створений алгоритм розробки складу, представлений на рис. 2.1.

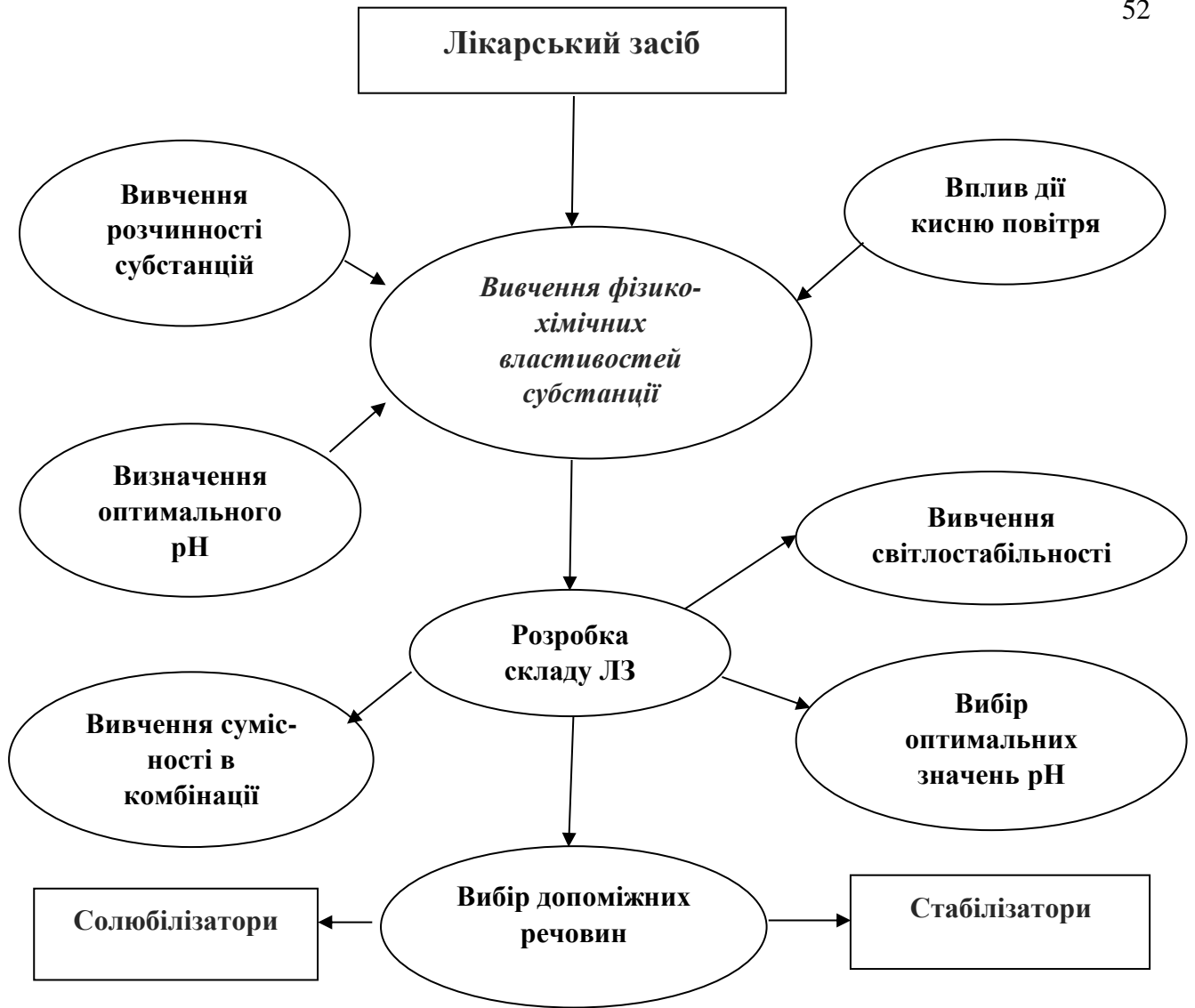


Рис. 2.1 Алгоритм розробки складу комбінованого ін'єкційного лікарського засобу

При розробці технологічного процесу виробництва препарату керувались рекомендаціями згідно Настанови 42-3.4:2004 «Лікарські засоби. Виробництво готових лікарських засобів» та Настанови 42-3.5:2016 «Лікарські засоби. Валідація процесів» [106, 107, 108].

Розробка технології приготування ЛЗ на основі ГК та інших БАР включала наступні дослідження (етап 2), представлені на рис 2.2.

Технологія виробництва повинна бути стандартизована, з чітким визначенням критичних точок виробництва ЛЗ.

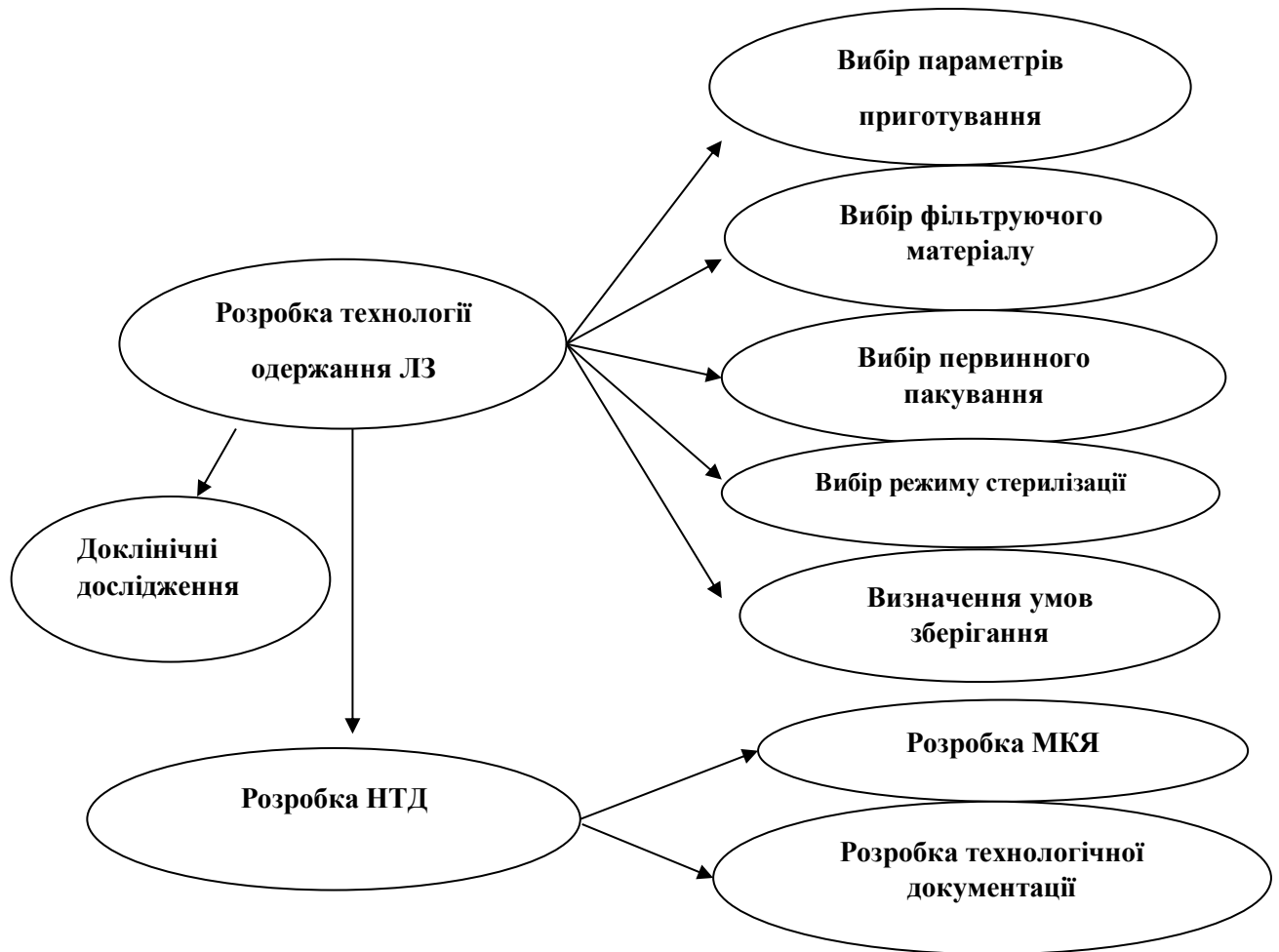


Рис. 2.2 Алгоритм розробки технології комбінованого ін'єкційного лікарського засобу

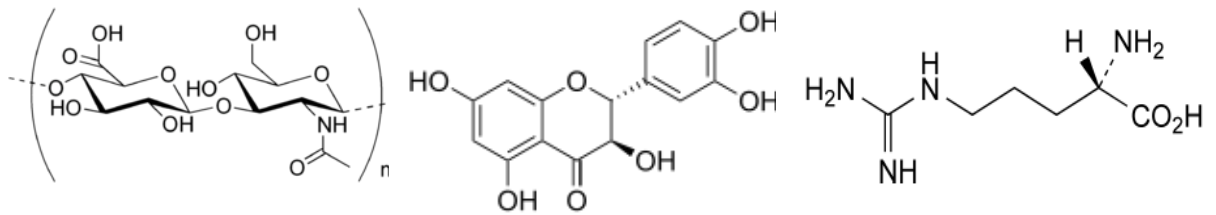
Важливе значення необхідно приділяти вибору параметрів приготування комбінованого розчину. Важливо дослідити та обґрунтувати вибір фільтруючого матеріалу. Первинне пакування, що безпосередньо контактує з лікарською композицією не повинно негативно впливати на якість розчину. При обґрунтуванні вибору первинного пакування слід було визначити не тільки стабільність препаратів при зберіганні за вимогами Настанови 42-3.3:2004 «Лікарські засоби. Випробування стабільності», але й дослідити сумісність з матеріалом первинного пакування [109].

Наступним етапом (етап 5) було аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки.

2.2 Об'єкти дослідження

У цьому розділі представлені об'єкти і методи дослідження, які в своїй сукупності найповніше характеризують проведену роботу.

2.2.1 Фізико-хімічні властивості діючих речовин комбінованого препарату



Гіалуронова кислота

(натрію гіалуронат
(sodiumhyaluronate)
(*PhEur*2.0. р. 1472) [4])

Дигідрокверцетин

$C_6H_{14}N_4O_2$

М.м.174,2

L-аргінін (1-аміно-4-гуанідиновалеріанова кислота) (ДФУ 2.2, 2014, с. 56 або ЄФ, 2013, с. 1585) [109].

Рис. 2.3 Діючі речовини перспективного комбінованого лікарського засобу

ГК (натрію гіалуронат (sodiumhyaluronate) – аморфний білий порошок, добре розчиняється у воді з утворенням прозорого гелю (рис. 2.3). Вміст D-глюкуронової кислоти 46,6%. Вміст основної речовини – 96,5%. рН 0,5% розчину – 6,0-7,5. При розробці ін'єкційного ЛЗ використовували субстанцію натрію гіалуронату фірми «Contipro», Прага, Чехія, серія 1117217-E1 (2017-12-11).

Субстанція ДГК не описана в ДФУ і в інших закордонних фармакопеях (рис. 2.3). В ході експериментальних досліджень використовували субстанцію ДГК фірми «Vitaforest dustrubution» (Естонія). Показники якості субстанції

ДГК наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Показники якості субстанції ДГК

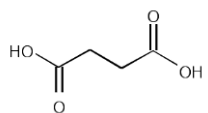
Назва показників	Нормування
INN	Taxifolin
Брутто-формула	$C_{15}H_{12}O_7$
Молекулярна маса	304,25
Кількісний вміст	Від 97% до 102% (у перерахунку на суху речовину)
Опис	Світло-сірий, з жовтуватим відтінком порошок
Розчинність	Малорозчинний у воді, легко розчинний у спирті 96%, розчинний в етилацетаті

L-аргінін – це білий кристалічний порошок, легкорозчинний у воді, малорозчинний у спирті, не розчинний в ефірі (рис. 2.3). Масова частка *L*-аргініну не менше 98,5% і не більше 101,0% (S)-2-аміно-5-гуанідинопентанової кислоти, у перерахунку на суху речовину. В роботі використовували субстанцію *L*-аргінін, серія 161002А, виробник «Shantou Jiaye Biologic Technology Co., Ltd», Китай.

2.2.2 Фізико-хімічні властивості допоміжних речовин комбінованого препарату

Кислота бурштинова. Субстанція кислота бурштинова не описана в ДФУ і в Європейській фармакопеї (ЄФ). Розробку препарату було проведено з використанням субстанції фірми «Anhuil Sunsing Chemical Co.LTD», Китай, серія 20170216. Показники якості кислоти бурштинової згідно МКЯ представлені в таблиці 2.2.

Показники якості кислоти бурштинової (згідно МКЯ)

INN	Succinic acid
Брутто-формула	$C_4H_6O_4$
Структурна формула	
Молекулярна маса	118,09
Кількісний вміст	Не менше 98% не більше 102%
Опис	Від безбарвного до білого кольору кристали або кристалічний порошок
Розчинність	Розчинний у воді, етиловому спирті

Повідон (ДФУ 2.2, 2014, с. 543)

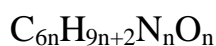
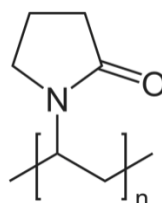


Рис. 2.4 Хімічна формула повідону

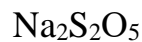
Порошок або пластівці білого або жовто-білого кольору (рис. 2.4). Гігроскопічний. Легко розчинний у воді, в етанолі (96%), малорозчинний в ацетоні. Кількісний вміст: не менше 11,5% і не більше 12,8% азоту (N; А.м. 14,01), у перерахунку на безводну речовину. Різні типи повідону характеризуються їх в'язкістю у розчині, вираженою як величина К. В роботі використовували Повідон К-17, серія YK001S180923ASP, виробництва фірми «Shanghai Yuking Water Soluble Material Tech Co., Ltd», Китай.

Поліетиленоксид 400 (Макроголи ДФУ 1.1, с. 393)



Поліетиленоксид 400 представляє безбарвну в'язку рідину, без запаху, гігроскопічна. Змішується з водою, дуже легко розчинний в ацетоні, 96% етанолі і метиленхлориді, практично не розчинний в оліях і мінеральних маслах.

Натрію метабісульфіт (ДФУ 2.2, 2014, с. 482 або ЄФ, 2013, с. 3254).



М.м. 190,1

Натрію метабісульфіт (натрію дисульфит) – кристалічний порошок білого або майже білого кольору, або безбарвні кристали. Містить не менше 95,0% і не більше 100,5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Легко розчинний у воді, мало розчинний в етанолі.

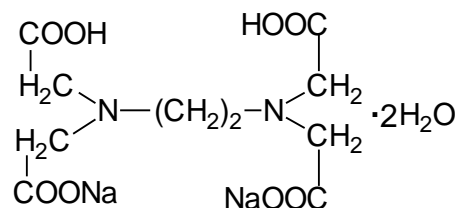
Вода для ін'єкцій (ДФУ 2.2, 2014, с.125).



М.м.18,02

Прозора, безбарвна рідина. Питома електропровідність: не більше $1,1 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (етап 1); не більше $2,1 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ при $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ (етап 2); від 2,1 (рН 6,6) до 4,7 (рН 5,0) (етап 3, табл. 0169-3).

Динатрію едетат (динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) (ДФУ1.1, с. 327)



М.м. 372,2

Рис. 2.5 Структурна формула динатрію едетату

Динатрію едетат – кристалічний порошок білого кольору, розчинний у воді, помірно розчинний у етанолі (рис. 2.5). Містить не менше 98,5% і не більше 101,0% динатрію дигідро-(етилендинітрил)-тетраацетату дигідрату.

Натрію гідроксид (ДФУ 1.1, с.411). Субстанція натрію гідроксиду описана в ДФУ і вінших фармакопєях.

NaOH

М.м. 40

Розробку препарату було проведено з використанням субстанції, яка відповідає вимогам ДФУ та документації фірми-виробника.

Кристалічна маса білого або майже білого кольору у вигляді гранул, паличок, або пластинок; розпливається на повітрі, легко поглинає діоксид вуглецю повітря. Дуже легко розчинний у воді, легко розчинний в 96% етанолі. Містить не менше 97,0% і не більше 100,5% основної речовини.

2.3 Методи дослідження

При виконанні роботи були використані сучасні методи дослідження: фізико-хімічні, біофармацевтичні, мікробіологічні.

- Візуальний метод визначення прозорості і кольоровості розчинів, контролю на механічні включення.
- Потенціометричний метод визначення рН розчинів.
- Мікробіологічний метод для визначення стерильності комбінованих ін'єкційних розчинів.

Метод абсорбційної спектрофотометрії (ДФУ 2.2.25) використовують для ідентифікації та визначення кількісного вмісту діючих речовин та супровідних домішок в комбінованих ін'єкційних ЛЗ.

Показники якості комбінованих розчинів, контроль яких здійснювали за методиками, що описані у фармакопєях, представлені в таблиці 2.3.

**Показники якості комбінованих ін'єкційних розчинів відповідно до
фармакопейних методик**

№ з/п	Показник якості	Метод контролю	Нормативний документ
1.	Прозорість	Візуальний	ДФУ, 2.2.1
2.	Кольоровість	Візуальний	ДФУ, 2.2.2., метод II
3.	pH розчину	Потенціометричний	ДФУ, 2.2.3
4.	Об'єм, що витягається	Об'ємний	ДФУ, 2.9.17
5.	Стерильність	Мікробіологічний	ДФУ, 2.6.1
6.	Бактеріальні ендотоксини	Біологічний	ДФУ, 2.6.14
7.	Механічні включення (видимі і невидимі частки)	Візуальний, мембраноскопічний, фотометричний	ДФУ, 2.9.19, 2.9.20

2.4 Методики кількісного визначення діючих речовин в комбінованому лікарському засобі

Дигідрокверцетин. Визначення проводять методом абсорбційної спектрофотометрії (ДФУ 2.2.25) [110, 111].

Розчин кислоти хлористоводневої. 10 г кислоти хлористоводневої *P* доводять водою *P* до 100,0 мл та перемішують.

Суміш розчинників. Розчин кислоти хлористоводневої змішують з етанолом (96%) *P* у співвідношенні (1:9).

Випробовуваний розчин. 1,0 мл препарату доводять етанолом (96%) *P* до об'єму 100,0 мл і перемішують. 5,0 мл отриманого розчину доводять сумішшю розчинників до 25,0 мл і фільтрують крізь фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Розчин порівняння. Близько 50 мг (точна наважка) стандартного зразку (СЗ) ДГК поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 85 мл етанолу

(96%) *P*, обробляють ультразвуком протягом 10 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. 1,0 мл отриманого розчину доводять сумішшю розчинників до 50,0 мл і фільтрують крізь фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Вимірюють оптичну густина випробовуваного розчину та розчину порівняння на спектрофотометрі за довжини хвилі 375 нм, в кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи в якості компенсаційного розчину суміш розчинників.

Вміст ДГК (X_1), в 1 мл препарату, в міліграмах, розраховують за формулою 2.1:

$$X_1 = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot P}{A_0 \cdot 1 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot P}{A_0 \cdot 1000}, \quad (2.1)$$

де A_1 - оптична густина випробовуваного розчину;

A_0 - оптична густина розчину порівняння;

m_0 - маса наважки СЗ ДГК, в міліграмах;

P - вміст дигідрокверцетину у СЗ ДГК, у відсотках.

ДГК ($C_{15}H_{12}O_7$) в 1 мл препарату має бути:

- на момент випуску: від 4,75 мг до 5,25 мг в 1 мл препарату;
- протягом терміну придатності: від 4,5 мг до 5,5 мг в 1 мл препарату.

Натрію гіалуронат. Визначення проводять методом абсорбційної спектрофотометрії (ДФУ 2.2.25) [111].

Розчин А. У мірну колбу місткістю 50 мл поміщають 0,1 г альціанового синього 8GX (Sigma-Aldrich, кат. № А3157) і 0,4 г натрію хлориду *P*, розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до позначки. Отриманий розчин нагрівають до 70°C, охолоджують до кімнатної температури і центрифугують при 3500 об/хв. Прозору надосадову рідину переносять у конічну колбу і розбавляють 1:2 0,9% розчином натрію хлориду *P*.

Випробований розчин. 2 мл препарату поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять об'єм розчину 0,9% розчином натрію хлориду P до позначки. 10,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять об'єм розчину 0,9% розчином натрію хлориду P до позначки. У дві пробірки поміщають по 2,0 мл отриманого розчину і додають по 0,8 мл розчину A .

Розчин порівняння. Близько 20 мг (точна наважка) СЗ натрію гіалуронату (EP CRS або ФСЗ ДФУ, або РСЗ) поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в 10 мл 0,9% розчину натрію хлориду P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки. 10,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять об'єм розчину 0,9% розчином натрію хлориду P до позначки. У дві пробірки поміщають по 2,0 мл отриманого розчину і додають по 0,8 мл розчину A .

Пробірки ретельно збовтують і витримують 3 години при температурі $+4^{\circ}\text{C}$, потім центрифугують при 4000 об/хв протягом 10 хв. Надосадову рідину ретельно відокремлюють і відкидають, а осад промивають 5 мл 0,9% розчину натрію хлориду P .

Отримані розчини центрифугують повторно, ретельно відокремлюють і відкидають надосадові рідини.

У кожену пробірку додають 6,0 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, осад розчиняють при нагріванні пробірок до 50°C протягом 10 хв.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння на спектрофотометрі за довжини хвилі 620 нм, в кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи в якості компенсаційного розчину 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Вміст натрію гіалуронату (X_2), в 1 мл препарату, в міліграмах, розраховують за формулою 2.2:

$$X_2 = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot 2 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot P}{A_0 \cdot 200}, \quad (2.2)$$

де A - оптична густина випробовуваного розчину;

A_0 - оптична густина розчину порівняння;

m_0 - маса наважки $C3$ натрію гіалуронату, в міліграмах;

P - вміст натрію гіалуронату у $C3$ натрію гіалуронату, у відсотках.

Вміст натрію гіалуронату ($(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$) в 1 мл препарату має бути:

- на момент випуску: від 9,5 мг до 10,5 мг в 1 мл препарату;
- протягом терміну придатності: від 9,0 мг до 10,0 мг в 1 мл препарату.

L-Аргінін. Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ 2.2.29, 2.2.46) [111].

Буферний розчин рН 6,0. 1,2 г дикалію гідрофосфату P розчиняють в 1000 мл води P і додають кислоту фосфорну розведену P до рН $(6,0 \pm 0,05)$ (ДФУ, 2.2.3).

Випробовуваний розчин. 5,0 мл препарату доводять водою P до об'єму 25,0 мл. Розчин використовують свіжоприготованим.

Розчин порівняння. Близько 120,0 мг (точна наважка) $C3$ аргініну (EP CRS або $ФСЗ$ ДФУ, або $РСЗ$) розчиняють у воді P на ультразвуковій бані при температурі 40 °С протягом 15 хв і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. Розчин використовують свіжоприготованим.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за наступних умов:

- хроматографічна колонка Waters Spherisorb CNRP розміром (4,6 × 250) мм, заповнена сорбентом з розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

- рухома фаза: ацетонітрил Р1 – буферний розчин рН 6,0 (1:99), дегазована крізь фільтр ПОР-16 або будь-яким іншим способом;

- швидкість рухомої фази – 1 мл/хв;

- детектування за довжини хвилі 200 нм;

- температура колонки – 25°С;

- хроматографічну колонку врівноважують рухомою фазою протягом не менше 60 хв.

Хроматографують по 10 мкл розчину порівняння, отримуючи від 2 до 5 хроматограм. З отриманих хроматограм розраховують відносне стандартне відхилення (RSD) для площ піків аргініну. Отримання паралельних хроматограм (n_0) припиняють при досягненні вимог до RSD (ДФУ, 2.2.46 N, табл. 2.2.46-2).

Хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі розчину порівняння виконуються наступні умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована для піків аргініну має бути не менше 1000 теоретичних тарілок;
- коефіцієнт симетрії піків аргініну має бути не більше 2,5.

Поперемінно хроматографують випробовуваний розчин та розчин порівняння, отримуючи число паралельних хроматограм (n) для кожного з розчинів не менше, ніж при перевірці придатності хроматографічної системи (n_0).

Вміст аргініну (X_3) в 1 мл препарату, в міліграмах, розраховують за формулою 2.3:

$$X_3 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot P}{S_0 \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot 2000}, \quad (2.3)$$

де S_1 - середнє значення площ піків аргініну, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 - середнє значення площ піків аргініну, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_0 - маса наважки СЗ аргініну, взята для приготування розчину порівняння, в міліграмах;

P - вміст основної речовини в СЗ аргініну, в процентах.

Вміст аргініну ($C_6H_{14}N_4O_2$) в 1 мл препарату має бути:

- на момент випуску: від 5,7 мг до 6,3 мг в 1 мл препарату;
- протягом терміну придатності: від 5,4 мг до 6,6 мг в 1 мл препарату.

2.5 Розрахунок кількості вихідних речовин

Субстанції та допоміжні речовини, які входять до складу ЛЗ мають певний кількісний вміст основної речовини і містять вологу. Залежно від процентного вмісту й води сировини, яку обрали для розробки складу ЛЗ, при розробці складу необхідно здійснювати розрахунок необхідної кількості субстанції та допоміжних речовин у технічній масі за формулою 2.4:

$$X_2 = V \times X_1 \times 100 / 100 - b, \quad (2.4)$$

де X_2 - маса наважки, мг;

V - об'єм завантаження, мл;

X_1 - концентрація речовини в 100%, мг/мл;

b - волога, %.

2.6 Методика визначення впливу фільтруючих матеріалів на комбіновані ін'єкційні розчини

У 3 колби з притертими пробками поміщають зразок розчину та досліджуваний фільтруючий матеріал у співвідношенні 1 мл випробуваного розчину на 1 см² фільтруючого матеріалу. В 1 колбу з притертою пробкою поміщають контрольний розчин без фільтруючого матеріалу. Колби поміщають у термостат при температурі 40°C на 3 доби. По закінченні часу витримки випробуваний розчин аналізують за такими показниками: прозорість, кольоровість, рН розчину, кількісний вміст відповідно до методик, описаних у даному розділі.

Фільтруючий матеріал вважається придатним, якщо показники 3-х паралельних випробувань збігаються з показниками контрольного розчину.

2.7 Дослідження специфічної дії комбінованого розчину

Вивчення впливу досліджуваного комбінованого розчину на систему зсідання крові проведено *in vitro* за методом Моравиця. Метод полягає в тому, що на скло наносять краплю крові діаметром 4-6 мм, потім поверхнею краплі проводять скляним капіляром через кожні 30 с. Час зсідання фіксують з появою перших фібринових ниток, які тягнуться за капіляром.

З цією метою на годинне скло №1 - наносили до 2 крапель крові щурів (приблизно 0,1 мл) не додавали ніяких речовин (інтактний контроль), №2 – до крові додавали 0,05 мл фізіологічного розчину (контроль №2) №3 – до крові додавали 0,05 мл ДГК (серія 1020919), №4 – до крові додавали 0,05 мл ДГК з ГК та L-аргініном (серія 2160220). По поверхні краплі кожні 30 з проводили тонкою голкою. Час зсідання визначали з моменту появи перших фібринових ниток, що тягнуться за голкою [112].

Вивчення гострої токсичності проведено на 10 самцях та 10 самках статевозрілих білих мишах вагою 20-25 г, та 10 самцях та самках білих безпородних щурах масою 200-250 г. В досліді використано клінічно здорових тварин, що знаходилися за однакових умов утримання. З урахуванням кожного виду тварин було сформовано 4 групи різної статі. ЛД₅₀ визначалася за методом Кербера [112].

Вивчення параметрів токсичності сполуки проводили при одноразовому підшкірному введенні. Досліджувана сполука вводилася білим мишам підшкірно в дозі 1,0 мл, а щурам – 5,0 мл (максимально дозволений об'єм для підшкірного введення для даного виду тварин). Тваринам контрольної групи вводили у відповідному об'ємі воду для ін'єкцій. Усі досліджувані рідини розподіляли на рівні об'єми та вводили в різні ділянки тіла. Продовж 14 діб з моменту введення сполук тварини знаходилися під постійним наглядом [112].

Реєстрували загальний стан тварин, поведінкові реакції, час виникнення та характер інтоксикації, її тяжкість, зворотність, терміни загибелі

тварин. Визначали динаміку приросту маси тіла від початку введення та через 14 діб після введення [112].

Через два тижні тваринам проводили евтаназію під легким диетиловим ефірним наркозом, з метою макроскопічного дослідження внутрішніх органів (печінки, нирок, серця, тимусу та селезінки, а також місця безпосереднього введення препарату) [112].

Утримання експериментальних тварин та дослідження виконували у відповідності до правил, що прийняті Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для наукових потреб (прийняту у Страсбурзі 18.03.1986 р.) [113].

З метою вивчення алергізуючих властивостей досліджуваної сполуки було використано 10 мурчаків різної статі масою 250-300 г 6-8 тижневого віку, та 40 білих мишей різної статі вагою 18-22 г, 6-8 тижневого віку. Використані у дослідженні дози перераховувалися за Freireich та відповідали дозам для людини [112].

Для визначення алергізуючих властивостей сполуки використовували підшкірне, внутрішньом'язове, нашкірне та внутрішньовенне застосування, курсове та одноразове. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин в еквівалентному об'ємі. Усі використані методи проводилися згідно до «Методичних рекомендацій щодо оцінювання алергізуючих властивостей лікарських засобів» [112]. Було використано наступні методики:

Кон'юнктивальна проба на мурчаках. Тваринам дослідної групи (n=5) попередньо проводили сенсibiliзацію шляхом підшкірного введення препарату у дозах 0,01 та 0,1 мл/кг протягом 5 діб. Тест полягав в закапуванні в ліве око кожної тварини 5 мкл препарату, що не викликало подразнюючої дії на інтактних тварин, у праве око – ізотонічний розчин натрію хлориду в тому ж об'ємі. Оцінку стану кон'юнктиви ока проводили через 15 хвилин та через 24-48 годин. Інтактні мурчаки складали контрольну групу.

Метод нашкірних аплікацій на мурчаках. Вивчення сенсibiliзуючої дії препарату проводили шляхом 20 повторних нашкірних аплікацій розміром

2×2 см по 5 разів на тиждень на ділянку бокової поверхні тіла мурчаків (n=5). Наносили по 3 краплі препарату. Перше тестування виконували після 10 аплікацій, наступне – після 20 аплікацій.

Активна шкірна анафілаксія на мишах. Мишам (n=5) проводили сенсibilізацію шляхом трикратного введення препарату: перша підшкірна ін'єкція, дві наступні – внутрішньом'язово через добу в об'ємі 0,1 та 0,4 мл. Введення досліджуваної сполуки проводили через 14 діб після останньої сенсibilізації. Препарат вводили внутрішньошкірно – 10 мкл та 20 мкл. Через 20 хвилин мишам внутрішньовенно вводили 0,5 мл 1% розчину синього Еванса. Після через 30 хвилин тварин виводили з досліду, визначали розміри синьої плями на внутрішній поверхні шкіри в місці введення препарату. Контрольні тварини отримували препарат та синій Евенс, але замість сенсibilізуючих ін'єкцій досліджуваного препарату їм вводили фізіологічний розчин.

Висновки до Розділу 2

1. На основі всебічного аналізу літературних джерел та практичного застосування комбінованих ін'єкційних препаратів обрані об'єкти досліджень.
2. Теоретично обґрунтовано та визначено загальну методологію проведення досліджень, складено алгоритм фармацевтичної розробки комбінованих парентеральних препаратів.
3. З метою стабілізації комбінованих ін'єкційних препаратів обрано ДР, що широко застосовуються у фармацевтичному виробництві.
4. Для стандартизації розроблених ЛЗ використані сучасні фізико-хімічні та фармако-технологічні методи досліджень.
5. На підставі теоретичних знань щодо фармацевтичної розробки комбінованого ін'єкційного ЛЗ та фізико-хімічних властивостей активних і допоміжних речовин обґрунтовані методи дослідження, необхідні для

розроблення оптимального складу, раціональної технології та стандартизації параметрів якості досліджуваного розчину.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Етапи розробки антиоксидантного ін'єкційного препарату з гіалуроновою кислотою. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку*: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, 19-20 вересня 2019 р., Харків: НФаУ, 2019. Т. 1. С. 149-150.

2. Алмакаєва Л. Г., Семенова К. Н. Разработка препаратов на основе гиалуроновой кислоты для биоревитализации. *Актуальні проблеми розвитку галузевої економіки та логістики*: матеріали VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 25-26 жовтня 2018 р., Харків: НФаУ, 2018. С. 119-121.

РОЗДІЛ 3

ТЕОРЕТИЧНЕ Й ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ КОМБІНОВАНОГО ІН'ЕКЦІЙНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

3.1 Дослідження фізико-хімічних і технологічних властивостей діючих речовин

В останні роки відзначається неухильний ріст інтересу розробників і виробників ЛЗ до створення і комерціалізації КЛЗ, що поєднують дві або більше діючих речовин в одній лікарській формі. Це пояснюється очікуваними перевагами комбінованих препаратів порівняно з монокомпонентними: кращою ефективністю, швидким настанням фармакологічного ефекту, вищою безпечністю і кращою переносимістю при порівнянній ефективності за рахунок застосування більш низьких доз одного або декількох компонентів комбінації, а також зручністю застосування. Крім того, застосування комбінованого препарату в ряді випадків дозволяє зменшити частоту виникнення небажаних побічних реакцій на один з компонентів комбінації або ж здійснювати корекцію супутніх захворювань [114, 115, 116].

Основу науково-дослідної роботи складало поглиблене та детальне вивчення фізико-хімічних властивостей діючих речовин. Основним компонентом комбінованого препарату є ГК та її солі. На основі літературних даних та враховуючи властивості речовин, для КЛЗ нами були обрані: натрієва сіль ГК, природний антиоксидант – ДГК, аміносислота – L-аргінін, бурштинова кислота [117, 118].

Для вибору оптимального складу та технології одержання комбінованої ін'екційної лікарської форми нами вивчалися фізико-хімічні і технологічні властивості основних діючих речовин.

Натрію гіалуронат – натрієва сіль ГК, полісахарид, що складається з D-глюкуронової кислоти і N-ацетил-D-глюкозамін дисахаридних ланцюгів, з'єднаних глікозидними мостиками (рис. 3.1).

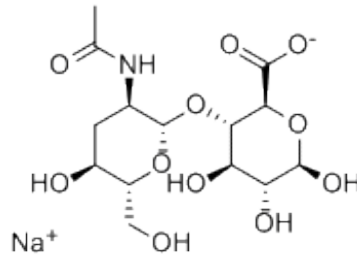
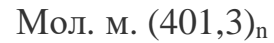


Рис. 3.1 Структурна формула натрію гіалуронату

Гіалуронат натрію за активністю та властивостями є повним аналогом ГК. На ринку України препарати на основі натрію гіалуронат представлені в різній молекулярній масі – низько-, середньо- і високомолекулярні. Різниця їх полягає не лише у молекулярній масі, але й в поведінці речовини при використанні. Нами були вивчені фізико-хімічні властивості субстанцій натрію гіалуронату. Вивчали розчинність 1% розчинів натрію гіалуронату в воді для ін'єкцій.

Дані досліджень представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Розчинність натрію гіалуронату в воді для ін'єкцій

Натрію гіалуронат	Молекулярна маса	Зовнішній вигляд	pH
Високомолекулярний	2500000 Да	Гелеподібна структура	7,2-7,3 (0,5% розчин)
Середньомолекулярний	1300000 Да	В'язка рідина	7,3-7,4 (1% розчин)
Низькомолекулярний	59000 Да	Мало в'язка рідина	6,6-6,8 (1% розчин)

L-Аргінін. Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ 2.2.29, 2.2.46)

Всі зразки субстанцій натрію гіалуронату добре, але повільно розчинні у воді для ін'єкцій, краще при нижчій температурі. При температурі вище 40-50 °С спостерігалось утворення грудок, які потім дуже довго розчинялись при

перемішуванні. Зразки розчинів були більш однорідні при набуханні субстанції та поступовому розчиненні при температурі 20-30 °С. При цьому утворюються в'язкі розчини різної структури з рН від 6,6 до 7,4.

Для подальших досліджень нами обраний натрію гіалуронат з молекулярною масою 1,3-1,5 МДа. Встановлено, що набухання субстанції необхідно проводити протягом не менше 2 годин при температурі 20-30 °С, потім проводити перемішування протягом 20-30 хв на мінімальних обертах мішалки аби в розчині не утворювалися бульбашки повітря.

3.2 Обґрунтування введення до лікарської форми дигідрокверцетину

ДГК (таксіфолін, 3,5,7,31,41- пента-гідроксифлаванон) відноситься до групи флаванонів класу флавоноїдних сполук та є одним із найбільш ефективних природних антиоксидантів. За молекулярною будовою і функціями близький до рутину і кверцетину.

У 2008-2009 рр. дві незалежні лабораторії Advanced Botanical Consulting & Testing, Inc. і Brunswick Laboratories виконали тестування ДГК за методом ORAC. Результати даного дослідження показали, що ДГК має високу антиоксидантну активність і перевершує за своєю активністю більшість відомих антиоксидантів у світі. Структурна формула ДГК представлена на рис. 3.2.

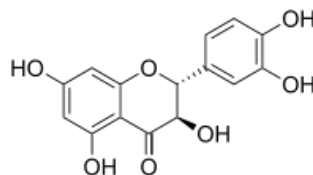


Рис. 3.2 Структурна формула дигідрокверцетину

ДГК має низьку розчинність у воді для ін'єкцій. При підвищеній температурі вона збільшується, але розчини не стабільні. Через деякий час з'являється помутніння та осад.

ДГК, як і багато інших флавоноїдів – слабка органічна кислота, оскільки до його складу входять гідроксильні групи здатні дисоціювати, причому дисоціювати може кілька гідроксильних груп. В результаті досліджень було встановлено, що для одержання водних розчинів ДГК необхідні допоміжні речовини із лужним значенням рН.

Одним із завдань було проведення дослідження з метою підвищення розчинності ДГК за рахунок спрямованої модифікації структури базової сполуки, а також підбору системи модифікаторів розчинності для отримання стабільного 0,5% розчину.

Для отримання розчину ДГК була обрана амінокислота лужної природи – L-аргінін. Вибір обумовлений фізико-хімічними та фармакологічними властивостями цих речовин [119, 120]. В дисертаційній роботі Бобокало С. В. були досліджені і інші речовини лужної природи, такі, як: трометамол та меглумін. Кращі результати були отримані з використанням як лужного агента L-аргініну [119]. Тому нами був використаний L-аргінін, для нашої лікарської форми в інших кількісних співвідношеннях. Важливими параметрами реакції, що визначають структури комплексних сполук флавоноїду і речовини лужної природи є рН розчину та їх мольні співвідношення. Нами були складені передбачувані реакції комплексних сполук.

L-аргінін – основна амінокислота з двома основними центрами: аміногрупою в α -положенні і гуанідиною в δ -положенні. Гуанідинова група при протонуванні є сильно лужною (рКа 12,48), знаходиться в протонованій катіонній формі, при рН < 10 і здатна утворювати множинні водневі зв'язки.

У водному середовищі протон приєднується до гуанідинової групи з утворенням мезомерно-стабілізованого гуанідо-катіону, представленого на рис. 3.3.

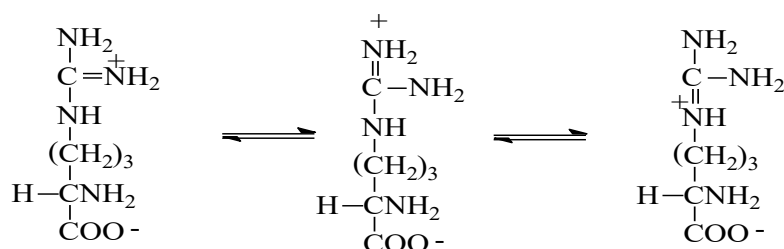


Рис. 3.3 Цвітер-іонні форми L-аргініну.

У кислих та нейтральних середовищах L-аргінін існує переважно як катіон, здатний утворювати сполуки за аміною та гуанідиною групами. У лужному середовищі він існує у вигляді аніону. У сильнополярних розчинниках з L-аргінін існує у вигляді цвітер-іону [119].

Для вибору оптимального рН розчину був розрахований ступінь дисоціації амінокислоти аргініну за формулою 3.1:

$$\text{ступінь дисоціації (\%)} = 100 / (1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}}). \quad (3.1)$$

Розрахунок ступеня дисоціації проводили при різних значеннях рН середовища, використовуючи показник константи кислотної іонізації аргініну рК 2,17.

Розрахунки ступеня дисоціації L-аргініну наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Залежність ступеня дисоціації аргініну від рН середовища

рН	Ступінь дисоціації, %
3,5	95,53
4,0	98,54
4,5	99,53
5,0	99,86
5,5	99,95
6,0	99,98
7,0	99,99

Проведені розрахунки показали, що максимальне значення ступеня дисоціації аргініну (99,99%) досягається при значеннях рН середовища вище 7,0, що відповідно вказує на повну дисоціацію. Таким чином, можна припустити, що оптимальне значення рН розчину повинне знаходитися в межах від 6,5 до 7,5.

Нами були складені передбачувані реакції комплексоутворення ДГК з L-аргініном при мольних співвідношеннях 1:1; 1:1,5 та 1:2. З урахуванням передбачуваних терапевтичних концентрацій ДГК було розраховано кількість вихідних інгредієнтів для одержання розчину (табл. 3.3)

Результати досліджень одержання розчинів ДГК

Вихідні інгредієнти	Режим		рН	Результати спостережень
	Температура, °С	Час перемішування, хв		
ДГК + L-Аргінін (1:1)	80-85	15-20	7,45	Прозорий розчин жовтого кольору
ДГК + L-Аргінін (1:1,5)	80-85	15-20	7,68	Прозорий розчин насиченого жовтого кольору
ДГК + L-Аргінін (1:2)	80-85	15-20	8,72	Прозорий розчин помаранчевого кольору, при охолодженні помітне помутніння

В результаті експериментальних досліджень було встановлено, що при підвищеній температурі (80-85 °С) можна отримати прозорі розчини мольного співвідношення 1:1; 1:1,5 але через 1 міс. спостереження було відмічене помутніння розчину, що вказувало на нестабільність.

Подальші дослідження були спрямовані на вибір інших допоміжних речовин для стабілізації одержаного розчину при співвідношенні компонентів (1:1,5). Очевидно, що нова фаза утворюється в результаті взаємодії переважаючих форм у розчині при заданому значенні рН.

Для вирішення питання щодо необхідності ведення до складу розчину іншого солюбілізатора або комплексоутворювача були напрацьовані зразки розчинів з високомолекулярною сполукою: ПВП К-17 в концентраціях від 2 до 5% і без нього. Позитивні результати за показниками рН розчину, зовнішній вигляд були одержані вже при додаванні 2% ПВП.

У хімічному відношенні ПВП є дуже стійкою сполукою, а його здатність зв'язувати більшість органічних речовин, зокрема флавоноїди і поліфенольні сполуки, дозволяє використовувати його у фармації та медицині. Молекули ПВП орієнтуються щодо агрегатів за рахунок утворення водневих зв'язків між ними і запобігають осадженню агрегатів. Відомо, що високомолекулярні

сполуки стабілізують дисперсні системи утворюючи міцели. Таким чином, ПВП стабілізує іонний асоціат за рахунок гідрофільно-гідрофобної взаємодії, тому рекомендований нами як ДР. За відсутності ПВП одержання стабільного розчинного комплексу ДГК і аргініну є неможливим, оскільки через певний проміжок часу в розчинах спостерігається помутніння.

3.3 Вибір антиоксиданту для стабілізації розчину

Важливим аспектом при фармацевтичній розробці є забезпечення стабільності комбінованого розчину протягом терміну зберігання. При зберіганні розчину було встановлено, що при контакті розчину з повітрям (при розкритті ампули) він змінював кольоровість на більш інтенсивний – від жовто-помаранчевого до коричневого. Це пов'язано з окисненням складових композиції. Окиснені продукти надають розчину такий колір. Тому були проведені дослідження по введенню в розчин антиоксиданту.

Як антиоксидант в ін'єкційних препаратах закордонного виробництва часто використовують натрію метабісульфіт у концентрації 0,05-0,15%. Згідно загальної статті «Лікарські засоби для парентерального застосування» [109], зазначено, що кількість натрію метабісульфіту, який використовують як антиоксидант, не має перевищувати 0,2%.

Нами були проведені дослідження з визначення оптимальних концентрацій натрію метабісульфіту в комбінованому розчині (табл. 3.4). При додаванні натрію метабісульфіту в концентрації від 0,12% до 0,20% було встановлено, що інтенсивність забарвлення розчину не змінюється, на протязі 10 хв, кількісний вміст діючих речовин знаходиться в допустимих межах. Тому можна вважати 0,16% натрію метабісульфіту оптимальною концентрацією антиоксиданту для стабілізації комбінованого розчину.

Для запобігання деструкції АФІ, схильних до окиснення, також запропоновано введення до складу препарату антиоксиданту непрямої дії – динатрію едетату (Трилон Б), що утворює комплекси з металами, які

каталізують процеси окиснення. Кількість його відповідає кількості в аналогічних препаратах і складає 1 мг/мл.

Таблиця 3.4

**Визначення оптимальних концентрацій антиоксиданту натрію
метабісульфіту в комбінованому ін'єкційному розчині**

Антиоксидант, %	Прозорість розчину	Кольоровість	pH	Зміна кольору розчину/хвилини
0	Прозорий	Жовтий	7,40	Коричневий /7
0,10	Прозорий	Жовтий	7,42	Помаранчевий /10
0,12	Прозорий	Жовтий	7,40	Світло-помаранчевий /10
0,14	Прозорий	Жовтий	7,40	Світло-помаранчевий /15
0,16	Прозорий	Жовтий	7,40	Жовтий /10-120
0,18	Прозорий	Жовтий	7,38	Жовтий /10-120
0,20	Прозорий	Жовтий	7,38	Жовтий /10-150

Примітка. n=5.

Для запобігання окиснення діючих речовин при наповненні ампул розчином здійснювали заміщення повітряного простору в ампулі інертним газом – азотом. При наповненні шприців азот не використовували.

3.4 Обґрунтування доцільності введення кислоти бурштинової

Згідно попередніх доклінічних досліджень, які було проведено в інституті ендокринології [121], було встановлено, що кількість аргініну яка використовується для одержання розчину ДГК недостатня для терапевтичної концентрації в лікарській формі. Тому частину аргініну нами було рекомендовано вводити в лікарську форму у вигляді солі з бурштиновою кислотою.

Сьогодні вчені з'ясували, що сукцинат (сіль бурштинової кислоти) має здатність стимулювати проліферацію фібробластів – клітин, які відповідають за синтез міжклітинного матриксу сполучної тканини. Завдяки матриксу забезпечується транспорт хімічних компонентів, необхідних для підтримки життєдіяльності клітини.

Ще одна цінна властивість бурштинової кислоти для організму це також, як і в випадку з L-аргініном – здатність перешкоджати утворенню вільних радикалів (потужна антиоксидантна дія), тим самим захищаючи клітинні мембрани. Сукцинат відновлює ендотелій судин та нормалізує спастичний та атонічний тип мікроциркуляції, регулюючи лімфовідтік [122].

Таким чином, завдяки L-аргініну сукцинату покращуються метаболічні процеси в шкірі, посилюється мікроциркуляція, уповільнюються процеси старіння. Це є важливим обґрунтуванням введення аргініну сукцинату до складу комбінованого препарату [121, 122].

Подальші дослідження були спрямовані на вивчення фізико-хімічних характеристик бурштинової кислоти та встановлення умов протікання реакції солеутворення для отримання солі L-диаргініну сукцинату або L-аргініну натрію сукцинату та визначення оптимальних технологічних параметрів приготування розчину: температурного режиму, технологічних меж рН, порядку введення вихідних речовин.

Кислота бурштинова представляє собою двохосновну кислоту з $pK_{a,1} = 4,21$ та $pK_{a,2} = 5,64$ при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для визначення оптимальних умов проведення реакції солеутворення L-диаргініну сукцинату також була визначена залежність ступеня дисоціації кислоти бурштинової від рН середовища з використанням показників констант іонізації $pK_1 (4,21)$ і $pK_2 (5,64)$.

Ступінь дисоціації кислоти бурштинової в розчині розраховували за формулою 3.2:

$$\text{Ступінь дисоціації (\%)} = 100 / (1 + 10^{pK_a - pH}) \quad (3.2)$$

Розрахунки представлені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Залежність ступенів дисоціації кислоти бурштинової від рН середовища

рН розчину	Ступінь дисоціації кислоти бурштинової, %	
	$pK_1 = 4,21$	$pK_2 = 5,64$
3,5	16,31	0,72
4,0	38,17	1,55
4,5	66,23	6,76
5,0	86,21	18,62
5,5	95,24	42,02
6,0	98,04	69,44
6,5	99,5	87,72
7,0	99,80	96,15
7,5	99,95	99,01
8,0	100,00	100,00

Як показали розрахунки, максимальне значення ступеня дисоціації кислоти бурштинової з утворенням аніону за однією карбоксильною групою складає понад 99,8%, що вказує на повну дисоціацію, яка досягається при значеннях рН 7,0. Дисоціація за другою карбоксильною групою в значній мірі проходить при вищих значеннях рН – від 7,5.

Таким чином, можна стверджувати, що оптимальне значення рН розчину для утворення двозаміщеної солі кислоти бурштинової знаходиться в межах від 7,0 до 7,5.

Діаграма розподілу іонних форм бурштинової кислоти, яка базується на системі реакцій іонної дисоціації двоосновної кислоти, представлена на рис. 3.4.

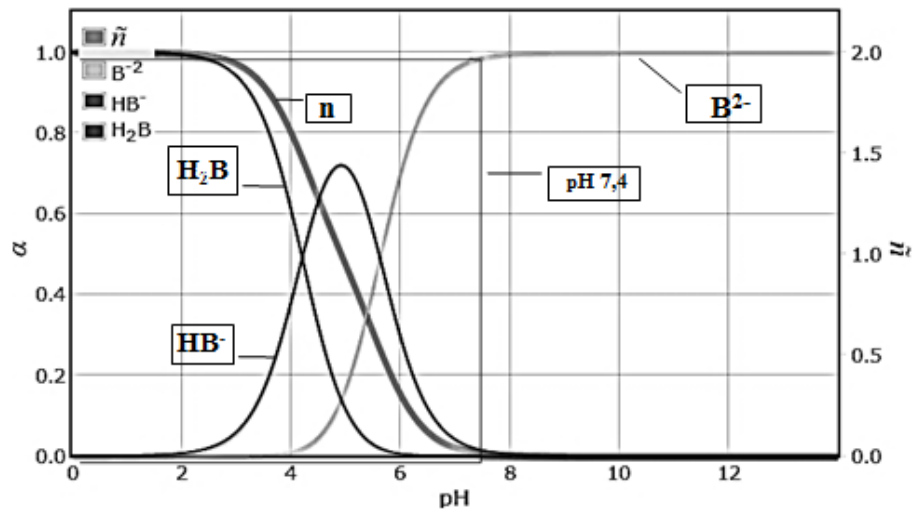


Рис. 3.4 Діаграма розподілу іонних форм бурштинової кислоти. На діаграмі: n – ступінь протонування, α – дольові частки (B^{2-} - двозарядних іонів, HB^- - однозарядних іонів, H_2B – недисоційованої кислоти)

На основі аналізу діаграми було визначено, що в розчині можуть бути присутні декілька форм кислоти бурштинової: недисоційована кислота, дисоційована за однією карбоксильною групою та повністю дисоційована (двозарядний іон). Наявність тієї чи іншої форми та її доля залежить від ступеня протонування кислоти, а ступінь – від рН середовища.

При значеннях рН, наближених до рН крові (7,4), в розчині наявна саме повністю дисоційована форма з дольовою часткою 0,99. За таких умов буде утворюватися двозаміщена сіль кислоти бурштинової.

Двозаміщена сіль L-диагрініну суцинат буде перевищувати попередньо нами розраховані значення осмолярності розчину. Тому замість однієї молекули L-аргініну було проведено розрахунки та вивчено умови проведення реакції солеутворення бурштинової кислоти як з L-аргініном, так і з натрію гідроксидом для одержання солі L-аргініну натрію сукцинату.

Дольова частка двозарядних іонів бурштинової кислоти достатньо велика (понад 0,95) вже при значеннях рН понад 6,88-7,0. Отже, для утворення L-аргініну натрію сукцинату рівень рН розчину має бути близько 7,0.

Досліджено утворення солі – L-аргініну натрію сукцинату, де за однією з карбоксильних груп утворюється зв'язок з іоном L-аргініну, а за іншою – з

натрієм. Реакцію солеутворення L-аргініну натрію сукцинату наведено на рисунку 3.5.

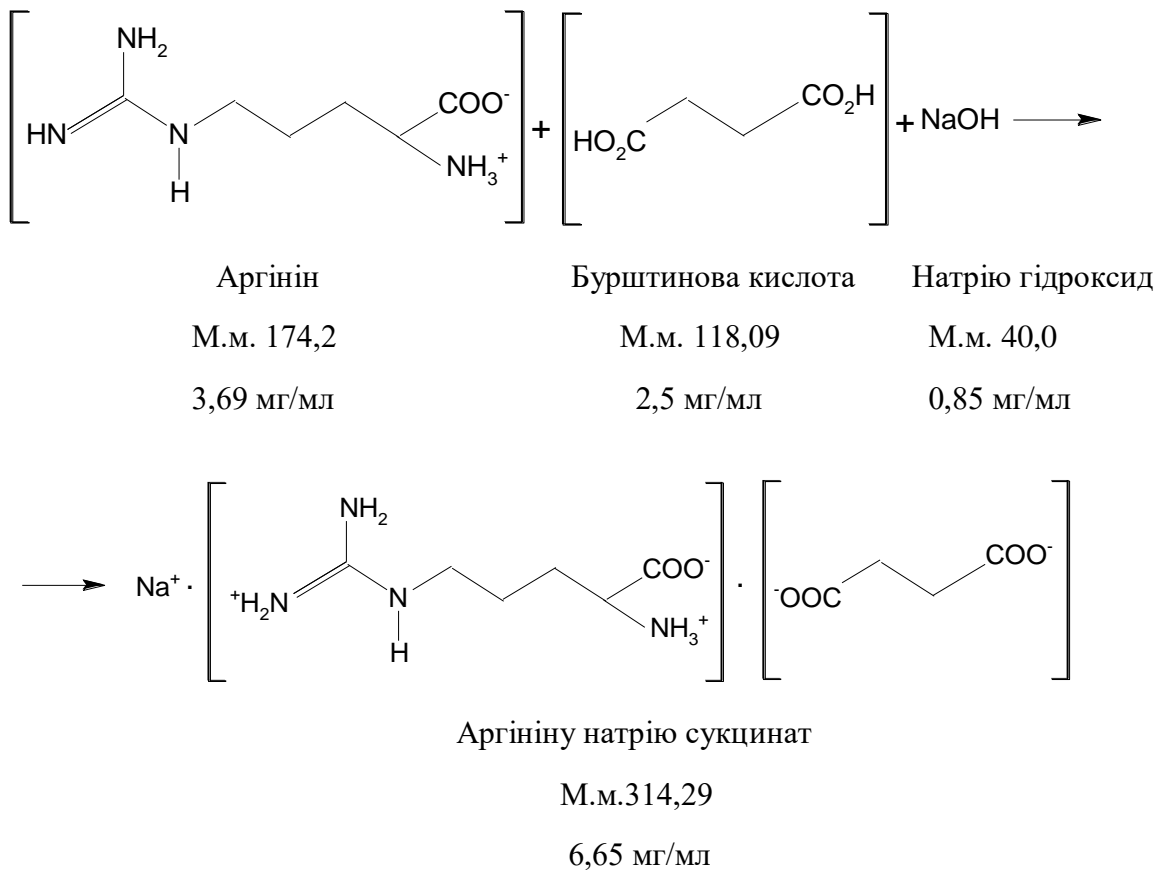


Рис.3.5 Реакція солеутворення аргініну натрію сукцинату

Розрахована кількість вихідних інгредієнтів для одержання розчину L-аргініну натрію сукцинату за формулою 3.3:

$$X = k \times M_x \times C / M_c, \quad (3.3)$$

- де X – кількість реагенту на 1 л розчину, г
 M_c – молекулярна маса відповідної солі;
 M_x – молекулярна маса реагенту;
 C – концентрація відповідної солі, мг/мл.

За основу розрахунків брали кількість бурштинової кислоти – 0,25г на 100 мл.

Розрахунок кількості аргініну для одержання солі аргініну сукцинату:

$$X = 1 \times 2,5 \times 174,2 / 118,09 = 3,69 \text{ мг/мл (0,37\%)}$$

$$X = 1 \times 2,5 \times 40,0 / 118,09 = 0,85 \text{ мг/мл (0,085\%)}$$

118,09 мг бурштинової кислоти відповідає 314,29 мг аргініну натрію сукцинату 2,5 мг: $X=1 \times 2,5 \times 314,29 / 118,09 = 6,65$ мг/мл (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Кількість вихідних інгредієнтів

Сировина	M_x	M_c	$C,$ мг/мл	k	$X,$ г/л	Отриманий продукт
Аргінін	174,2	314,29	6,65	1	3,69	Аргініну натрію сукцинат
Натрію гідроксид	40,0			1	0,85	
Бурштинова кислота	118,1			1	2,5	

В результаті проведених досліджень був обраний наступний склад препарату під умовною назвою «Хіаларікс»:

- Натрію гіалуронат – 1,10 г
- ДГК – 0,50 г
- Кислота бурштинова – 0,25 г
- L-аргінін – 1,25 г
- Натрію гідроксид – 0,085 г
- ПВП – 2,0 г
- Натрію метабісульфіт– 0,16 г
- Динатрію едетат – 0,1 г
- Вода для ін'єкцій до 100 мл.

3.5 Розрахунок осмолярності розчину «Хіаларікс»

Осмолярність – це міра загальної кількості хімічних речовин на кілограм розчинника й, отже, є показником осмотичного тиску розчину. Осмолярність залежить від молярної концентрації речовин, розчинених у розчині, від їх дисоціації та відхилення від ідеальних розчинів (закон Рауля). Одиницею осмолярності є осмоль на кілограм (осмоль/кг), але частіше використовується кратна одиниця міліосмоль на кілограм (мосмоль/кг).

Отже, осмолярність та осмоляльність це близькі величини і відрізняються способом вираження концентрації розчину – молярної і моляльної. Осмолярність – це кількість осмолей на 1 л розчину, а осмоляльність – це кількість осмолей на 1 кг розчинника.

Нами була розрахована теоретична осмолярність розчину «Хіаларікс» за формулою 3.4 (табл. 3.7):

$$O_s = m \times n \times 1000 / M, \quad (3.4)$$

де O_s – осмолярність розчину, мосм/л;

m – вміст речовини у розчині, г/л;

M – молярна маса речовини;

n – сумарна кількість іонів, що утворюються з однієї молекули розчиненої речовини внаслідок дисоціації.

Таблиця 3.7

Розрахунок осмолярності розчину «Хіаларікс»

Інгредієнти розчину	m	n	M	O, мосмоль/л
ДГК	5,00	2	304,25	32,87
Аргінін	12,5	1	174,20	71,75
Аргінін натрію сукцинат	6,65	3	314,29	63,48
Натрію гіалуронат	11,0	2	1500000	0,01
Натрію метабісульфіт	1,60	2	190,1	16,83
Повідон	20,0	1	8000	2,80
Динатрію едетат	0,1	3	372,2	0,81
Загальна осмолярність				188,55

Також експериментально була визначена осмоляльність розчину «Хіаларікс» за зниженням температури замерзання розчину (фармакопейний метод) [123]. Встановлено, що осмоляльність розчину, визначена за допомогою

осмометра «The Advanced® Osmometer» Model 303, фірми «Advanced Instruments Inc.» (США), складає 230,78 мосмоль/кг.

Осмолярність плазми крові складає близько 292 мосмоль/л.

Отже, при розрахунку теоретичної осмолярності досліджуваного препарату та при експериментальному визначенні, встановлено, що розчин за величиною осмолярності наближається до осмолярності крові, що є важливим критерієм при його використанні.

3.6 Розробка способу одержання комбінованого лікарського засобу

Розробка способу одержання КЛЗ у першу чергу залежить від хімічних властивостей основних і діючих речовин та вимог до якості готової лікарської форми, яка має бути стабільною, стерильною, мати належну біодоступність і терапевтичну дію [123, 124].

Важливим при розробці способу одержання розчину діючих речовин є вибір режимів розчинення. Для здійснення цього вибору нами проведені дослідження повноти проходження реакції солеутворення L-аргініну натрію сукцинату від температури (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Визначення оптимальних умов проведення реакції одержання L-аргініну натрію сукцинату

Температура розчину, °C	Час розчинення, хв.	Прозорість розчину	pH
20,0	15-20	Прозорий	6,63
25,0	10-15	Прозорий	6,65
30,0	10-15	Прозорий	6,78
40,0	7-10	Прозорий	6,85
50,0	5-7	Прозорий	6,88
60,0	5	Прозорий	7,00
100,0	5	Прозорий	7,00

З цією метою готували модельні суміші. Встановлено оптимальну температуру солеутворення L-аргініну натрію сукцинату від 50 до 60 °С. Обрана температура обумовлена тим, що при температурах нижче 50 °С швидкість розчинення компонентів недостатня, а підтримка температури реакційної суміші вище 60 °С недоцільна, оскільки на швидкість солеутворення вона вже не впливає, але потребує витрат енергії.

Під час проведення експериментів з вибору способу отримання розчину були досліджені декілька варіантів приготування розчинів з дотриманням встановлених умов проведення реакцій солеутворення (температурний і часовий режими), але вони відрізнялися порядком введення інгредієнтів в розчин та температурним режимом розчинення.

Готували серії з проведенням реакцій солеутворення в окремих ємностях з подальшим змішуванням отриманого розчину L-аргініну натрію сукцинату з розчином L-аргініну з ДГК та в одному реакторі з встановленою чіткою послідовністю введення інгредієнтів в розчин.

3.7 Вивчення впливу порядку введення компонентів у розчин, часового і температурного режимів на стабільність лікарського засобу

Готували серії з проведенням реакцій солеутворення в окремих ємностях з подальшим змішуванням отриманих розчинів: L-аргініну натрію сукцинату, L-аргініну з ДГК, натрію гіалуронату та приготування розчину в одному реакторі з встановленою чіткою послідовністю введення інгредієнтів в розчин.

Для вибору способу приготування розчину «Хіаларікс-2» було напрацьовано по три серії розчину в ампулах по 2 мл та в переднаповнених шприцах за двома способами приготування. Був проведений перерахунок вихідних інгредієнтів з урахуванням кількісного вмісту основної речовини та вологи на серію. Дані представлені в таблиці 3.9.

Розрахунок вихідних інгредієнтів на серію

Найменування вихідної сировини	Вміст основної речовини та води, %	Вміст в 1 л розчину, г	Кількість на серію, г	
			В 100 % численні	Фактична
<i>Діючі речовини:</i>				
Натрію гіалуронат с. 151211	99,9; вол.8,5	11,00	5,50	6,01
ДГК, с. 200802019	98,85; вол. 1,5	5,00	2,50	2,59
L-аргінін, с. 161002А	99,5; вол. 0,07	12,50	6,25	6,29
Кислота бурштинова с. 20170216	99,68, вол. 0,39	2,50	1,25	1,26
Натрію гідроксид	98,9	0,85	0,425	0,43
<i>Допоміжні речовини:</i>				
ПВП К-17; с. UK001S180923A5P	вода 2,9 9710	20,00	10,00	10,30
Натрію метабісульфіт с. 1K001831	99, 1	1,60	0,80	0,81
Динатрію едетат	99,2	0,10	0,05	0,05
Вода для ін'єкцій		до 1,0 л	до 500мл	до500мл

Примітка. n=5.

Згідно з першим способом приготування розчину «Хіаларікс» у 1/3 частині води для ін'єкцій при температурі 50-60 °С розчиняли розраховану кількість L-аргініну і ДГК, при постійній підтримці рівня рН розчину 7,0-7,5, потім розчин охолоджували до температури 40-45 °С, додавали ПВП К-17 і стабілізатори: натрію метабісульфіт, динатрію едетат і перемішували протягом 15 хв. до повного розчинення інгредієнтів та отримання жовтого прозорого розчину.

В іншу ємність заливали 1/3 частину води для ін'єкцій та додавали

розраховану кількість L-аргініну та бурштинової кислоти, натрію гідроксиду для одержання солі L-аргініну натрію сукцинату при температурі 45-50 °С, перемішували протягом 15-20 хв. Контролювали рН розчину (6,8-7,0).

В третій ємності в 1/3 частині води для ін'єкцій при температурі 20-25 °С розчиняли натрію гіалуронат, перемішували протягом 10-15 хв., вимірювали рН розчину, який повинен був дорівнювати 7,2-7,4.

До першої ємності з приготованим розчином ДГК з L-аргініном додавали розчин з ємності 2, перемішували та додавали розчин з ємності 3, перемішували всі компоненти. При необхідності проводили корегування рН 0,1 М розчином натрію гідроксиду до рН 7,2-7,5. Доводили об'єм водою для ін'єкцій до необхідного об'єму.

Згідно з іншим способом: спочатку у воді для ін'єкцій розчиняли розраховану кількість натрію метабісульфіту та динатрію едетату при температурі 75-80 °С, перемішували до розчинення протягом 10-15 хв., далі додавали ПВП К-17, перемішували до повного розчинення, ДГК та L-аргінін (температура розчину (70-75 °С), перемішували протягом 10-15 хв. до повного розчинення компонентів та отримання жовтого прозорого розчину. Потім до розчину додавали розраховану кількість L-аргініну та бурштинової кислоти, натрію гідроксиду для одержання солі L-аргініну натрію сукцинату при температурі 45-50 °С, перемішували протягом 15-20 хв.

З окремої ємності додавали розчин натрію гіалуронату, перемішували протягом 10-15 хв., вимірювали рН розчину, який повинен був дорівнювати 7,2-7,4. При необхідності проводили коригування 0,1 М розчином натрію гідроксиду. Доводили об'єм водою для ін'єкцій до 500 мл. Дані проведеного експерименту наведено в таблиці 3.10.

Паралельно відпрацьовували технологічні параметри, в тому числі температурний і часовий режими, тривалість і швидкість перемішування тощо. Проведено порівняння результатів якісного і кількісного аналізу розчинів, отриманих за двома способами.

Приготування розчину «Хіаларікс» іншим способом

Компонентний склад розчину, г (мл)	Режим приготування		
	Температура, °С	Тривалість перемішування, хв.	Швидкість перемішування, об./хв.
Розчин 1: Вода для ін'єкцій Динатрію едетат Натрію метабісульфіт, ПВП К-17	(75-80)°С	10-15	100-200
Розчин 2: Розчин 1 + ДГК L-Аргінін	(70-75)°С	15-20	100-200
Розчин 3: Розчин 2 + Бурштинова кислота L-Аргінін Натрію гідроксид	(45-50)°С	15-20	100-200
Приготований розчин: Розчин 3 + Натрію гіалуронат (розчин) Вода для ін'єкцій до 500 мл	(30-40)°С	10-15	100-200

Примітка. n=5.

Серії препарату, одержані за двома способами, відповідали за показниками якості проекту МКЯ (табл. 3.11).

За результатами проведених досліджень обрано приготування розчину за другим способом в одній ємності (реакторі), встановлений чіткий порядок введення субстанцій в розчин, температурні режими та швидкість перемішування. Встановлено, що при приготуванні розчину за першим способом значно збільшується час приготування, кількість обладнання, тому нами рекомендований другий спосіб.\

Таблиця 3.11

Результати контролю розчину «Хіаларікс» приготованого за двома способами

Показники	Розчин приготований		Метод контролю
	спосіб I	спосіб II	
Опис (Прозора рідина жовтого кольору)	Прозора рідина жовтого кольору	Прозора рідина жовтого кольору	Візуальний
pH (6,5-7,5)	7,40	7,35	ДФУ 2.2.3
Прозорість (Має бути прозорим)	Прозорий	Прозорий	ДФУ 2.2.1
<i>Кількісний вміст, мг/мл:</i>			
Натрію гіалуронат (C ₁₄ H ₂₀ NNaO ₁₁)n від 9,0 мг до 10,0 мг в 1 мл препарату	9,98	9,98	ДФУ 2.2.25
ДГК (C ₁₅ H ₁₂ O ₇) від 4,75 мг до 5,25 мг в 1 мл препарату	5,15	5,13	ДФУ 2.2.25
Аргінін (C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂) від 11,25 мг до 13,75 мг в 1 мл препарату	12,56	12,56	ДФУ, 2.2.29
Натрію метабісульфіт від 1,44 мг до 1,76 в 1 мл препарату	1,62	1,63	ДФУ 2.2.29

Примітка. n=5.

Висновки до розділу 3

1. На основі вивчення фізико-хімічних і технологічних властивостей діючих і допоміжних речовин теоретично обґрунтований і експериментально

підтверджений раціональний склад комбінованого ін'єкційного препарату на основі натрію гіалуронату, ДГК, L-аргініну, кислоти бурштинової.

2. Вивчений механізм поведінки L-аргініну та кислоти бурштинової у водних розчинах, розрахований ступінь їх дисоціації у водних розчинах при різних значеннях рН середовища. На основі стехіометричних даних розраховані кількості вихідних компонентів.

3. Теоретично обґрунтований і підтверджений практично оптимальний інтервал рН розчину для створення солі L-аргініну натрію сукцинату у водному середовищі. Обрано і кількісно обґрунтовані допоміжні речовини для стабілізації розчину.

5. Для підвищення стабільності лікарських форм було досліджено декілька температурних режимів розчинення з підбором тривалості і швидкості перемішування при розчиненні, а також обрана послідовність введення інгредієнтів в розчин.

6. Розрахована теоретична осмолярність та визначена осмоляльність комбінованого ін'єкційного розчину.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Обґрунтування цільового профілю якості та оцінювання ризиків для розробки комбінованого препарату для ін'єкцій. *Вісник Фармації*. 2022. Том 103. № 1. С. 1–7.

2. Алмакаєва Л. Г., Семенова К. М. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій: патент на винахід 124473 Україна. № а 2019 08004; заявл. 12.07.2019; опубл. 22.09.2021, Бюл. № 38. 5 с.

3. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Мезотерапія. Розробка складу сучасного препарату для мезотерапії. *C91 Moderní aspekty vědy: XXVIII. Díl mezinárodní kolektivní monografie, Ceska Republika* 2023. С. 584-606.

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ «ХІАЛАРІКС»

4.1 Вивчення технологічних параметрів приготування розчину

Велике значення приділяється вивченню технологічних параметрів при приготуванні розчину для ін'єкцій. При розробці технології вивчали оптимальні технологічні параметри [123, 124]. До таких параметрів належить спосіб і порядок завантаження компонентів розчину, температура води для ін'єкцій, швидкість та час перемішування розчину. Метою цих досліджень було досягнення стабільності як хімічної, так і мікробіологічної. Хімічна стабільність розчину характеризується незмінністю його фізико-хімічних властивостей і обумовлена стійкістю діючих речовин. Мікробіологічна стабільність передбачає збереження стерильності препарату при зберіганні.

Температурний і часовий режими приготування та порядок введення компонентів у розчин, особливо для багатокomпонентних розчинів є важливими для його стабільності. Розчин для ін'єкцій «Хіаларікс» – це складна система діючих і допоміжних речовин. Всі речовини знаходяться в розчині у вигляді іонів, молекул, комплексних сполук, здатних до сольватації, дисоціації. Дані щодо технологічних параметрів приготування розчину наведено в розділі 3. Наступним етапом після одержання розчину є вибір фільтруючого матеріалу для фільтрації розчину.

4.2 Вибір оптимального фільтруючого матеріалу для комбінованого розчину «Хіаларікс»

Однією із вимог до ІЛФ є відсутність механічних включень, видимих неозброєним оком та невидимих згідно статей ДФУ 2.9.19 та 2.9.20 [111]. Для видалення таких часточок використовується метод фільтрації, що забезпечує

реалізацію таких важливих вимог, як відсутність механічних включень, стерильність і, частково, апірогенність.

Фільтри, які застосовують у виробництві парентеральних розчинів, мають відповідати наступним вимогам [125]:

- затримувати частки з фільтрованих рідин;
- від фільтра не повинні відокремлюватися в розчин механічні частки, виділятися токсичні та пірогенні речовини;
- частково затримувати мікроорганізми і витримувати теплову стерилізацію (для стерилізуючого фільтрування);
- не набухати при контакті з фільтрованими рідинами;
- не впливати на хімічний склад, величину рН та електричну провідність фільтрату;
- фільтри повинні мати невеликий гідравлічний опір і не змінювати істотно своїх характеристик при підвищенні різниці тисків до заданої максимальної величини. У межах цього діапазону вони не повинні бути чутливі до гідравлічних ударів.

Фармацевтичною промисловістю України використовуються фільтрувальні мембрани, що виготовляються з різних матеріалів, в основному, закордонними виробниками. Основні з них представлені в табл. 4.1.

Усі наведені типи фільтрів характеризуються гідрофільністю, високою хімічною стійкістю до дії середовища і низьким рівнем екстрактивних речовин, високою продуктивністю, надійно знижують контамінацію розчину механічними частками і мікроорганізмами заданого розміру.

У залежності від матеріалу фільтра вони мають дещо різні механічні властивості, різну сумісність з агресивними середовищами й органічними розчинниками. Наприклад, фільтри типу MF фірми «Міліпор» несумісні з кетонами, складними ефірами, сумішами спирту з ефіром, а мембрани типу «СНМ[®] МNY» хімічно стійкі до більшості основ [125].

Нейлонові «Pall» мембрани відрізняються високою міцністю й еластичністю. Це дозволяє зберегти їх цілісність при заряджанні

фільтрувальних установок. Фільтри з ацетату і нітрату целюлози («Міліпор») відносно ламкі і можуть бути ушкоджені при механічному навантаженні [125].

Таблиця 4.1

Фільтрувальні мембрани, що використовуються у виробництві ПЛФ

Тип мембрани, виробник	Матеріал фільтра	Розмір пор, мкм	Продуктивність, мл/хв/см ²	Робочий інтервал рН	Макс. температура стерилізації, °С
«MF-Millipore» (США)	суміш нітрату й ацетату целюлози	8,0-0,2	620-18	1-12	121
«Ultipor N 66» фірма «Pall» (Німеччина)	поліамід-на смола нейлон	1,2-0,2	40-10	3-10	125
«Prorog Res» фірма «Domnick Hanter» (Англія)	суміш ефірів целюлози поліефірс ульфон	3,0-0,2	300-22	1-10	121
		0,45-0,2	70-40		130
«СНМ [®] МNY» фірма «СНМЛАВ GROUP» (Іспанія)	нейлон	0,1-10	14-28	4-8	140
ФТВП «Укрфільтр» (Україна)	ультра-тонкі поліпропіленові волокна	1,0-0,3	600-250*	3-10	120

Примітка. * – л/год (патрон).

Вивчення літературних даних допомагає правильно орієнтуватися в різноманітті мембранних фільтрів, які використовуються у виробництві потенційних ЛЗ, але не може слугувати достатньою підставою для вибору фільтра при розробці нових препаратів. У кожному конкретному випадку

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Кількісний вміст натрію гіалуронату 9,0 мг до 10,0 мг/мл</i>									
Результат	9,99	9,98	9,98	9,99	9,99	9,98	9,99	9,98	9,98
<i>Кількісний вміст аргініну 11,25 мг до 13,75 мг/мл</i>									
Результат	12,50	12,49	12,50	12,50	12,49	12,50	12,50	12,50	12,50
<i>Кількісний вміст дигідрокверцетину 4,75 мг до 5,25 мг/мл</i>									
Результат	5,15	5,15	5,14	5,15	5,15	5,14	5,15	5,15	5,13
<i>Кількісний вміст метабісульфіту натрію 1,44 мг до 1,76 мг/мл</i>									
Результат	1,62	1,63	1,62	1,62	1,63	1,62	1,62	1,62	1,62

Примітки:

1. Кількість серій дослідження n=5;
2. * - результат вивчення прозорості – прозорий;
3. ** - результат вивчення кольоровості – відповідає;
4. *** - результат вивчення частки фільтру, що відшарувалися – прозорий.

З даних таблиці 4.2 видно, що при контакті всіх досліджуваних фільтруючих мембран з розчином «Хіаларікс» протягом 3 діб істотної зміни в показниках якості розчинів не спостерігалось.

Отримані дані дозволили зробити висновок про сумісність розчину «Хіаларікс» з досліджуваними фільтруючими матеріалами. Крім того, матеріал цих типів фільтрів за робочим діапазоном рН відповідає досліджуваному розчиню і витримує термічну стерилізацію.

4.3 Дослідження впливу первинного пакування на показники якості розчину «Хіаларікс»

Скло первинного пакування не індиферентне до розчинів, інгредієнти яких можуть взаємодіяти зі склом, викликаючи руйнування останнього і перехід його складових частин у рідку фазу. Деструкція внутрішнього шару

скла може також викликати утворення механічних включень, відсутність яких суворо регламентується для парентеральних розчинів [125, 126].

Нами були проведені дослідження стабільності розчинів «Хіаларікс» для ін'єкцій, поміщених у відповідне первинне пакування, що використовується фармацевтичними фірмами України.

Залежність показників якості розчину «Хіаларікс» вивчалася на зразках препарату, поміщених в ампули скляні марки скла УСП-1, Полтавського заводу медичного скла, полімерних ампулах з поліетилену Purell PE 3020D, скляних шприцах BD Нурак SCF™ PRTC glass фірми «Бектон Діккенсон», США, закладених на зберігання при нормальних умовах. Результати досліджень представлені в таблиці 4.3.

Результати, наведені в табл. 4.3 вказують на те, що всі використані матеріали придатні для первинного пакування для розчину «Хіаларікс». Обидва види скла та поліетиленове пакування не викликали погіршення фізико-хімічних показників розчину, регламентованих МКЯ.

При пакуванні потенційного ЛЗ у полімерне пакування проводили дослідження стабільності гравіметричним методом шляхом зберігання розчину в поліетиленових ампулах місткістю 2 мл при температурі 25 °С протягом 2 років.

Зміну концентрації розчину, пов'язану із втратою розчинника в процесі зберігання за рахунок проникності через матеріал упаковки розраховували за наступними формулами. Теоретична допустима втрата розчинника визначалася за формулою 4.1:

$$\Delta g = P_0 \times (1 - C_1/C_2), \quad (4.1)$$

де Δg - допустима втрата розчинника, г;

P_0 - середнє наповнення ампул розчином, що дорівнює 2,15 мл;

C_1 - номінальна концентрація розчину, 10,6 % (загальна концентрація);

C_2 - найбільша допустима концентрація розчину, 11,2 %;

$$\Delta g = 2,15 \times (1 - 10,6/11,2) = 0,113 \text{ г}$$

Залежність показників якості розчину «Хіаларикс» в різному виді пакування

Найменування показників	Показники якості		
	скло шприц ВД НУРАК	Полімерні ампули Purell PE 3020D	скло УСП-1
Прозорість: вихідні дані/2 роки	прозорий	прозорий	прозорий
Кольоровість: вихідні дані/2 роки	жовтий	жовтий	жовтий
рН розчину (6,5-7,5): вихідні дані	7,33	7,33	7,33
1 рік	7,35	7,32	7,34
2 роки	7,35	7,32	7,34
Механічні включення: вихідні дані	відсутність	відсутність	відсутність
1 рік	відсутність	відсутність	відсутність
2 роки	одичні	відсутність	відсутність
Кількісний вміст: вихідні дані/2 роки	відповідає МКЯ	відповідає МКЯ	відповідає МКЯ

Примітка. n=5.

Зміна концентрації розчину, пов'язана з втратою розчинника в процесі зберігання за рахунок проникності його через матеріал упаковки розраховували за формулою 4.2:

$$C_2 = P_0 \times C_1 / (P_0 - \Delta g), \quad (4.2)$$

де C_2 - концентрація розчину в кінці зберігання, %;

C_1 - концентрація розчину перед закладкою на збереження, %;

P_0 - початкова кількість розчину в пакуванні, г;

Δg - втрата розчинника за рахунок проникності, г.

$$C_2=4,12 \times 10,6 / (4,12 - 0,116) = 10,9\%$$

Дані проведених досліджень вказані в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

Зміна концентрації розчину «Хіларікс» в результаті зберігання в поліетиленових ампулах

Средня початкова концентрація розчину	Температура зберігання °С	Час зберігання, роки	Середня маса розчину, г	Втрата маси розчину, Δ g, г	Кінцева концентрація розчину, %	
					теоретична	практична
10,6	25	2	4,120	0,113	11,00	10,90

Визначено, що втрата в масі розчину «Хіларікс» в поліетиленових ампулах протягом 2 років зберігання при температурі 25 °С становить не більше 10 %.

Проведений контроль розчину «Хіларікс» у поліетиленових ампулах після закінчення регламентованого терміну зберігання препарату показав, що за фізико-хімічними характеристиками розчин відповідає всім показникам нормативної документації. Отже можна рекомендувати всі три види дослідженого пакування.

4.4 Дослідження і вибір режиму стерилізації розчину «Хіларікс»

Переважним способом стерилізації, згідно ДФУ, є стерилізація насиченою парою під тиском, особливо при стерилізації готових ін'єкційних ЛЗ у вигляді водних розчинів, до яких і відноситься комбінований розчин «Хіларікс» для ін'єкцій. Стандартні умови при такому способі стерилізації наступні: температура 121 °С, час – 15 хв.

Згідно ДФУ допускається використання інших співвідношень часу і температури, якщо обраний режим при рутинному використанні забезпечує необхідний і відтворюваний рівень летальності мікроорганізмів в рамках

встановлених допусків [111].

Тому, з метою забезпечення стерильності комбінованого ін'єкційного розчину «Хіаларікс» були проведені дослідження таких режимів стерилізації в різному пакуванні (ампули скло, ампули поліетиленові, шприц скло):

- 121°C – 15 хв (режим, що рекомендується ДФУ);
- 121°C – 8 хв.

Придатність способу стерилізації визначали за фізико-хімічними показниками (кольоровість, прозорість, рН розчину, кількісний вміст компонентів розчину). Результати досліджень представлені в таблиці 4.5

Таблиця 4.5

**Дослідження придатності режиму стерилізації комбінованого розчину
«Хіаларікс» для ін'єкцій в ампулах зі скла**

Показники якості розчину	Режим стерилізації			
	121°C – 15 хв		121°C – 8 хв	
	до стерилізації	після стерилізації	до стерилізації	після стерилізації
Прозорість (ДФУ, 2.2.1)	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий
Кольоровість (ДФУ, 2.2.2)	жовтий	жовтий	жовтий	жовтий
рН (6,5-7,5)	7,43	7,47	7,35	7,36
<i>Кількісний вміст, мг/мл:</i>				
Натрію гіалуронат (9,9 мг до 12,1)	10,25	10,24	10,25	10,25
Аргінін (11,25 – 13,75)	12,49	12,47	12,49	12,49
ДГК (4,75– 5,25)	5,15	4,84	5,15	5,14
Стерильність	-	стерильний	-	стерильний

Примітка. n=5.

Аналогічні результати були отримані при стерилізації розчину «Хіаларікс» в переднаповнених шприцах.

Дані таблиці 4.5 показують, що кількість ДГК в розчині та рН при стерилізації в режимі 121°C – 15 хв знаходиться на нижній межі регламентації, тому краще рекомендувати режим стерилізації 121°C – 8 хв. Даний режим забезпечує стерильність препарату.

4.5 Технологічний процес одержання комбінованого лікарського засобу «Хіаларікс» розчин для ін'єкцій

В реактор з паровою оболонкою на 50 л заливали воду для ін'єкцій та охолоджували до температури 20-25 °С, завантажували розраховану кількість натрію гіалуронату, перемішували протягом 20-30 хв. Розчин залишали в реакторі до приготування основного розчину.

Приготування комбінованого розчину для ін'єкцій «Хіаларікс» проводили в реакторі з нержавіючої сталі на 200 л, забезпеченому мішалкою і паровою оболонкою для підігріву і охолодження вмісту реактора. У реактор завантажували воду для ін'єкцій з водопідготовки при температурі (85±5) °С. Відважування сировини здійснювали на вагах в промарковані контейнери. В реактор завантажували розраховану кількість натрію метабісульфіту та динатрію едетату, перемішували до повного розчинення (10-15) хв, потім додавали ПВП К-17, перемішували до повного розчинення, далі додавали ДГК та L-аргінін (температура розчину (70-75 °С), перемішували протягом 15-20 хв. до повного розчинення компонентів та отримання жовтого прозорого розчину. Далі до розчину додавали розраховану кількість L-аргініну та бурштинової кислоти, натрію гідроксиду для одержання солі L-аргініну натрію сукцинату при температурі 45-50 °С, перемішували 15-20 хв.

З окремого реактора з приготованим розчином натрію гіалуронату, розчин переміщали в реактор з основним розчином, перемішували 10-15 хв. Вимірювали рН розчину (повинен дорівнювати 7,2-7,4). При необхідності

проводили коригування 0,1 М розчином натрію гідроксиду. Доводили об'єм водою для ін'єкцій до 200 л.

Проводили поетапний контроль якості розчину «Хіаларікс» за показниками: зовнішній вигляд, рН, кількісний вміст ДГК, аргініну, натрію гіалуронату. Після проведення поетапного контролю передавали на фільтрацію на систему фільтрації, попередньо перевірену на герметичність.

Приготований розчин з реактора переміщали до установки фільтрації на фільтр, який містив фільтруючі матеріали з розміром пор 0,8 мкм і 0,45 мкм і далі в збірник фільтрованого розчину. Фільтрацію розчину проводили під тиском стислого повітря 0,10-0,12 МПа.

Через 15-20 хв. після початку фільтрації проводили визначення якості фільтрованого розчину візуально в світлі електролампи потужністю 60 Вт на чорно-білому фоні протягом 10-15 с. У розчині не повинно бути видимих механічних включень.

Далі розчин із збірника фільтрованого розчину переміщали на етап наповнення і запаювання ампул.

Наповнення ампул розчином і їх запаювання здійснювали на автоматі для наповнення і запаювання шприцевих ампул. В процесі виробництва розчину використовували ампули місткістю 2 мл, миття яких проводили на установці для шприцевого миття ампул, сушку і стерилізацію – у стерилізаційному тунелі.

Перед початком роботи здійснювали налаштування і регулювання автомата для наповнення. Перевіряли дозу наповнення об'ємним методом за допомогою калібрувального шприца.

Ампули, просуваючись по транспортерній стрічці надходили на утримувачі ампул у вузол наповнення. Дозуючі насоси наповнювали ампули розчином дозою 2,15 мл. Після наповнення розчином ампули запаювали. Проводили контроль якості запаювання.

Ампули з розчином після наповнення і запаювання поступали в стерилізатор паровий на стерилізацію при температурі 121 °С, тиску 0,11 МПа

протягом 8 хв.

Після закінчення стерилізації проводили перевірку ампул на герметичність в стерилізаторі за допомогою 0,025 % розчину метиленового синього. Розчин у негерметичних ампулах забарвлювався. Ампули кольору контрольної рідини відбраковували. Відбирали ампули для контролю за показниками: стерильність, бактеріальні ендотоксини.

Після отримання позитивних результатів контролю ампули з розчином «Хіаларікс» для ін'єкцій перед переглядом промивали в теплій воді очищеній.

Потім проводили первинний – внутрішньоцеховий суцільний контроль (100 % ампул з розчином) на механічні включення і інші види браку. Відбраковували ампули з механічними включеннями, неповним дозуванням, негерметично запаяні.

Ампули, що пройшли контроль на механічні включення і інші види браку в касетах, передавали на стадії маркування та пакування.

Маркування ампул здійснювали на машині для нанесення етикеток на ампули згідно оригіналу макету, наведеному в МКЯ. Маркування та пакування здійснювали суворо за серіями. Пакування ампул з розчином «Хіаларікс» здійснювали в блістери по 5 шт. По 2 блістера вкладали у пачки разом з інструкцією для медичного застосування. Пачки упаковували в стопку папером обгортковим вручну або в термоусадочну полімерну плівку на машині пакувальній.

Після отримання позитивних результатів аналізу на відповідність препарату вимогам МКЯ його відправляли на склад.

Проведені випробування технології препарату в заводських умовах на підприємстві ТОВ «Юрія-фарм» дозволили розробити та стандартизувати її в промисловому регламенті на виробництво комбінованого розчину для ін'єкцій.

Розроблена технологічна блок-схема технологічного процесу виробництва комбінованого ін'єкційного розчину «Хіаларікс» в скляних амулах представлена на рис. 4.1.

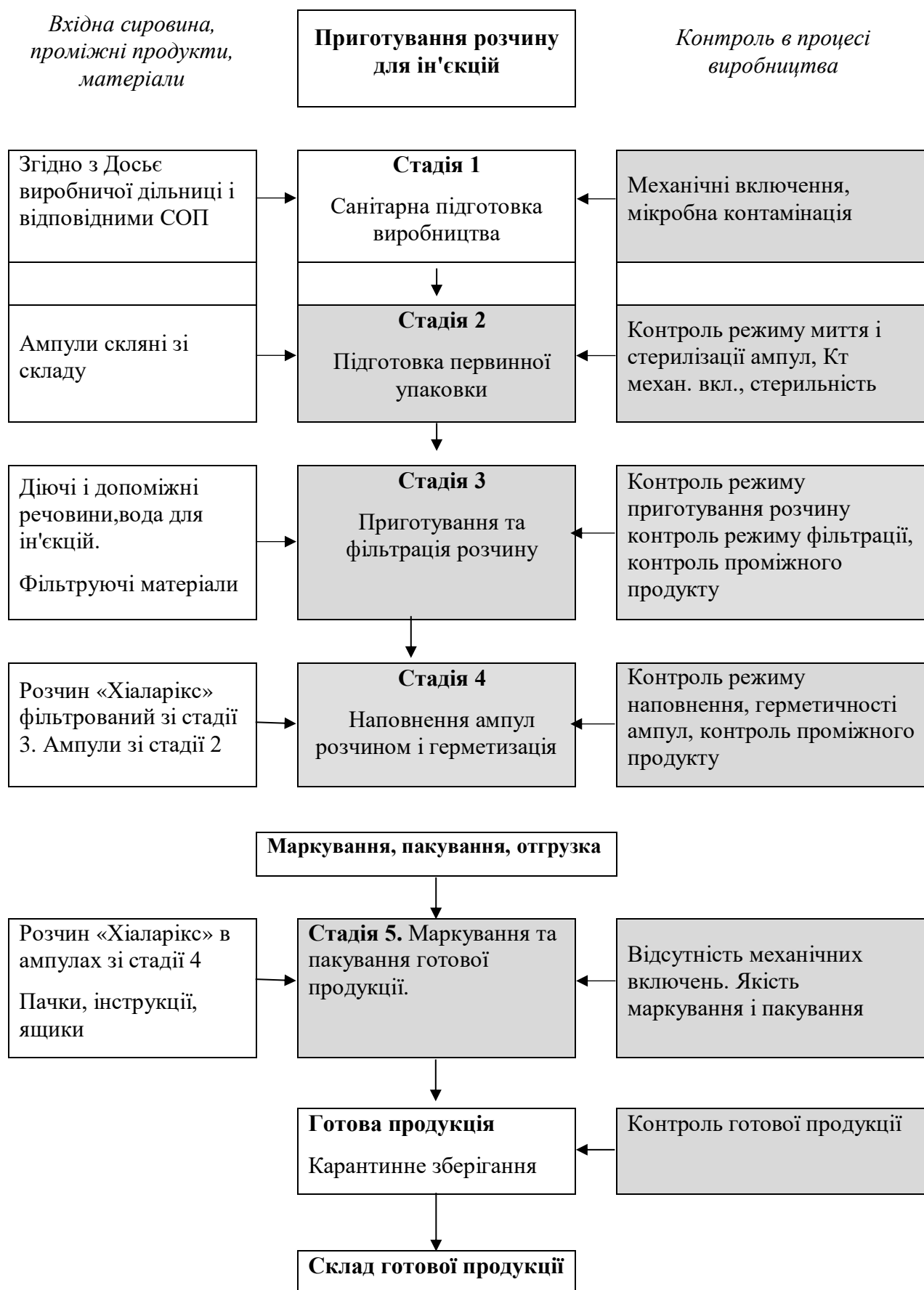


Рис. 4.1 Блок-схема технологічного процесу виробництва препарату «Хіаларікс», розчин для ін'єкцій по 2 мл в ампулах

4.6 Валідація процесу та/або його оцінка

Валідацію виробництва препарату «Хіаларікс», розчин для ін'єкцій по 2 мл в ампулах проводили на трьох стандартних промислових серіях продукту [126].

Валідація процесу включає тестування технологічного процесу трьох серій препарату, які випускаються підряд.

Оцінка процесу проводиться на відповідність таким критеріям прийнятності:

- відповідність параметрам технологічного процесу, зазначеним у регламенті виробництва;
- відповідність показникам якості, зазначеним в МКЯ;
- придатність процесу забезпечувати ефективно і відтворюване виробництво ЛЗ.

З метою валідації для кожної серії ЛЗ стадії і операції технологічного процесу проводяться при різних параметри процесу, з урахуванням технологічних допусків, тобто мінімальне, середнє і максимальне значення параметра технологічного процесу.

Відбір проб для проведення валідаційних випробувань проводиться з урахуванням кожного значення параметра процесу (мінімальне, середнє і максимальне значення параметра технологічного процесу) з метою подальшого аналізу результатів та їх оцінки.

Випробування в рамках валідації, за можливістю, проводяться на різному аналітичному обладнанні, різними виконавцями. Результати проведення випробувань реєструються в протоколах виробництва та протоколах контролю та валідаційних протоколах.

На підставі отриманих результатів проводиться оцінка правильності дії персоналу (відповідно до вимог СОП), розглядається правильність та адекватність методик по здійсненню операцій технологічного процесу (відповідність можливостям і призначенню обладнання), можливість

(здатність) персоналу забезпечити виконання (дотримання) операцій техпроцесу. Розглядається правильність ведення технологічного процесу (забезпечення якості продукції під час виконання всіх параметрів техпроцесу). Розраховуються індекси відтворюваності, що дозволяють оцінити ступінь надійності технологічного процесу.

Процес виробництва під час валідації процесу не відрізняється від звичайного стандартного виробничого процесу. Під час валідації процесу контрольовані параметри реєструватимуться у валідаційних протоколах.

Критичні етапи валідації включають:

- санітарну підготовку виробництва;
- приготування і фільтрація розчину;
- наповнення ампул розчином і герметизацію;
- стерилізацію ампул з розчином;
- маркування та пакування готової продукції;
- контроль критичних точок технологічного процесу виробництва.

Критичні точки проведення процесу валідації представлені в табл. 4.6.

Таблиця 4.6.

Критичні точки проведення процесу валідації

Вплив на якість готової продукції	Можлива причина	Метод контролю
1	2	3
<i>Стадія 1: Санітарна підготовка виробництва</i>		
Невідповідність готової продукції показникам МКЯ	Контамінація приміщень, обладнання, персоналу, наявність механічних часток в повітрі робочої зони	Мікробіологічний, фізичний (за допомогою лічильника аерозольних і механічних часток)

1	2	3
<i>Стадія 2: Приготування і фільтрація розчину</i>		
Невідповідність готової продукції показникам МКЯ	Неточність зважування сировини, не доведений об'єм розчину до необхідного, порушення цілісності фільтруючого матеріалу	Фізичний (ваговий, об'ємний); кількісне визначення. Визначення рН розчину. Перевірка герметичності фільтру: тест «точки бульбашки»
<i>Стадія 3: Наповнення ампул розчином і герметизація</i>		
Невідповідність готової продукції показникам МКЯ	Невідповідність об'єму наповнення, неякісне запаювання та негерметичність ампул	Об'ємний, візуальний
<i>Стадія 4: Стерилізація ампул з розчином</i>		
Невідповідність готової продукції показникам МКЯ	Продукт нестерильний, рівень бактеріальних ендотоксинів перевищує межу	Мікробіологічний, біологічний
<i>Стадія 5: Маркування та пакування готової продукції</i>		
Невідповідність готової продукції показникам МКЯ	Невідповідність маркування ампул і пачок. Некомплектність упаковки	Візуальний

Висновки до розділу 4

1. Досліджені та обґрунтовані основні критичні точки та параметри технологічного процесу одержання комбінованого ін'єкційного розчину «Хіаларікс».

2. Проведені дослідження з вивчення первинного пакування. Встановлено, що скляні ампули та шприци, а також поліетиленові ампули придатні для первинного пакування розчину «Хіаларікс».

3. Вивчений вплив фільтруючого матеріалу на показники якості ЛЗ «Хіаларікс» у вигляді розчину для ін'єкцій. Обрані оптимальні типи фільтруючих мембран.

4. На підставі проведених досліджень обрано оптимальний режим стерилізації комбінованого розчину для ін'єкцій.

5. На підставі проведених досліджень визначені критичні параметри і характеристики технологічного процесу виробництва ЛЗ у вигляді комбінованого розчину для ін'єкцій, розроблена технологічна блок-схема виробництва.

Результати експериментальних досліджень розділу наведено в таких публікаціях:

1. Семенова К. М., Алмакаєв М. С. Розробка складу та технології комбінованого ін'єкційного розчину для мезотерапії. *Фармацевтичний часопис*. 2022. №4. С.13–20.

2. Алмакаєва Л. Г., Семенова К. М. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій: патент на винахід 124473 Україна. № a201908004; заявл. 12.07.2019; опубл. 22.09.2021, Бюл. № 38. 5 с.

3. Алмакаєва Л. Г., Семенова К. М. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій: патент на кор. модель 1349923 Україна. № u201908006; заявл. 12.07.2019; опубл. 27.01.2020, Бюл. № 2. 5 с.

РОЗДІЛ 5

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ ДІЇ ТА НЕШКІДЛИВОСТІ КОМБІНОВАНОГО ІН'ЄКЦІЙНОГО ПРЕПАРАТУ «ХІАЛАРІКС»

Важливим етапом створення нового лікарського препарату є його стандартизація – вибір основних показників і критеріїв оцінки якості, розробка методик проведення аналізу.

5.1 Обґрунтування критеріїв і методів контролю якості комбінованого препарату

У результаті аналізу й оцінки необхідності і достатності показників якості розробленого препарату в МКЯ, згідно вимог ДФУ, необхідно включити наступні показники: опис, ідентифікація, прозорість, рН, стерильність, бактеріальні ендотоксини, механічні включення.

Специфікація і аналітичні методики розроблені відповідно з вимогами загальної статті ДФУ «Лікарські засоби для парентерального застосування» [111].

Ідентифікацію флавоноїду ДГК проводять методом абсорбційної спектрофотометрії, аргініну – методом високоефективної рідинної хроматографії, а також специфічну реакцію на натрію гіалуронат. Окрім того, до аналітичних методик включені розділи, які регламентують вимоги до упаковки, графічного оформлення упаковки, умов зберігання та терміну придатності препарату.

В розділі «Опис» регламентовані вимоги щодо зовнішнього вигляду препарату.

Препарат – прозора рідину жовтого кольору. Опис препарату відповідає його фізичному стану – розчину.

Ідентифікацію діючої речовини – ДГК проводили методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій області (ДФУ 2.2.25). Визначення проводили одночасно з визначенням кількісного вмісту ДГК в

препараті. Специфічність випробовування підтверджували тим, що УФ-спектр поглинання досліджуваного розчину, одержаного при кількісному визначенні ДГК в діапазоні від 210 нм до 430 нм відповідає УФ-спектру розчину порівняння і має максимуми поглинання за довжини хвиль 256 нм та 375 нм.

Ідентифікацію натрію гіалуронату проводили за допомогою якісних реакцій.

Перша ідентифікація заснована на гідролізі натрію гіалуронату з концентрованою сірчаною кислотою до моноцукрів (глюкуронової кислоти та N-ацетилгалактозаміну), та подальшою кольоровою реакцією залишків глюкуронової кислоти з карбазолом з утворенням забарвленого комплексу від червоного до червоно-фіолетового кольору.

Друга ідентифікація натрію гіалуронату базується на реакції його осадження при додаванні 5 % розчину цетилпіридинію хлориду: повинно спостерігатися утворення білого осаду, що розчиняється при додаванні 10 % розчину натрію хлориду. Ідентифікацію аргініну проводили методом рідинної хроматографії (ДФУ 2.2.29) [111].

Дослідження проводили одночасно з визначенням кількісного вмісту аргініну в препараті. При цьому час утримання основного піку аргініну на хроматограмах досліджуваного розчину, отриманого при кількісному визначенні аргініну, мав співпадати з часом утримування цього піку на хроматограмі розчину порівняння.

На рис. 5.1-5.2 наведено хроматограми досліджуваного розчину та розчину порівняння при проведенні кількісного визначення аргініну.

З наведених хроматограм випливає, що методика визначення ідентифікації аргініну в препараті «Хіаларікс» розчин для ін'єкцій методом високоефективної рідинної хроматографії є специфічною. Специфічність випробовування підтверджується тим, що час утримування піка аргініну на хроматограмі досліджуваного розчину співпадає з великою точністю (близько 0,06%) з часом утримування піка аргініну на хроматограмі розчину порівняння.

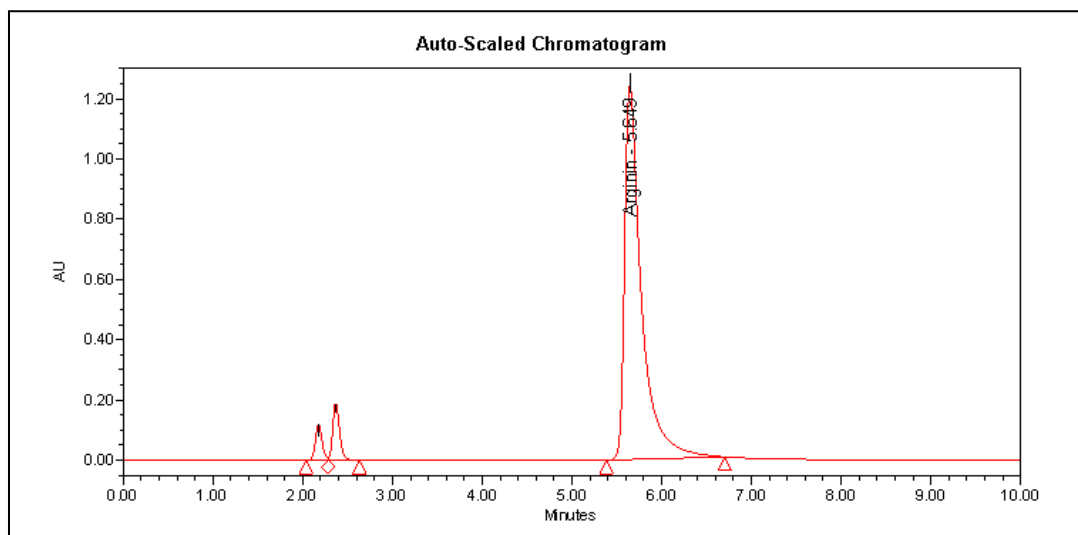


Рис. 5.1 Хроматограма досліджуваного розчину для тесту «Кількісне визначення. Аргінін»

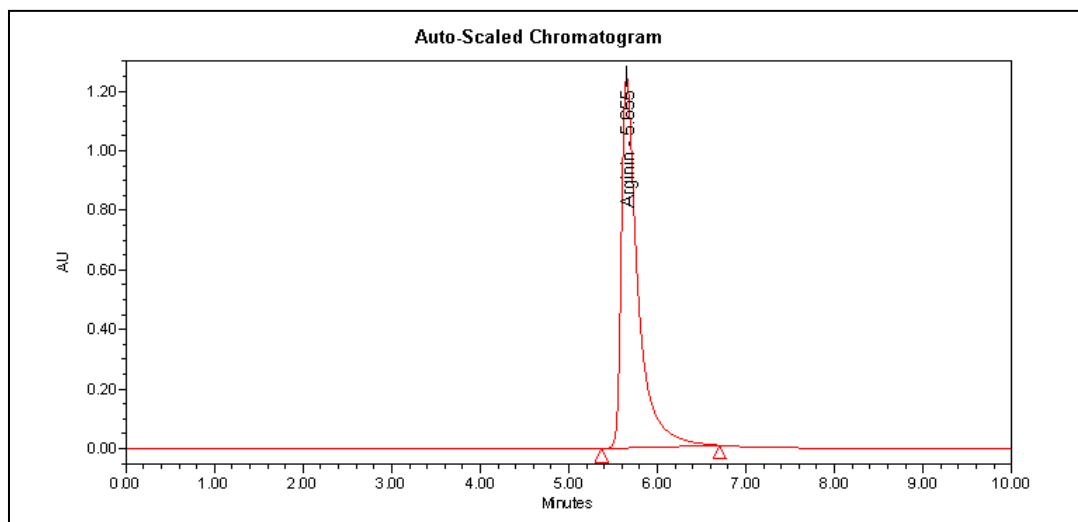


Рис. 5.2 Хроматограма розчину порівняння для тесту «Кількісне визначення. Аргінін»

Специфічність і селективність тесту також підтверджується тим, що ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піками аргініну (близько 3100 теоретичних тарілок) відповідає критерію прийнятності (не менше 1000 теоретичних тарілок); коефіцієнт симетрії піка аргініну (1,8) відповідає критерію прийнятності (не більше 1,8); обрані умови хроматографування дозволяють відокремити піки аргініну від інших допоміжних речовин («плацебо»), які входять до складу препарату.

Визначення прозорості проводили відповідно до ДФУ 2.2.1. На підставі експериментальних даних в специфікацію введена вимога: препарат має бути прозорим. Цим вимогам відповідають всі досліджувані зразки препарату.

Кольоровість розчину визначали відповідно ДФУ 2.2.2, оскільки розчин має інтенсивне жовте забарвлення, то визначення за еталоном – неможливе. Всі досліджувані зразки препарату мали жовте забарвлення.

Величину рН визначали потенціометрично (ДФУ 2.2.3). На підставі експериментальних даних в препараті встановлені межі рН від 6,5 до 7,5.

В ін'єкційному препараті обов'язковим є контроль на механічні включення. Контролюють видимі і невидимі частки. Препарат має бути прозорим і практично вільним від часток, таким чином дотримуватися вимоги на видимі механічні включення відповідно до ДФУ 2.9.20. Випробування на невидимі частки проводили методом світлоблокування відповідно до вимог ДФУ 2.9.19, метод І. Встановлено такі межі: середня кількість частини розміром ≥ 10 мкм не більше 6000 в контейнері, розміром ≥ 25 мкм не більше 600 в контейнері.

Об'єм розчину в ампулі має бути достатнім для гарантованого витягання номінального об'єму. Тому для парентеральних розчинів обов'язковим є контроль об'єму, що витягається. Визначення проводять відповідно до вимог ДФУ 2.9.17.

Препарат має бути стерильним. Випробування і перевірку придатності методики на стерильність проводили методом мембранної фільтрації відповідно до вимог ДФУ 2.6.1. Дослідження проводили на базі ТОВ «Науковий Центр розробок і впроваджень» під керівництвом к.фарм. наук Жемерової К.Г. Випробування проводили методом мембранної фільтрації на приладі «Steritest», використовуючи каністри «SteritestEZ», виробництва фірми «Millipore» або інші, з аналогічними характеристиками.

Вміст кожного із 20 контейнерів фільтрували крізь два мембранних фільтри одного комплекту каністр. Після закінчення фільтрації кожний мембранний фільтр відмивали стерильним розчином натрію хлориду 9 г/л

однією порцією близько 100 мл і вносили в одну каністру 100 мл тіогліколевого поживного середовища, в іншу каністру вносили 100 мл соєвого-казеїнового поживного середовища.

Бактеріальні ендотоксини. Випробування проводили відповідно до вимог ДФУ 2.6.14. Випробування на бактеріальні ендотоксини проводили методом гелі-тромб тесту (граничний тест, метод А).

Граничний вміст ендотоксинів — менше 62,5 МО/мл. Максимально допустиме розведення препарату — 1:920 при використанні розчину лізату з чутливістю 0,06 (25) МО/мл.

5.2 Кількісне визначення діючих речовин

5.2.1 Визначення кількісного вмісту дигідрокверцетину

Дигідрокверцетин. Визначення кількісного вмісту ДГК запропоновано проводити методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій області спектру (ДФУ 2.2.25) при довжині хвилі 275 нм (рис. 5.3).

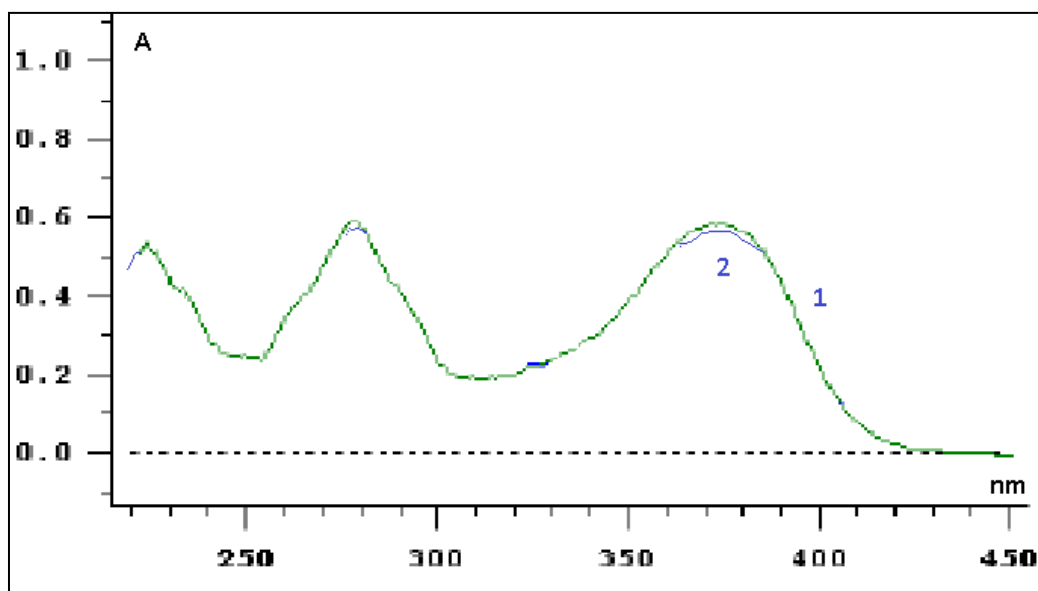


Рис. 5.3. Спектр поглинання досліджуваного розчину (1) та розчину порівняння (2) для тесту «Кількісне визначення. ДГК»

Специфічність методики підтверджена тим, що вклад «плацебо» в сумарну величину фонового поглинання є незначним і допоміжні речовини не заважають кількісному визначенню ДГК в препараті:

$\frac{A_{\text{плацебо}}}{A_{\text{мод.р}}} \cdot 100\% = 0,32\% \leq 0,51\%$. Результати досліджень кількісного визначення

ДГК під час вивчення стабільності (див. Розділ 5.3) свідчать, що вони відповідають встановленим критеріям прийнятності, як на момент випуску, так і протягом терміну придатності.

З урахуванням вимог ДФУ були встановлені наступні межі вмісту діючої речовини: вміст ДГК ($C_{15}H_{12}O_7$) в 1 мл препарату має бути: на момент випуску: від 4,75 мг до 5,25 мг (тобто, $5 \text{ мг} \pm 5\%$) в 1 мл препарату; протягом терміну придатності: від 4,5 мг до 5,5 мг (тобто, $5 \text{ мг} \pm 10\%$) в 1 мл препарату.

Були проведені дослідження з валідації методики кількісного визначення ДГК відповідно до документу CPMP/ICH/381/95 (ICH Topic Q 2 (R1)) «Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology» і загального тексту «Валідація аналітичних методик і випробувань» ДФУ 2. Показано, що методика кількісного визначення ДГК методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій області спектру є коректною і відповідає критеріям прийнятності, що висуваються до валідаційних характеристик: специфічність, правильність, збіжність (прецизійність), лінійність, діапазон застосування.

Крім того, була розрахована повна невизначеність методики кількісного визначення ДГК. На підставі розрахунку прогнозованої повної невизначеності результатів аналізу підтверджена коректність результатів для тесту «Кількісне визначення. ДГК» для допусків вмісту $\pm 5\%$ ($\Delta A_s \leq 1,6\%$) в комбінованому препараті «Хіаларікс» у формі розчину для ін'єкцій методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій області спектру. Отримане значення повної прогнозованої невизначеностей результатів $\Delta_{AS, \%} = 1,22\%$ для тесту «Кількісне визначення. ДГК» для ДГК не перевищує критичне значення $\Delta_{Asmax} = 1,6\%$ ($B=5\%$). На підставі розрахунку повної невизначеності методики кількісного визначення ДГК показано, що методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Методика характеризується достатньою збіжністю, так як знайдене

значення відносного довірчого інтервалу величини для ДГК (0,64%) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6%) (табл. 5.1).

Таблиця 5.1.

Результати аналізу модельних розчинів дигідрокверцетину і їх статистична обробка

№	Введено в % від номінального вмісту (X_i , факт., %)	Знайдено в % від номінального вмісту (Y_i , %)	Знайдено в % від введеного $Z_i = 100 * (Y_i/X_i)$
1	81,88	81,96	100,10
2	86,26	85,99	99,69
3	91,38	91,51	100,14
4	96,34	96,48	100,29
5	102,02	101,72	99,71
6	106,33	106,00	99,67
7	111,96	111,54	99,62
8	116,44	115,43	99,13
9	121,92	121,59	99,73
Середнє, Z_{cp} , % =			99,79
Відносне стандартне відхилення, s_z , % =			0,35
Відносний довірчий інтервал Δ , % = $t(95\%, 8) \times s_z = 1,8595 \times s_z =$			0,64
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As} % =			1,6
Систематична похибка $\delta = Z_{cp} - 100 =$			0,21
Критерій незначимості систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta / 3 = 0,64 / 3 = 0,21 \leq 0,21$			виконується
2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,51 > 0,21$			виконується
Загальний висновок про методику			Коректна

Методика характеризується достатньою точністю, так як виконується

критерій практичної незначущості систематичної помилки методики. Систематична похибка методики становить 0,21% для ДГК, що відповідає критерію статистичної і практичної незначущості систематичної похибки методики:

- 1) статистична незначимість: $0,64\% : 3 = 0,21\% > 0,21\%$;
- 2) практична незначимість: $0,32 \times 1,6\% = 0,51\% > 0,21\%$.

Високі значення коефіцієнтів кореляції ($r=0,99967$) задовольняють вимогам критерію прийнятності ($r=0,9981$) і підтверджують лінійність залежності між взятими і знайденими кількостями ДГК в області від 80% до 120% щодо його номінального вмісту в досліджуваному розчині (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

**Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої
концентрації дигідрокверцетину від його введеної концентрації**

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
b	0,9821			
S_b	0,00713			
a	1,56249	$\leq 1,8946 \times S_a =$ $ 1,3822 $	$\leq 2,6 $	відповідає за 2-им критерієм
S_a	0,73014			
RSD_0	0,27781			
RSD_0/b	0,2829	$\leq 0,84 $		відповідає
r	0,99981	$\geq 0,9981 $		відповідає

Виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності, а для ДГК за 2-м критерієм: $a = |1,56249| \leq 2,6$ (виконується). Виконуються вимоги до RSD_0/b : для дигідрокверцетину $RSD_0/b = 0,2829 \leq |0,84|$. Вимоги до параметрів лінійної залежності методики визначення діючої речовини виконуються у всьому діапазоні концентрацій від 80% до 120% від номінального значення.

На рис. 5.4 наведена лінійна залежність оптичної густини від концентрації дигідрокверцетину в нормалізованих координатах.

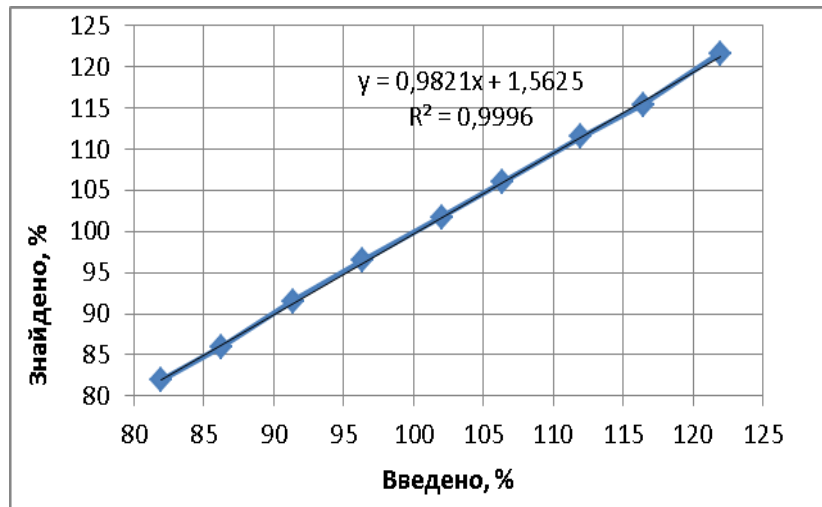


Рис. 5.4 Графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації дигідрокверцетину в нормалізованих координатах

Таким чином, методика кількісного визначення ДГК при проведенні тесту «Кількісне визначення. ДГК» в комбінованому препараті «Хіаларікс» у формі розчину для ін'єкцій методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій області спектру в діапазоні застосування відповідає критеріям прийнятності для валідаційних характеристик: специфічність, правильність, прецизійність (збіжність) і лінійність. Повна прогнозована невизначеності результатів аналізу ДГК не перевищує критичне значення.

5.2.2 Визначення кількісного вмісту натрію гіалуронату

Визначення кількісного вмісту натрію гіалуронату запропоновано проводити методом абсорбційної спектрофотометрії в видимій області спектру (ДФУ 2.2.25) при довжині хвилі 620 нм (рис. 5.5).

Специфічність методики підтверджена тим, що вклад «плацебо» в сумарну величину фонового поглинання є незначним і допоміжні речовини не заважають кількісному визначенню натрію гіалуронату в препараті:

$\frac{A_{\text{плацебо}}}{A_{\text{мод.р}}} \cdot 100\% = 0,21\% \leq 0,51\%$. Результати досліджень кількісного визначення

натрію гіалуронату під час вивчення стабільності (див. Розділ 5.3) свідчать, що вони відповідають встановленим критеріям прийнятності, як на момент випуску, так і протягом терміну придатності.

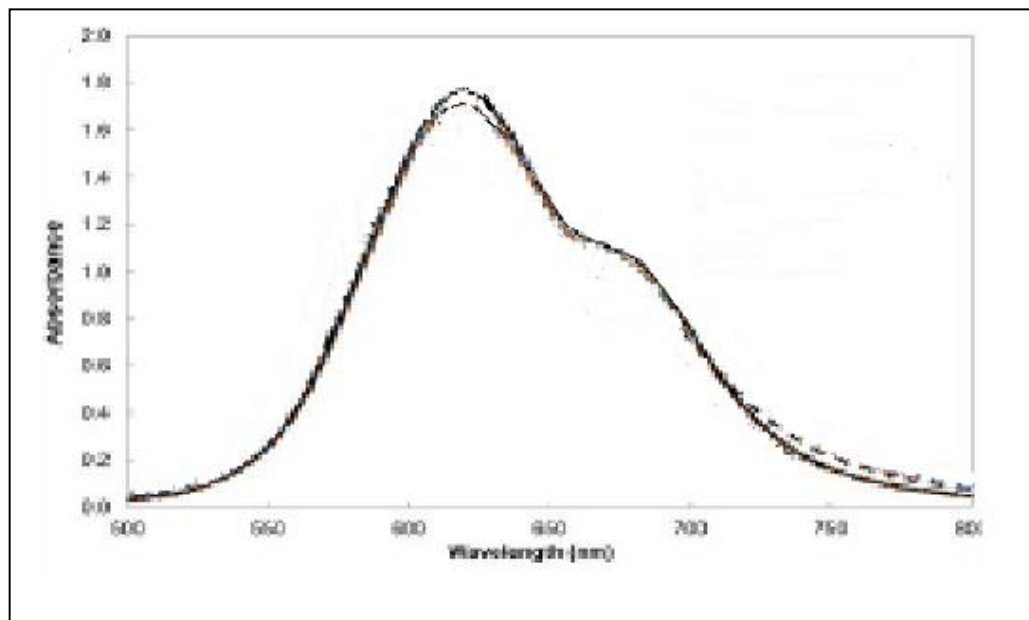


Рис. 5.5. Спектр поглинання досліджуваного розчину «Хіаларікс» і розчину порівняння для тесту «Кількісне визначення. Натрію гіалуронат»

З урахуванням вимог ДФУ були встановлені наступні межі вмісту натрію гіалуронату: $((C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n)$ в 1 мл препарату має бути: на момент випуску: від 10,45 мг до 11,55 мг (тобто, $11 \text{ мг} \pm 5\%$) в 1 мл препарату; протягом терміну придатності: від 9,9 мг до 12,1 мг (тобто, $11 \text{ мг} \pm 10\%$) в 1 мл препарату.

Були проведені дослідження з валідації методики кількісного визначення натрію гіалуронату відповідно до документу CPMP/ICH/381/95 (ICH Topic Q 2 (R1)) «Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology» і загального тексту «Валідація аналітичних методик і випробувань» ДФУ 2. Показано, що методика кількісного визначення натрію гіалуронату методом абсорбційної спектрофотометрії в видимій області спектру є коректною і відповідає критеріям прийнятності, що висуваються до валідаційних характеристик: специфічність, правильність, збіжність

(прецизійність), лінійність, діапазон застосування.

Крім того, була розрахована повна невизначеність методики кількісного визначення натрію гіалуронату. На підставі розрахунку прогнозованої повної невизначеності результатів аналізу підтверджена коректність результатів для тесту «Кількісне визначення. Натрію гіалуронат» для допусків вмісту $\pm 5\%$ ($\Delta A_s \leq 1,6\%$) в препараті «Хіаларікс» у формі розчину для ін'єкцій методом абсорбційної спектрофотометрії в видимій області спектру. Отримане значення повної прогнозованої невизначеностей результатів $\Delta_{AS, \%} = 1,48\%$ для тесту «Кількісне визначення. Натрію гіалуронат» для натрію гіалуронату не перевищує критичне значення $\Delta_{ASmax} = 1,6\%$ ($B=5\%$). На підставі розрахунку повної невизначеності методики кількісного визначення натрію гіалуронату показано, що методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Методика характеризується достатньою збіжністю, так як встановлене значення відносного довірчого інтервалу величини для натрію гіалуронату (0,33%) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6%) (табл. 5.3).

Методика характеризується достатньою точністю, оскільки виконується критерій практичної незначущості систематичної помилки методики. Систематична похибка методики складає 0,45% для натрію гіалуронату, що відповідає критерію практичної незначущості систематичної похибки методики:

- 1) статистична незначимість: $0,33\% : 3 = 0,11\% < 0,45\%$;
- 2) практична незначимість: $0,32 \times 1,6\% = 0,51\% > 0,45\%$.

Високі значення коефіцієнтів кореляції ($r=0,999287$) задовольняють вимогам критерію прийнятності ($r=0,9981$) і підтверджують лінійність залежності між взятими і знайденими кількостями натрію гіалуронату в області від 80 % до 120 % щодо його номінального вмісту в випробуваному розчині (табл. 5.4).

Таблиця 5.3

**Результати аналізу модельних розчинів натрію гіалуронату і їх
статистична обробка**

№	Введено в % від номінального вмісту (X_i , факт., %)	Знайдено в % від номінального вмісту (Y_i , %)	Знайдено в % від введеного $Z_i = 100 * (Y_i/X_i)$
1	79,98	79,53	99,44
2	85,23	84,60	99,26
3	89,95	89,40	99,39
4	94,57	93,94	99,33
5	100,58	101,15	100,57
6	105,03	104,08	99,09
7	110,68	109,69	99,10
8	115,28	115,56	100,24
9	119,86	119,29	99,52
Середнє, Z_{cp} , % =			99,55
Відносне стандартне відхилення, s_z , % =			0,18
Відносний довірчий інтервал Δ , % = $t(95\%, 8) \times s_z = 1,8595 \times s_z =$			0,33
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As} % =			1,6
Систематична похибка $\delta = Z_{cp} - 100 =$			0,45
Критерій незначимості систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta / 3 = 0,33 / 3 = 0,11 < 0,45$			не виконується
2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,51 > 0,45$			виконується
Загальний висновок про методику			Коректна

Виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності a для натрію гіалуронату за 1-м критерієм: $a = |0,81213| \leq 1,8946 \times S_a = |2,74|$ (виконується). Виконуються вимоги до RSD_0/b : для ДГК $RSD_0/b = 0,55 \leq |0,84|$. Вимоги до параметрів лінійної залежності методики визначення діючої речовини

виконуються у всьому діапазоні концентрацій від 80 % до 120 % від номінального значення.

Таблиця 5.4

**Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої
концентрації натрію гіалуронату від його введеної концентрації**

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
b	1,003761			
S_b	0,014331			
a	0,81213	$\leq 1,8946 \times S_a = 2,74 $	$\leq 2,6 $	відповідає за 1-м критерієм
S_a	1,446966			
RSD_0	0,558156			
RSD_0/b	0,55	$\leq 0,84 $		відповідає
r	0,999287	$\geq 0,9981 $		відповідає

На рис. 5.6 наведена лінійна залежність оптичної густини від концентрації натрію гіалуронату в нормалізованих координатах.

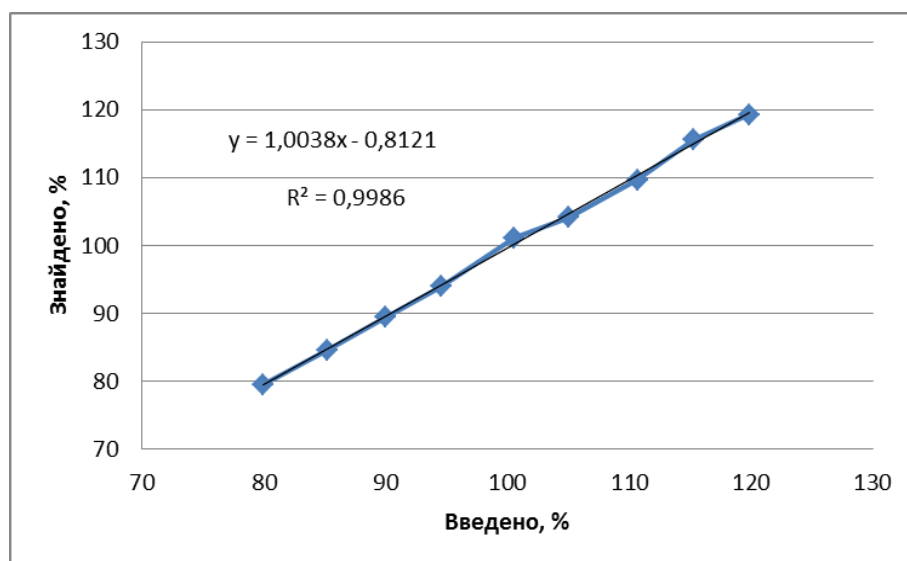


Рис. 5.6 Графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації натрію гіалуронату в нормалізованих координатах

Таким чином, методика кількісного визначення натрію гіалуронату при проведенні тесту «Кількісне визначення. Натрію гіалуронат» в комбінованому препараті «Хіаларікс» у формі розчину для ін'єкцій методом абсорбційної спектрофотометрії в видимій області спектру в діапазоні застосування відповідає критеріям прийнятності для валідаційних характеристик: специфічність, правильність, прецизійність (збіжність) і лінійність. Повна прогнозована невизначеності результатів аналізу натрію гіалуронату не перевищує критичне значення.

5.2.3 Визначення кількісного вмісту аргініну

Визначення кількісного вмісту аргініну запропоновано проводити методом високоефективної рідинної хроматографії (ДФУ 2.2.29, 2.2.46). Використовували наступну хроматографічну систему: хроматограф рідинний Waters (США) з УФ-детектором (Waters 2487), хроматографічна колонка Waters Spherisorb CNRP розміром (4,6 x 250) мм, заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм.

Як рухомих фазу використовували суміш ацетонітрил Р1 – буферний розчин рН 6,0 (1:99). Швидкість потоку – 1,0 мл/хв, температура колонки 25°C. Детектування при довжині хвилі 200 нм.

В аналітичних методиках допускається коригування параметрів хроматографування при використанні хроматографів і колонок інших марок за умови дотримання вимог тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи».

Придатність хроматографічної системи визначають за ефективністю хроматографічної колонки, симетрії піків і відтворюваності площ піків аргініну на хроматограмах розчинів порівняння. З урахуванням отриманих даних і фармакопейних вимог були встановлені вимоги до придатності хроматографічної системи. Хроматографічну систему вважають придатною, якщо при аналізі хроматограм розчину порівняння виконуються наступні

умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована для піків аргініну має бути не менше 1000 теоретичних тарілок;
- коефіцієнт симетрії піків аргініну має бути не більше 1,8;
- RSD площ піків аргініну має відповідати вимогам до RSD (ДФУ 2.2.46 N).

Хроматограми досліджуваного розчину препарату та розчину порівняння при проведенні кількісного визначення аргініну наведено на рис. 5.7.

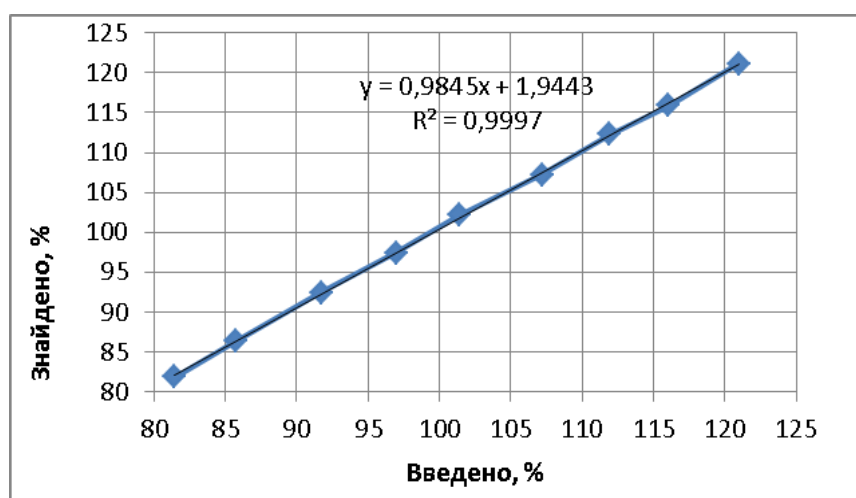


Рис. 5.7 Графік лінійної залежності площ піків від концентрації аргініну в нормалізованих координатах

Обрані умови хроматографування дозволяють відокремити піки аргініну від інших допоміжних речовин («плацебо»), які входять до складу препарату, що підтверджує специфічність тесту. Результати досліджень кількісного визначення аргініну під час вивчення стабільності (див. Розділ 5.3) свідчать, що вони відповідають встановленим критеріям прийнятності, як на момент випуску, так і протягом терміну придатності.

З урахуванням вимог ДФУ були встановлені наступні межі вмісту діючої речовини: вміст аргініну ($C_6H_{14}N_4O_2$) в 1 мл препарату має бути: на момент випуску: від 11,875 мг до 13,125 мг (тобто, $12,5 \text{ мг} \pm 5\%$) в 1 мл препарату; протягом терміну придатності: від 11,250 мг до 13,75 мг (тобто, $12,5 \text{ мг} \pm 10\%$)

в 1 мл препарату. Були проведені дослідження з валідації методики кількісного визначення аргініну відповідно до документу CPMP/ICH/381/95 (ICH Topic Q 2 (R1)) «Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology» і загального тексту «Валідація аналітичних методик і випробувань» ДФУ 2. Показано, що методика кількісного визначення аргініну методом високоефективної рідинної хроматографії є коректною і відповідає критеріям прийнятності, що висуваються до валідаційних характеристик: специфічність, правильність, збіжність (прецизійність), лінійність, діапазон застосування. Крім того, була розрахована повна невизначеність методики кількісного визначення аргініну.

На підставі розрахунку прогнозованої повної невизначеності результатів аналізу підтверджена коректність результатів для тесту «Кількісне визначення. Аргінін» для допусків вмісту $\pm 5\%$ ($\Delta A_s \leq 1,6\%$) в комбінованому препараті «Хіаларікс» у формі розчину для ін'єкцій методом високоефективної рідинної хроматографії. Отримане значення повної прогнозованої невизначеностей результатів $\Delta_{AS, \%} = 0,48\%$ для тесту «Кількісне визначення. Аргінін» для аргініну не перевищує критичне значення $\Delta_{Asmax} = 1,6\%$ ($B = 5\%$). На підставі розрахунку повної невизначеності методики кількісного визначення аргініну показано, що методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Методика характеризується достатньою збіжністю, так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини для аргініну (0,65%) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6%) (табл. 5.5).

Методика характеризується достатньою точністю, так як виконується критерій практичної незначущості систематичної помилки методики. Систематична похибка методики становить 0,40% для аргініну, що відповідає критерію практичної незначущості систематичної похибки методики:

- 1) статистична незначимість: $0,65\%:3 = 0,22\% \leq 0,40\%$;
- 2) практична незначимість: $0,32 \times 1,6\% = 0,51\% > 0,40\%$.

Високі значення коефіцієнтів кореляції ($r=0,99985$) задовольняють

вимоги критерію прийнятності ($r=0,9981$) і підтверджують лінійність залежності між взятими і знайденими кількостями аргініну в діапазоні від 80% до 120% щодо його номінального вмісту в досліджуваному розчині (табл. 5.6).

Таблиця 5.5

Результати аналізу модельних розчинів аргініну і їх статистична обробка

№	Введено в % від номінального вмісту ($X_i, \text{факт.}, \%$)	Знайдено в % від номінального вмісту ($Y_i, \%$)	Знайдено в % від введеного $Z_i = 100 * (Y_i/X_i)$
1	81,45	81,88	100,49
2	85,71	86,26	100,74
3	91,71	91,38	100,83
4	96,97	96,34	100,43
5	101,40	102,02	100,77
6	107,18	106,33	100,07
7	111,90	111,96	100,31
8	116,04	116,44	99,84
9	120,96	121,92	100,12
Середнє, $Z_{cp}, \%$ =			100,40
Відносне стандартне відхилення, $s_z, \%$ =			0,35
Відносний довірчий інтервал $\Delta, \% = t(95\%, 8) \times s_z = 1,8595 \times s_z =$			0,65
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As} \%$ =			1,6
Систематична похибка $\delta = Z_{cp} - 100 =$			0,40
Критерій незначимості систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta / 3 = 0,65 / 3 = 0,22 \leq 0,40$			не виконується
2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,51 > 0,40$			виконується
Загальний висновок про методику			Коректна

Виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності а для аргініну по 2-му критерію: $a = |1,94427| \leq 2,6$ (Виконується) (табл. 5.6). Виконуються вимоги до RSD_0/b : для аргініну $RSD_0/b = 0,2655 \leq |0,84|$. Вимоги щодо параметрів лінійної залежності методики визначення діючої речовини виконуються у всьому діапазоні концентрацій від 80% до 120% від номінального значення.

Таблиця 5.6

**Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої
концентрації аргініну від його введеної концентрації**

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
b	0,9845			
S _b	0,00675			
a	1,94427	$\leq 1,8946 \times S_a$ $= 1,3089 $	$\leq 2,6 $	відповідає за 2-им критерієм
S _a	0,69084			
RSD ₀	0,26140			
RSD ₀ /b	0,2655	$\leq 0,84 $		відповідає
r	0,99985	$> 0,9981 $		відповідає

Таким чином, методика кількісного визначення аргініну при проведенні тесту «Кількісне визначення. Аргінін» в комбінованому препараті «Хіаларікс» у формі розчину для ін'єкцій методом високоефективної рідинної хроматографії в діапазоні застосування відповідає критеріям прийнятності для валідаційних характеристик: специфічність, правильність, прецизійність (збіжність) і лінійність. Повна прогнозована невизначеності результатів аналізу аргініну не перевищують критичне значення.

Базуючись на результатах проведених досліджень розроблена специфікація на препарат «Хіаларікс». Дані наведено в таблиці 5.7.

Специфікація на препарат «Хіаларікс»

Назва показника	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Прозора в'язка рідина від світло-жовтого до жовтого кольору	За п. 1 Візуально
Ідентифікація - дигідрокверцетин	УФ-спектр поглинання досліджуваного розчину, одержаного при кількісному визначенні ДГК в межах від 210 нм до 430 нм повинен відповідати УФ-спектру розчину порівняння і мати максимуми поглинання за довжин хвиль (256 ± 2) нм та (375 ± 2) нм;	За п. 2.1, ДФУ 2.2.25
- натрію гіалуронат	якісна реакція з розчином карбазолу: утворення забарвлення від червоного до червоно-фіолетового;	За п. 2.2
- L-аргінін	якісна реакція з розчином цетилпіридинію хлориду: утворення білого осаду	За п. 2.3
	На хроматограмах досліджуваного розчину, отриманих при кількісному визначенні аргініну, час утримання основного піку аргініну має співпадати з часом утримування цього піку на хроматограмі розчину порівняння	За п. 2.4, ДФУ 2.2.29, 2.2.46
Прозорість	Має бути прозорим	За п. 3, ДФУ 2.2.1
pH	Від 6,5 до 7,5	За п. 5, ДФУ 2.2.3
Об'єм, що витягається	Не менше номінального	За п. 6, ДФУ 2.9.17
Механічні включення видимі частинки	Практично вільний від частинок	За п. 7.1, ДФУ 2.9.20
невидимі частинки	Середня кількість частинок: розміром ≥ 10 мкм має бути не більше 6000 в контейнері; розміром ≥ 25 мкм має бути не більше 600 в контейнері	За п. 7.2, ДФУ 2.9.19 <i>метод 1</i>

Продовж. табл. 5.7

1	2		3
Стерильність	Має бути стерильним		За п. 8, ДФУ 2.6.1
Бактеріальні ендотоксини	Граничний вміст ендотоксинів – менше 62,5 МО/мл		ДФУ 2.6.14
Кількісне визначення			
- дигідрокверцетин (C ₁₅ H ₁₂ O ₇)	На момент випуску: від 4,7 до 5,25 мг/мл	Протягом терміну придатності: від 4,5 до 5,5 мг/мл	За п. 9.1, ДФУ 2.2.25
- натрію гіалуронат ((C ₁₄ H ₂₀ NNaO ₁₁) _n)	Від 9,5 до 10,5 мг/мл	Від 9,0 до 10,0 мг/мл	За п. 9.2, ДФУ 2.2.25
L- аргінін (C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂)	Від 11,875 мг до 13,125 мг/мл	Від 11,25 мг до 13,75 мг/мл	За п. 9.3, ДФУ 2.2.29

5.3 Визначення стабільності та терміну придатності комбінованого розчину «Хіаларікс» для ін'єкцій

Під терміном придатності ЛЗ розуміють період часу, протягом якого вони мають повністю зберігати свою терапевтичну активність, нешкідливість і за рівнем якісних і кількісних характеристик відповідати вимогам, які висувають у нормативній документації.

У процесі зберігання розчину «Хіаларікс» для ін'єкцій в ампулах по 2 мл проводили дослідження стабільності згідно показників якості вказаних в специфікації. Результати експериментальних досліджень стабільності комбінованого ін'єкційного розчину наведено в табл. 5.8 (ампули скляні), табл. 5.9 (переднаповнені шприци).

Термін придатності комбінованого розчину «Хіаларікс» визначений при зберіганні в умовах довгострокових випробувань за температури 25±2°C та відносної вологості 60±5% відповідно до Настанови СТ-Н МОЗУ 42-3.3:2004 «Лікарські засоби. Випробування стабільності» [109].

Результати вивчення стабільності розчину «Хіаларікс» для ін'єкцій в ампулах по 2 мл при температурі $25\pm 2^\circ\text{C}$ та відносної вологості $60\pm 5\%$

Показник	Свіжоприготований розчин	Термін спостереження						
		3 міс	6 міс	9 міс	12 міс	18 міс	24 міс	27 міс
Опис	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина
Ідентифікація	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає
pH (6,5-7,5)	6,67	6,68	6,68	6,67	6,69	6,71	6,68	6,69
Прозорість	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий
Кольоровість	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний
Об'єм, що витягається	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл
Механічні включення	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні
Кількісний вміст								
Натрію гіалуронату, мг/мл (9,9 – 12,1)	11,050	11,050	11,495	11,496	11,494	11,494	11,493	11,493
ДГК, мг/мл (4,5-5,5)	5,150	5,148	5,149	5,148	5,148	5,148	5,147	5,147
L- аргініну, мг/мл (11,875-13,125)	12, 650	12,650	12, 650	12,655	12, 655	12,656	12, 655	12,656

Примітки:

1. Кількість вимірювань n=5.
2. Аналогічні результати отримані для двох других серій препарату «Хіаларікс»

Результати вивчення стабільності розчину «Хіаларікс» для ін'єкцій в переднаповнених шприцах по 2 мл при температурі $25\pm 2^\circ\text{C}$ та відносної вологості $60\pm 5\%$

Показник	Свіжоприготований розчин	Термін спостереження						
		3 міс	6 міс	9 міс	12 міс	18 міс	24 міс	27 міс
Опис	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина	прозора безбарвна рідина
Ідентифікація	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає
pH (6,5-7,5)	7,10	7,11	7,11	7,12	7,13	7,13	7,14	7,14
Прозорість	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий
Кольоровість	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний	безбарвний
Об'єм, що витягається	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл	не менше 2 мл
Механічні включення	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні
Кількісний вміст								
гіалуронату натрію мг/мл (9,9 – 12,1)	11,250	11,250	11,251	11,252	11,252	11,251	11,252	11, 252
ДГК, мг/мл (4,5-5,5)	5,150	5,150	5,151	5,150	5,149	5,149	5,148	5,149
L- аргініну, мг/мл (11,875-13,125)	12, 550	12,550	12, 556	12,600	12, 558	12,557	12, 557	12,556

Примітки:

1. Кількість вимірювань n=5.
2. Аналогічні результати отримані для двох других серій препарату «Хіаларікс»

Встановлено, що в процесі зберігання комбінований розчин «Хіаларікс» для ін'єкцій в ампулах і переднаповнених шприцах при зберіганні за температури $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ та відносної вологості $60\pm 5\%$ за всіма показниками якості відповідає проекту МКЯ протягом 27 місяців. Препарат дає чіткі позитивні реакції ідентифікації. рН, прозорість, механічні включення на всіх контрольних етапах експерименту знаходяться в допустимих межах. Кількісний вміст діючих речовин знаходиться в межах помилки виміру протягом 27 місяців зберігання.

Отже, на основі досліджень нами рекомендовано зберігати комбінований розчин «Хіаларікс» для ін'єкцій в ампулах і переднаповнених шприцах при кімнатній температурі (від $+15^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$) в захищеному від світла місці.

5.4 Дослідження специфічної дії комбінованого розчину

Проведені порівняльні дослідження *in vitro* протизсідальної активності розчинів ДГК та розчину «Хіаларікс» на базі Інституту мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України під керівництвом кандидата біологічних наук ст. наукового співробітника Т.М. Носальської.

В останні роки значно зросла кількість процедур об'ємної пластики, які проводяться косметологами з метою омолодження шкіри обличчя. Дермальні філери на основі стабілізованої ГК є найбільш популярним ін'єкційним матеріалом [127, 128, 129].

В естетичній корекції, серед малоінвазивних процедур, за популярністю контурна пластика посідає друге місце після ботулінотерапії [130, 131]. Одними з негативних явищ після ін'єкційних процедур, які зазвичай не становлять суттєвої загрози, проте є естетично небажаними, є крововилив у м'які тканини [132-135]. Дані явища виникають у зв'язку з ушкодженням (внаслідок прямої травми чи компресії) кровоносних судин. Згідно з даними

літератури, крововиливи частіше розвиваються при більш поверхневому (підшкірному) введенні матеріалу з використанням віялової та лінійної техніки, ніж при ін'єкції у глибокі шари [130-132]. Залежно від поширеності виділяють петехії, екхімози, геморагічні просочування та гематоми [133]. Терміном «гематома» позначають організоване скупчення сформованого згустку крові або рідкої крові в м'яких тканинах, яка може розташовуватися як поверхнево – під шкірою або зовнішніми слизовими оболонками, так і в глибині м'язів.

Об'єктом дослідження були зразки ін'єкційних комбінованих розчинів:

- ДГК із ПВП (Повідон К-17) 5%, рН 7,28 (серія 1020919);
- ДГК із ГК та L-аргініном, рН 7,42 (серія 2160220, «Хіаларікс»).

З цією метою:

- на годинне скло №1 - наносили до 2 крапель крові щурів (приблизно 0,1 мл) не додавали ніяких речовин (інтактний контроль);
- №2 – до крові додавали 0,05 мл фізіологічного розчину (контроль №2);
- №3 – до крові додавали 0,05 мл ДГК (серія 1020919);
- №4 – до крові додавали 0,05 мл ДГК з ГК та L-аргініном (серія 2160220).

По поверхні краплі кожні 30 с з проводили тонкою голкою. Час зсідання визначали з моменту появи перших фібринових ниток, що тягнуться за голкою. Результати наведено в таблиці 5.10

Таблиця 5.10

Вплив досліджуваних розчинів на систему зсідання крові

№ з/п	Досліджувані речовини	Час зсідання крові, с
1.	Інтактний контроль	3,63±0,22
2.	Фізіологічний розчин	4,93±0,23
3.	ДГК з 5% ПВП	6,92±0,16*/**
4.	«Хіаларікс»	13,34±0,45*/**/**

Примітки:

1. * – достовірність відмінностей ($p < 0,001$) порівняно з контролем;
2. ** – достовірність відмінностей ($p < 0,001$) проти фізіологічно розчином;
3. *** – достовірність відмінностей ($p < 0,001$) порівняно з ДГК із 5 % ПВП

Проведене *in vitro* порівняльне дослідження комбінованих розчинів впливу на систему зсідання крові показало, що найбільш виражено на гемостаз впливає комбінований розчин («Хіаларікс», серія 2160220). Проведені дослідження важливі для подальшого вивчення властивостей композиції на основі ДГК, ГК та L-аргініну сукцинату.

5.5 Вивчення параметрів гострої токсичності та алергізуючої дії оригінального комбінованого ін'єкційного препарату «Хіаларікс»

На базі ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» під керівництвом д. біол. наук, професора Малої Н.Г. проведено вивчення параметрів гострої токсичності та алергізуючої дії оригінального комбінованого ін'єкційного препарату на основі гіалуронової кислоти, ДГК та аргініну сукцинату під умовною назвою «Хіаларікс».

Вивчення гострої токсичності є обов'язковим дослідженням при розробці нових ЛЗ. Мета таких досліджень полягає в визначенні рівня доз що є не шкідливими для організму, та з'ясуванні до якого класу шкідливості відноситься досліджувана сполука. Комбінований препарат «Хіаларікс» передбачається використовувати для підшкірних ін'єкцій, тому дослідження гострої токсичності проводилось із застосуванням підшкірних введень [111].

Згідно методичних рекомендацій для такого виду досліджень максимально дозволений об'єм для підшкірного введення для даного виду

тварин складав: для білих мишей – 1,0 мл (18-20 г маси тіла), для щурів – 5,0 мл (200-220 г маси тіла).

Введення максимально допустимих доз препарату «Хіаларікс» загигелі тварин не викликав. У гризунів дослідної групи спостерігали слабе пригнічення рухової активності та відмову від їжі впродовж деякого часу. Протягом перших трьох годин вони відокремлювались в куток, реєстрували збільшення дихальних рухів, однак зазначені симптоми зникали впродовж 2-5 годин. До закінчення першої доби тварини практично не відрізнялися від інтактних.

Впродовж наступних 14 діб загигелі тварин не відмічали. Розрахунок ЛД₅₀ проводили відштовхуючись від максимально дозволеного об'єму досліджуваного препарату. Спостереження за масою тіла гризунів в динаміці принципівих відхилень від контрольних тварин не показало (табл. 5.11).

Таблиця 5.11

Динаміка зміни маси тіла тварин при одноразовому підшкірному введенні препарату «Хіаларікс»

Вид, статъ тварин	Кількість тварин	Маса тіла (г)		Різниця від ваги на початку експерименту	
		1 доба	через 14 діб	(г)	(%)
<i>Контрольна група тварин</i>					
Миші, самки	5	20,3±0,54	23,8±0,44	+3,50±0,24	+17,2
Миші, самці	5	24,0±0,73	27,2±0,44	+3,50±0,29	+14,6
Щури, самки	5	209,3±1,95	220,0±2,02	+11,7±2,19	+5,6
Щури, самці	5	225,3±1,35	235,3±2,50	+10,0±1,50	+4,5
<i>Дослідна група тварин</i>					
Миші, самки	5	20,5±0,73	24,2±0,52	+3,50±0,37	+18,0
Миші, самці	5	23,3±0,50	26,8±0,64	+3,00±0,14	+12,8
Щури, самки	5	209,3±1,95	220,0±2,02	+11,7±2,19	+5,6
Щури, самці	5	220,3±3,35	232,3±2,07	+12,0±1,15	+5,5

На 14 добу після введення було проведено дослідження зовнішнього вигляду мишей та щурів обох груп (дослідної та контрольної), з метою виявлення токсичного пошкодження внутрішніх органів, а саме досліджували печінку, нирки, селезінку, тимус, надниркові залози, лімфатичні вузли, статеві залози, головний мозок, та місце безпосереднього введення препарату (внутрішній стан шкіри та підшкірних оболонок, наявність некрозу, фіброзу, набряку, крововиливів, тощо). При макроскопічному дослідженні не встановлено значних органних уражень та в місці безпосереднього контакту з препаратом.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що при підшкірному застосуванні досліджуваній препарат не викликає токсичної дії. Спираючись на класифікацію Л. І. Медведь, Ю. С. Кагана (1968), прийняту наразі ВООЗ, токсичність даної сполуки може бути класифікована як не виражена, а за ступенем токсичності досліджуваній ЛЗ відноситься до IV класу небезпечності – малошкідливі сполуки.

Оскільки застосування даного ЛЗ передбачається у вигляді підшкірних та внутрішньошкірних ін'єкцій, дуже важливим було вивчити алергізуючі властивості цієї сполуки. Цей вид дослідження нешкідливості сполук дозволяє виявити розвиток можливих алергічних реакцій різного типу. Мурчаки є найбільш чутливим видом лабораторних тварин, на яких вивчення алергізуючої дії дозволяє чітко визначити наявність тих або інших алергічних реакцій. Було проведено декілька тестів алергізуючої дії, а саме:

Кон'юнктивальна проба – дуже чутливий тест, дозволяє виявити реакцію тварин на алерген навіть при слабкій алергізації та негативних шкірних тестах. За наявності хорошої розчинності ліків, її проведення є обов'язковою.

Цей тест не виявив ознак почервоніння кон'юнктиви та слізного протоку ока мурчаків як самиць так і самців, що вказує на відсутність підвищеної чутливості до препарату.

При вивченні сенсibiliзуючої дії препарату «Хіаларікс» шляхом нашкірних аплікацій не спостерігали розвитку почервоніння та набряку шкіри

на ділянці нанесення дослідної сполуки як після 10 так і після 20 аплікацій, шкірна реакція в дослідних та контрольних групах (самці та самиці) не мала значної різниці.

Після внутрішньошкірного введення препарату «Хіаларікс» мишам діаметр забарвленої плями дослідної групи статистично не відрізнявся від контрольної, як у самців так і у самиць. Розміри плями з фарбником коливалися в межах, що не перевищувала статистично значущої різниці (табл. 5.12).

Таблиця 5.12

Вплив препарату «Хіаларікс» на активну шкірну анафілаксію в мишей обох статей ($X \pm m$)

Група	Діаметр плями та об'єм препарату введеного в шкіру, мм	
	0,1 мг	0,5 мг
Самці		
Контроль	0,94±0,09	1,16±0,08
«Хіаларікс»	1,08±0,15	1,36±0,25
Самки		
Контроль	1,18±0,15	1,46±0,15
«Хіаларікс»	1,16±0,17	1,66±0,12

Примітка: n=5.

Таким чином, при вивченні алергізуючих властивостей препарату «Хіаларікс» в дослідженні на різних видах тварин різної статі не встановлено статистично значущих змін відносно інтактних тварин. Також не визначено гендерної різниці в реакції на препарат.

Досліджуваний препарат не викликає як загальної анафілаксії (анафілактичний шок), так і місцевої шкірної анафілаксії. У всіх експериментальних тварин відмічали відсутність підвищеної чутливості до досліджуваного ЛЗ. Тобто можна зробити висновки, що препарат «Хіаларікс»

в дослідженому дозуванні за вищезазначених умов не проявляв алергізуючих властивостей.

Висновки до Розділу 5

1. Розроблено методики якісного та кількісного визначення діючих речовин в комбінованому ін'єкційному препараті. Проведена валідація даних методик.

2. Результати експериментів з вивчення гострої токсичності препарату свідчать про те, що за значенням LD_{50} при внутрішньовенному шляху введення препарат належить до класу малотоксичних сполук.

3. Проведені дослідження підтвердили, що комбінований препарат не володіє алергезуючими властивостями.

4. Проведене *in vitro* порівняльне дослідження впливу ЛЗ на систему зсідання крові показало, що найбільш виражену активність на гемостаз проявляє комбінований розчин «Хіаларікс» комбінація (ДГК+ ГК+L-аргінін, серія 2160220). Проведені дослідження важливі для подальшого вивчення.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Семенова К., Носальська Т. Порівняльне дослідження протизгортанної активності комбінованих розчинів дигідрокверцетину з гіалуроновою кислотою. *Анали Мечніковського інституту*. 2023. №2. С.64–66.

2. Semenova K., Almakaieva L. Research of anti-collective activity of a vitro digydroquercetic insolution. *Danish Scientific Journal (DSJ)*. 2020. Vol. 2. No 35. P. 66–69.

3. Семенова К. Н., Алмакаев М. С. Изучение алергизирующего действия оригинального комбинированного препарата. *European scientific*

discussions: materials of the 3rd International scientific and practical conference, February 1-3, 2021, Rome, Italy: PoteredellaragioneEditore, 2021. P. 156.

4. Семенова К. Н., Алмакаева Л. Г. Антиоксидантная композиция гиалуроновой кислоты для мезотерапии. *Науковий підхід до сфери практичної косметології: актуальні питання й тренди: матеріали міжнар. наук.-практ. конф.*, 11 березня 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 182-183.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено та стандартизовано склад та технологію одержання комбінованого препарату, розчин для ін'єкцій «Хіаларікс» – нового вітчизняного лікарського засобу для застосування в медицині та косметології при процедурі мезотерапії.

2. Вперше на основі комплексного системного підходу до проведення фізичних, фізико-хімічних і фармако-технологічних досліджень запропоновано спосіб одержання розчину дигідрокверцетину та солі аргініну натрію сукцинату у розчині з вихідних інгредієнтів, що дозволяє виключити стадію одержання їх у кристалічному вигляді та в окремих реакторах.

3. Теоретично обґрунтований і практично підтверджений оптимальний інтервал рН для одержання розчину солі аргініну натрію сукцинату: рН 7,2-7,4, а комбінованого розчину – рН 6,5-7,5. Встановлено температурні та часові режими приготування розчину: початкова температура 80-85 °С і час приготування розчину дигідрокверцетину з аргініном 15-20 хв., з поступовим зниженням до 25-30 °С.

4. Науково обґрунтований оптимальний склад комбінованого ін'єкційного розчину «Хіаларікс». Проведено обґрунтування і вибір допоміжних речовин. За результатами досліджень запропоновано використання полівінілпіролідону К-17 для одержання стабільних у процесі виробництва і зберігання розчинів.

5. Розроблені раціональні режими фільтрації розчину, обрані та досліджені фільтруючі матеріали, обрано режим стерилізації ампул і шприців з розчином. Визначені основні критичні точки та параметри технологічного процесу.

6. Експериментально доведена фізико-хімічна, фармако-технологічна та мікробіологічна стабільність комбінованого розчину при зберіганні в різних видах первинного пакування протягом установленого терміну придатності.

7. За результатами проведених досліджень уперше розроблена і стандартизована промислова технологія комбінованого розчину «Хіаларікс». Розроблено і затверджено технологічну документацію на препарат. Технологія виробництва в різному виді пакування (скляні ампули по 2 мл, акт впровадження 21.12.2022 р.) апробована на ТОВ «Юрія-фарм», м. Черкаси та скляні шприци по 2 мл, акт впровадження 16.12.2022 р.) апробована на ділянці Центру персоналізованої фармації «Хемотека», м. Черкаси.

8. Оригінальність складу і технології виробництва комбінованого ін'єкційного препарату «Хіаларікс» захищена патентом України на корисну модель №1349923 та патентом України на винахід № 124473 «Антиоксидантна композиція для ін'єкцій».

9. Фрагменти дисертаційного дослідження впроваджено у навчальний процес низки закладів вищої освіти України фармацевтичного (медичного) профілю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аспекти фармакодинаміки та клінічної фармакології гіалуронової кислоти / Г. В. Зайченко, Н. О. Горчакова, О. А. Стрига та ін. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. № 1 (135). С. 33–42.
2. Методи оцінки перебігу ранового процесу / О. С. Проценко, О. В. Шаповал, Г. О. Тесленко, М. О. Родіонов. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2019. № 4. С. 3–7.
3. Особливості формування грануляційної тканини навколо елементів сітчастої тканини передньої черевної стінки при застосуванні гіалуронової кислоти в експерименті / І. К. Морар, О. І. Іващук, І. С. Давиденко та ін. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2015. № 2 (14). С. 120–126.
4. Palmer S. J. Dermatological conditions in older adults: clinical overview. *British Journal of Community Nursing*. 2020. Vol. 5 (25). P. 222–226.
5. Plachouri K. M., Georgiou S. Mesotherapy: Safety profile and management of complications. *J Cosmet Dermatol*. 2019. Vol. 18(6). P. 1601–1605.
6. Inhibition of human monoamine oxidase: biological and molecular modeling studies on selected natural flavonoids / S. Carradori, M. C. Gidaro, A. Petzer et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016. Vol. 64 (47). P. 9004–9011.
7. Suppurative and granulomatous lesions of the skin following mesotherapy / S. Veraldi, C. B. Spigariolo, G. Nazzaro et al. *Ital J Dermatol Venerol*. 2022. Vol. 157(3). P. 285–286.
8. Zduńska K., Kołodziejczak A., Rotsztein H. Is skin microneedling a good alternative method of various skin defects removal. *Dermatol Ther*. 2018. Vol. 31(6):e12714.
9. Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use / R. J. Snyder, J. Lantis, R. S. Kirsner et al. *Wound Repair Regeneration*. 2016. Vol. 24(4). P. 613–29.
10. Bryan N. S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience*. 2009. Vol. 14.

P. 1–18.

11. Leptin in skin disease modulation / X. Su, G. Zhang, Y. Cheng et al. *Clinica Chimica Acta*. 2021. Vol. 516. P. 8–14.

12. Bioactive fatty acids in the resolution of chronic inflammation in skin wounds / C. P. Jara, N. F. Mendes, T. P. D. Prado et al. *Advanced Wound Care*. 2020. Vol. 9 (8). P. 472–490.

13. Bowers S., Franco E. Chronic Wounds: Evaluation and Management. *American Family Physician*. 2020. Vol. 101 (3). P. 159–166.

14. Amer Y., Bridges C., Marathe K. Epidemiology, pathophysiology and management strategies of neonatal wound care. *NeoReviews*. 2021. Vol. 22 (7). P. 452–460.

15. Beers E. H. Palliative wound care: less is more. *Surgical Clinics of North America*. 2019. Vol. 99 (5). P. 899–919.

16. Beyene R. T., Derryberry S. L., Barbul A. The effect of comorbidities on wound healing. *Surgical Clinics of North America*. 2020. Vol. 100 (4). P. 695–705.

17. Rezaie F., Momeni-Moghaddam M., Naderi-Meshkin H. Regeneration and Repair of Skin Wounds: Various Strategies for Treatment. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2019. Vol. 18 (3). P. 247–261.

18. Stacey M. C. Biomarker directed chronic wound therapy – a new treatment paradigm. *The Journal of Tissue Viability*. 2020. Vol. 3 (29). P. 180–183.

19. Young S. Wound assessment. *British Journal of Community Nursing*. 2019. Vol. 24 (9). P. 5–9.

20. Bonifant H., Holloway S. A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing. *British Journal of Community Nursing*. 2019. Vol. 24 (3). P. 28–33.

21. Hall A. H., Mathieu L., Maibach H. I. Acute chemical skin injuries in the United States: a review. *Critical Reviews in Toxicology*. 2018. Vol. 48 (7). P. 540–554.

22. Pathophysiologic Mechanisms and Current Treatments for Cutaneous Sequelae of Burn Wounds / C. Hall, C. Hardin, C. J. Corkins et al. *Comprehensive*

Physiology.2017. Vol. 8(1). P. 371–405.

23. Peiseler M., Kubes P. Macrophages play an essential role in trauma-induced sterile inflammation and tissue repair. *The European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2018. Vol. 44(3). P. 335–349.

24. Wound care in the era of COVID-19 / H. D. Waller, M. W. McCarthy, J. Goverman et al. *Journal of Wound Care*. 2020. Vol. 8 (29). P. 432–434.

25. Atkin L. Chronic wounds: the challenges of appropriate management. *British Journal of Community Nursing*. 2019. Vol. 24(9). P. 26–32.

26. Trends in tissue repair and regeneration / B. Galliot, M. Crescenzi, A. Jacinto, S. Tajbakhsh. *Development*. 2017. Vol. 144(3). P. 357–364.

27. Bryanth Ruth A., Nix Denise P. Acute and chronic wounds: current management concepts. Elsevier, 2016. 1872 p.

28. Stechmiller J. K. Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutrition in Clinical Practice*. 2010. Vol. 1 (25). P. 61–68.

29. Imaging in chronic wound diagnostic / S. Li, A. H. Mohamedi, J. Senkowky et al. *Advanced Wound Care*. 2020. Vol. 9 (5). P. 245–263.

30. Injury, inflammation and the emergence of human-specific genes / A. Baird, T. Costantini, R. Coimbra et al. *Wound Repair Regeneration*. 2016 Vol. 24 (3). P. 602–606.

31. Gkaliagkousi E., Ritter J., Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ. Res.*2007. Vol. 101(7). P. 654–662.

32. Hortensius R. A., Harley B. A. Naturally derived biomaterials for addressing inflammation in tissue regeneration. *Experimental Biology and Medicine (Society for Experimental Biology and Medicine journal)*. 2016. Vol. 241(10). P. 1015–24.

33. Catecholamines in the regulation of angiogenesis in cutaneous wound healing / D. Chakroborty, S. Goswami, S. Basu, C. Sarkar. *FASEB Journal*. 2020. Vol. 11 (34). P. 14093–14102.

34. Childs D. R., Murthy A. S. Overview of Wound Healing and Management. *Surgical Clinics of North America*.2017. Vol. 97 (1). P. 189–207.

35. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing / C. Daniel, M. Leppkes, L. E. Muñoz et al. *Nature Reviews Nephrology*. 2019. Vol. 15(9). P. 559–575.
36. Rodero M. P., Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2010. Vol. 3. P. 643–653.
37. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Research*. 2018 Vol. 371(3). P. 531–539.
38. Sauaia A., Moore F. A., Moore E. E. Postinjury Inflammation and Organ Dysfunction. *Critical Care Clinics*. 2017. Vol. 33(1). P. 167–191.
39. Chambers E. S., Vukmanovic-Stejic M. Skin barrier immunity and aging. *Immunity*. 2020. Vol. 2 (160). P. 116–125.
40. Dunster J. L. The macrophage and its role in inflammation and tissue repair: mathematical and systems biology approaches. *Wiley Interdisciplinary reviews-systems biology and medicine*. 2016. Vol. 8 (1). P. 87–99.
41. Eggleston R. B. Wound management: wounds with special challenges. *Veterinary Clinics: Equine Practice*. 2018. Vol. 34 (3). P. 511–538.
42. Hori H., Kim Y. Inflammation and post-traumatic stress disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2019. Vol. 73 (4). P. 143–153.
43. Update on neutrophil function in severe inflammation / E. Mortaz, S. D. Alipoor, I. M. Adcock et al. *Frontiers in Immunology*. 2018. Vol. 9. P. 2171.
44. Reinke J. M., Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*. 2012. Vol. 49 (1). P. 35–43.
45. Schemitsch C., Nauth A. Psychological factors and recovery from trauma. *Injury*. 2020. Vol. 2. P. 64–66.
46. Shah A., Amini-Nik S. The Role of Phytochemicals in the Inflammatory Phase of Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18(5). P. 1068.
47. Teot L., Ohura N. Challenges and management in wound care. *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open*. 2021. Vol. 147. P. 9–15.

48. Wound fluid cytokine profile following bone regeneration procedures / B. Leblebicioglu, L. Alssum, T. D. Eubank et al. *The Journal of Oral Implantology*. 2020. Vol. 2 (46). P. 107–113.
49. Wound healing – a literature review / A. C. Gonzalez, T. F. Costa, Z. A. Andrade et al. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2016. Vol. 5 (91). P. 614–620.
50. Kaushik K., Das A. Endothelial progenitor cell therapy for chronic wound tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2019. Vol. 21 (11). P. 1137–1150.
51. Hamm Rose L. Text and Atlas of wound diagnosis and treatment. McGraw-Hill Education: Medical, 2015. 524 p.
52. Location is the key to function: HMGB1 in sepsis and trauma-induced inflammation / M. Deng, M. J. Scott, J. Fan, T. R. Billiar. *Journal of Leukocyte Biology*. 2019. Vol. 1 (106). P. 161–169.
53. Luyendyk J. P., Schoenecker J. G., Flick M. J. The multifaceted role of fibrinogen in tissue injury and inflammation. *Blood*. 2019. Vol. 133(6). P. 511–520.
54. Roe K. An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2021. Vol. 93 (2). e12970.
55. Short-term treatment of equine wounds with orf virus IL-10 and VEGF-E dampens inflammation and promotes repair processes without accelerating closure / C. J. Bodaan, L. M. Wise, K. A. Wakelin et al. *Wound Repair Regeneration*. 2016. Vol. 24 (6). P. 966–980.
56. The potential impact of social genomics on wound healing / R. A. Fayne, L. J. Borda, A. N. Egger, M. Tomic-Canic. *Advances in Wound Care*. 2020. Vol. 6 (9). P. 325–331.
57. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration / E. M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta et al. *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12. P. 1–30.
58. Van Opdenbosch N., Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation and disease. *Immunity*. 2019. Vol. 50 (6). P. 1352–1364.
59. A Novel Topical Wound Therapy Delivery System / I. Herskovitz,

F. E. MacQuhae, L. J. Borda et al. *Wounds*. 2017. Vol. 29 (9). P. 269–276.

60. Bagchi D., Das A., Roy S. Wound healing, tissue repair, and regeneration in diabetes. Academic press, 2020. 605 p.

61. Haalboom M. Chronic Wounds: Innovations in Diagnostics and Therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 25(41). P. 5772–5781.

62. Vachhrajani V., Khakhkhar P. Science of wound healing and dressing materials. Springer, 2020. 274 p.

63. Hyaluronan: an overview / F. Abbruzzese, F. Basoli, M. Costantini et al. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*. 2017. Vol. 31 (2). P. 9–22.

64. Hyaluronic Acid: redefining its role / G. Abatangelo, V. Vindigni, G. Avruscio, L. Pandis. *Cells*. 2020. Vol. 9 (7). P. 1743.

65. Hyaluronic Acid / H. Pereira, D. A. Sousa, A. Cunha et al. *Experimental Medicine and Biology*. 2018. Vol. 1059. P. 137–153.

66. Ho D., Jaddeo J. Biological properties a new volumizing hyaluronic acid filler: a systemic review. *Journal of drugs in dermatology*. 2015. Vol. 1 (14). P. 50–54.

67. Hyaluronic acid in vascular and immune homeostasis during normal pregnancy and preeclampsia / M.M. Ziganshina, S.V. Pavlovich, N.N. Bovin, T. Sukhikh. *Acta natural*. 2016. Vol. 8 (3). P. 59–71.

68. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration / M. Litwiniuk, A. Krejner, M. S. Speyrer et al. *Wounds*. 2016. Vol. 28(3). P. 78–88.

69. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer / P. Snetkov, K. Zakharova, S. Morozkina et al. *Polymers (Basel)*. 2020. Vol. 12 (8). P. 1800.

70. Hyaluronic acid-based wound dressings: a review / M. F. P. Graca, S. P. Miguel, C. S. D. Cabral, I. J. Correia. *Carbohydrate Polymers*. 2020. Vol. 241. P. 116364.

71. Jung H. Hyaluronidase: an overview of its properties, applications and side effects. *Archives of Plastic Surgery*. 2020. Vol. 4 (47). P. 297–300.

72. Keen M. A. Hyaluronic acid in dermatology. *Skin med*. 2017. Vol. 6 (15).

P. 441–448.

73. Optimization of treatment of trophic ulcers by vacuum extraction / N. N. Veligotsky, A. S. Trushin, A. I. Seroshtanovet al. *Kharkiv Surgical School*. 2020. Vol. 1. P. 134–136.

74. Searle T., Ali F. R., Al-Niaimi F. Hyaluronidase in dermatology: uses beyond hyaluronic acid fillers. *The Journal of Drugs in Dermatology*. 2020. Vol. 10 (19). P. 993–998.

75. The role of hyaluronic acid and amino acid against the aging of the human skin: a clinical and histological study / A. Scarano, A. Sbarbati, R. Amore et al. *The Journal of Cosmetic Dermatology*. 2021. Vol. 7 (20). P. 2296–2304.

76. Ors S. The effect of hyaluronidase on depth of necrosis in hyaluronic acid filling-related skin complications. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2020. Vol. 5 (44). P. 1178–1785.

77. Hyaluronic Acid-mediated drug delivery system targeting for inflammatory skin disease: a mini review / K. N. How, W. H. Yap, C. L. H. Lim et al. *Frontiers in Pharmacology*. 2020. Vol. 11. P. 1105.

78. Hyaluronic acid decreases IL-6 and IL-8 secretion and permeability in an inflammatory model of interstitial cystitis / P. Rooney, A. Srivastava, L. Watson et al. *Acta Biomaterialia*. 2015. Vol. 19. P. 66–75.

79. King I. C., Sorooshian P. Hyaluronan in skin wound healing: therapeutic applications. *Journal of Wound Care*. 2020. Vol. 12 (29). P. 782–787.

80. Late granuloma formation secondary to hyaluronic acid injection / B. Tonin, C. Colato, M. Bruni, G. Girolomoni. *Dermatology Online Journal*. 2020. Vol. 26(7). P. 13030.

81. Effect of hyaluronic acid on the regulation of inflammatory mediators in osteoarthritis of the temporomandibular joint: a systematic review / V. Iturriaga, T. Bornhardt, C. Manterola, P. Brebi. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*. 2017. Vol. 5 (46). P. 590–595.

82. Hyaluronic acid in the management of osteoarthritis: injection therapies innovation / V. Santilli, M. Paoloni, M. Mangone et al. *Clinical Cases in Mineral*

and Bone Metabolism. 2016. Vol. 2 (13). P. 131–134.

83. Hyaluronic acid in wound dressings/ H. Cortes, I. H. Caballero-Florán, N. Mendoza-Muñoz et al. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-grand)*. 2020. Vol. 66(4). P. 191–198.

84. Synthesis, characterization, solubilization, cytotoxicity and antioxidant activity of aminomethylated dihydroquercetin / J. Li, J. Dong, J. Ouyang et al. *Medchemcomm*. 2016. Vol. 2 (8). P. 353–363.

85. Therapeutic aspects of taxifolin - An update / K. Saftar Asmi, T. Lakshmi, Sri Renukadevi Balusamy, R. Parameswari. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 2017. Vol. 7 (3). P. 187–189.

86. Quercetin and its analogues: optical and acido-basic properties / M. Biler, D. Biedermann, K. Valentova et al. *Physical chemistry, chemical physics*. 2017. Vol. 19 (39). P. 26870–26879.

87. Research on characteristics, antioxidant and antitumor activities of dihydroquercetin and its complexes / Y. Zhang, J. Yu, X. D. Dong, H. Y. Ji. *Molecules*. 2017. Vol. 1 (23). P. 20.

88. Taxifolin protects RPE cells against oxidative stress-induced apoptosis / X. Xie, J. Feng, Z. Kang et al. *Molecular Vision*. 2017. Vol. 23. P. 520–528.

89. Tina McKay, Karamichos D. Quercetin and the ocular surface: What we know and where we are going. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017. Vol. 242 (6). P.565–572.

90. Weidmann A. E. Dihydroquercetin: More than just an impurity? *Eur. J. Pharmacol*. 2012. Vol. 684. P. 19–26.

91. Antioxidant and antibacterial polyelectrolyte wound dressing based on chitosan / hyaluronan / phosphatidylcholine dihydroquercetin / M. A. Hassan, T. M. Tamer, K. Valachova et al. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 166. P. 18–31.

92. Evaluation of in vitro biological activities: antioxidant; anti-inflammatory; anti-cholinesterase; anti-xanthine oxidase, anti-superoxyde dismutase, anti- α -glucosidase and cytotoxic of 19 bioflavonoids / I. Khelifi, E. A.

Hayouni, S. Cazaux, R. Ksouri et al. *Cellular and Molecular Biology*. 2020. Vol. 1 (66). P. 9–19.

93. Antiplatelet effects of flavonoids mediated by inhibition of arachidonic acid-based pathway / J. Karlickova, M. Riha, T. Filipicky et al. *Planta Med*. 2016. Vol. 82. P. 76–83.

94. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure / T. S. Rector, A. J. Bank, K. A. Mullen, L. K. Tschumperlin. *Circulation*. 1997. Vol. 18. P. 1674–1679.

95. The impact of oral L-arginine supplementation on acute smoking-induced endothelial injury and arterial performance / G. Siasos, D. Tousoulis, C. Vlachopoulos et al. *Am. J. Hypertens*. 2009. Vol. 22 (6). P. 586–592.

96. Visek W. J. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J. Nutr*. 1986. Vol. 116. P. 36–46.

97. Wu G., Morris S.M. Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J*. 1998. Vol. 336. P. 1–17.

98. Chatterjee A., Catravas J. D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul. Pharmacol*. 2008. Vol. 49(4–6). P. 134–140.

99. Lubos E., Handy D.E., Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front. Biosci*. 2009. Vol. 13. P. 5323–5344.

100. The influence of two different doses of L-arginine oral supplementation on nitric oxide (NO) concentration and total antioxidant status (TAS) in atherosclerotic patients / A. Jablecka, P. Chęciński, H. Krauss et al. *Med. Sci. Monit*. 2004. Vol. 10(1). P. 29–32.

101. A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled comparative clinical trial of arginine aspartate plus adenosine monophosphate for the intermittent treatment of male erectile dysfunction / Y. Neuzillet, V. Hupertan, F. Cour et al. *Andrology*. 2013. Vol. 1. P. 223–228.

102. Wilson A. M., Harada R., Nair N., Balasubramanian N. L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation*. 2007. Vol. 116. P. 188–195.

103. Wu G., Meininger C. J. Arginine nutrition and cardiovascular function. *J. Nutr.* 2000. Vol. 130. P. 2626–2629.

104. Zhang N., Xiong A.H., Xiao X., Li L.P. Effect and mechanism of L-arginine therapy for fetal growth retardation due to pregnancy-induced hypertension. *Nan. Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007. Vol. 27 (2). P. 198–200.

105. Heden P. Nasal reshaping with hyaluronic acid: an alternative or complement to surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open.* 2016. Vol. 4. P. 11–20.

106. Настанови з якості. Лікарські засоби. Валідація процесів: Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.5:2016 / М. Ляпунов та ін. Вид. офіц. К.: МОЗ України, 2016. 25с.

107. Настанови з якості. Лікарські засоби. Виробництво готових лікарських засобів: Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.4:2004 / М. Ляпунов та ін. Вид. офіц. К.: МОЗ України, 2004. 16 с.

108. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.5:2016 «Лікарські засоби. Валідація процесів» / розроб. О. Безугла, Ю. Підпружников, М. Ляпунов, Н. Тахтаулова. Вид. офіц. К. : МОЗ України, Державна служба лікарських засобів, 2016. 25 с.

109. Настанови з якості. Лікарські засоби. Випробування стабільності: Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.3:2004 / В. Георгієвський та ін. Вид. офіц. К.: МОЗ України, 2004. 68 с.

110. Бобокало С. В., Алмакаєва Л. Г. Розробка технології одержання ін'єкційного розчину високоочищеного дигідрокверцетину. *The scientific heritage, Budapest, Hungary.* 2020. Vol. 1. No 52 (52). С.15–18.

111. Державна Фармакопея України: в 3 т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014-2015.

112. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. К.: Авіцена, 2001. 528 с.

113. Резніков О. Г., Соловійов А. І., Стефанов О. В. Біотична експертиза

доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод. рекомендації. *Вісник фармакології і фармації*. 2006. № 7. С. 47–61.

114. Даценко Б. М. Раневой процесс как фундаментальная проблема современной клинической хирургии. *Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2007. № 1-2 (7). С. 212–214.

115. Trends in tissue repair and regeneration / B. Galliot, M. Crescenzi, A. Jacinto, S. Tajbakhsh. *Development*. 2017. Vol. 144 (3). P. 357–364.

116. Intradermal therapy (mesotherapy): the lower the better / B. Bifarini, F. Gori, D. Russo et al. *Clin Ter*. 2022. Vol. 173(1). P. 79–83.

117. Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review / N. M. Salwowska, K. A. Bebenek, D. A. Zadlo, D. L. Wcisio-Dziadecka. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2016. Vol. 15 (4). P. 520–526.

118. Шармазан С. І., Калюжна Л. Д. Стимулювання репаративних процесів шкіри шляхом застосування комбінації сукцинату та гіалуронової кислоти. *Medix Anti-aging*. 2011. № 1. С. 57–58.

119. Бобокало С. В., Алмакаєва Л. Г. Дигідрокверцетин для парентерального застосування. *Управління якістю в фармації*: мат. XI науково-практична конференція з міжнародною участю, 19 травня 2017 р. Харків: НФаУ, 2017. С. 29.

120. Бобокало С. В., Алмакаєва Л. Г. Розробка складу парентерального розчину високочистого дигідрокверцетину. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження*: мат. I міжнародна науково-практична конференція, Харків 5 квітня 2018 р. Харків: НФаУ, 2018. С. 22-23.

121. Застосування бурштинової кислоти та натрію сукцинату у фармації / Т. А. Пальчевська, Ю. С. Лисенко, Л. Д. Гула, А. В. Ражик. *Science, society, education: topical issues and development prospects* : abstracts of V International scientific and practical conference, 12-14 April 2020, Kharkiv: SPC "Sci-conf.com.ua", Kharkiv, 2020. P. 160–166.

122. Mitchell A. Assessment of wound in adults. *British Journal of Nursing*. 2020. Vol. 20 (29). P. 18–24.
123. Технология и стандартизация лекарств / Под ред. В. П. Георгиевского, Ф. А. Конева. Х.: ООО РИРЕГ, 1996. 784 с.
124. Технология и стандартизация лекарств / Под ред. В. П. Георгиевского, Ф. А. Конева. Х.: ИГ РИРЕГ, 2000. Т.2. 784 с.
125. Алмакаєв М. С. Визначення сумісності фільтрувальних матеріалів із розчином мелоксикаму для ін'єкцій. *Фармацевтичний журнал*. 2015. № 2. С. 75–79.
126. Належні практики у фармації : практикум для студ. вищих мед. навч. закладів / за ред. Т. Г. Калинюка. Вінниця : Нова книга, 2013. 368 с.
127. Criscitelli T. The Future of Wound Care. *AORN J*. 2018. Vol. 107 (4). P. 427-429.
128. Circular RNA: a novel potential biomarker for skin disease / X. Wu, Y. Xiao, J. Ma et al. *Pharmaceutical Research*. 2020. Vol. 158. P. 104841.
129. Cutaneous signs in COVID-19 patients: a review / U. Wollina, A. S. Karadag, C. Rowland-Payne et al. *Dermatology and Therapy*. 2020. Vol. 5 (33). e13549.
130. Klein A. W. Complications and adverse reactions with the use of botulinum toxin. *Disease-A-Month*. 2002. Vol. 48(5). P. 336–356.
131. Lowe P. L., Patnaik R., Lowe N. J. A comparison of two botulinum type a toxin preparations for the treatment of glabellar lines: double-blind, randomized, pilot study. *Dermatologic Surgery*. 2005. Vol. 31(12). P. 1651–1654.
132. Adverse reactions to dermal fillers: a review of European experiences / P. Andre et al. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2005. Vol. 7(3-4). P. 171-176.
133. Funt D., Pavicic T. Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2013. Vol. 6. P. 295–316.
134. Robati R. M., Bahmanjahromi A., Bidari-Zerehpoosh F. Periorbital granuloma annulare following mesotherapy. *Dermatol Ther*. 2020. Vol. 33(6).

e14326.

135. Денисюк О. М., Степанюк Г. І. Застосування бурштинової кислоти для посилення протигіпоксичного ефекту антигіпоксантів. *Медична хімія*. 2014. Т. 16, № 4. С. 97–103.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Обґрунтування цільового профілю якості та оцінювання ризиків для розробки комбінованого препарату для ін'єкцій. *Вісник Фармації*. 2022. Том 103. № 1. С. 1–7. (Особистий внесок: експериментальні дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
2. Семенова К. М., Алмакаєв М. С. Розробка складу та технології комбінованого ін'єкційного розчину для мезотерапії. *Фармацевтичний часопис*. 2022. №4. С.13–20. (Особистий внесок: експериментальні дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
3. Семенова К., Носальська Т. Порівняльне дослідження протизгортанної активності комбінованих розчинів дигідрокверцетину з гіалуроновою кислотою. *Анали Мечніковського інституту*. 2023. №2. С.64–66. (Особистий внесок: експериментальні дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
4. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Мезотерапія. Розробка складу сучасного препарату для мезотерапії. *C91 Moderní aspekty vědy: XXVIII. Díl mezinárodní kolektivní monografie, Ceska Respublika 2023*. С. 584-606. (Особистий внесок: експериментальні дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
5. Semenova K., Almakaieva L. Research of anti-collective activity of a vitro digydroquercetic insolution. *Danish Scientific Journal (DSJ)*. 2020. Vol. 2. No 35. P. 66–69. (Особистий внесок: експериментальні дослідження, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
6. Алмакаєва Л. Г., Семенова К. М. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій: патент на винахід 124473 Україна. № а 2019 08004; заявл.

Продовж. дод. А

- 12.07.2019; опубл. 22.09.2021, Бюл. № 38. 5 с. (Особистий внесок: проведення інформаційно-патетного пошуку, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, підготовка матеріалів для подання у патентне бюро).
7. Алмакаєва Л. Г., Семенова К. М. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій: патент на кор. модель 1349923 Україна. № u201908006; заявл. 12.07.2019; опубл. 27.01.2020, Бюл. № 2. 5 с. (Особистий внесок: проведення інформаційно-патетного пошуку, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, підготовка матеріалів для подання у патентне бюро).
 8. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Етапи розробки антиоксидантного ін'єкційного препарату з гіалуроновою кислотою. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку*: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, 19-20 вересня 2019 р., Харків: НФаУ, 2019. Т. 1. С. 149-150.
 9. Семенова К. Н., Алмакаєв М. С. Изучение алергизирующего действия оригинального комбинированного препарата. *European scientific discussions: materials of the 3rd International scientific and practical conference, February 1-3, 2021, Rome, Italy*: PoteredellaragioneEditore, 2021. P. 156.
 10. Алмакаєва Л. Г., Семенова К. Н. Разработка препаратов на основе гиалуроновой кислоты для биоревитализации. *Актуальні проблеми розвитку галузевої економіки та логістики*: матеріали VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 25-26 жовтня 2018 р., Харків: НФаУ, 2018. С. 119-121.
 11. Семенова К. Н., Алмакаєва Л. Г. Антиоксидантная композиция гиалуроновой кислоты для мезотерапии. *Науковий підхід до сфери*

Продовж. дод. А

практичної косметології: актуальні питання й тренди: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., 11 березня 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 182-183.

Додаток Б

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. VI науково-практична конференція з міжнародною участю «*Актуальні проблеми розвитку галузевої економіки та логістики*» (Харків, 25-26 жовтня 2018 р., форма участі – публікація тез);

2. Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України «*Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку*» (Харків, 19-20 вересня 2019 р., форма участі – публікація тез);

3. Міжнародна науково-практична конференція «*Науковий підхід до сфери практичної косметології: актуальні питання й тренди*» (Харків, 11 березня 2020 р., форма участі – публікація тез);

4. 3rd International scientific and practical conference «*European scientific discussions*» (Rome, Italy, February 1-3, 2021, форма участі – публікація тез);

Додаток В



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **139923** (13) **U**

(51) МПК (2020.01)

A61K 35/32 (2015.01)**A61K 36/81** (2006.01)

A61P 17/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ(21) Номер заявки: **u 2019 08006**(22) Дата подання заявки: **12.07.2019**(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.01.2020**(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.01.2020, Бюл.№ 2**

(72) Винахідник(и):

**Алмакаєва Людмила Григорівна (UA),
Семенова Ксенія Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**АЛМАКАЄВА ЛЮДМИЛА ГРИГОРІВНА,
вул. Аерофлотська, б. 11, кв. 44, м. Харків,
61031 (UA),
СЕМЕНОВА КСЕНІЯ МИКОЛАЇВНА,
вул. Красномаякська, 5, кв. 1, смт Сімеїз, м.
Ялта, АР Крим, 98680 (UA)**

(74) Представник:

**Лерантович Еліна Томашівна, реєстр.
№285****(54) АНТИОКСИДАНТНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ**

(57) Реферат:

Антиоксидантна композиція для ін'єкцій містить як активні інгредієнти гіалуронову кислоту або її фармацевтично прийнятну сіль, наприклад натрію гіалуронат, антиоксидант дигідрокверцетин (ДГК) та амінокислоту L-аргінін і допоміжні речовини, як стабілізатори розчину - динатрію едетат та натрію метабісульфіт, як комплексоутворювач - Повідон 8000 та воду, вона міститься в шприцах або ампулах.

UA 139923 U

Додаток Г



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124473** (13) **C2**

(51) МПК (2021.01)

A61K 9/08 (2006.01)**A61K 31/00****A61K 31/718** (2006.01)

A61P 17/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2019 08004</p> <p>(22) Дата подання заявки: 12.07.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 23.09.2021</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 10.01.2020, Бюл.№ 1</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 22.09.2021, Бюл.№ 38</p>	<p>(72) Винахідник(и): Алмакаєва Людмила Григорівна (UA), Семенова Ксенія Миколаївна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): Алмакаєва Людмила Григорівна, вул. Аерофлотська, б. 11, кв. 44, м. Харків, 61031 (UA), Семенова Ксенія Миколаївна, вул. Красномаякська, 5, кв. 1, смт Сімеїз, м. Ялта, АР Крим, 98680 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA140648, U, подана 11.07.2019 UA117389, C2, 25.07.2018 UA114759, U, 10.03.2017 RU2458677, C1, 20.08.2012 RU2456977, C1, 27.07.2012 Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : материалы VII Всерос. конф. с междунар. участием, Барнаул, 24 – 28 апреля 2017 г. / АлтГУ [и др.] ; под ред. Н. Г. Базарновой, В. И. Маркина. - Барнаул : Изд-во АлтГУ, 2017. - 423 с., - стр. 120-121 Горошко О.А., Кукес В.Г., Прокофьев А.Б., Архипов В.В. Демченкова Е.Ю. КЛИНИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЖУРНАЛ ПРИКЛАДНЫХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ, №4, 2016, стр. 905-912 DE102009045981, A1, 05.08.2010 DE102009039393, A1, 10.06.2010</p>
---	---

UA 124473 C2

(54) АНТИОКСИДАНТНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Додаток Д

"ІНФУЗІЯ"
ПРИВАТНЕ ПІДПРИЄМСТВО

0800 402 022
050 990 27 70
office@chemoteka.com.ua
chemoteka.com

вул. Кобзарська, 108
Черкаси, 18030, Україна
ЄДРПОУ 31423376
ПІН 314233723017

Національний фармацевтичний університет
Науковому керівнику, кандидату
фармацевтичних наук, доценту
Максиму АЛМАКАЄВУ

16.12.2022

№ 03/245/1-2022

Щодо результатів виготовлення зразка
лікарського засобу за наданим прописом

Пане Максиме!

Доводимо до Вашого відома, що в період з 14.12.2022 по 16.12.2022 на базі аптеки № 2 «ХЕМОТЕКА» (в асептичних умовах) аспіранткою Ксенією Семеновою було апробовано технологію виготовлення комбінованого ін'єкційного розчину для застосування в мезотерапії на основі гіалуронової кислоти, дигідрокверцетину та L-аргініну в попередньо наповнених шприцах по 2 мл (робоча назва «ХІАЛАРІКС»).

Напрацьовані зразки лікарського засобу «ХІАЛАРІКС» відповідають вимогам проекту Специфікації МКЯ.

Препарат включено до перспективного плану виготовлення в умовах аптек ПП «Інфузія» на 2023-2024 роки.

Директор



Володимир ШЕВЧУК

Ольга Животенко (050) 440 90 62

Додаток Е

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Виконавчий директор

УК Виробництва Черкаси

ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ»

Володимир Шевчук

21 грудня 2022р.



АКТ

апробації виробництва комбінованого ін'єкційного лікарського засобу на основі гіалуронової кислоти, дигідрокверцетину, L-аргініну в ампулах по 2 м

В промислових умовах цеху ін'єкційних препаратів ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ» м. Черкаси в період з 20 по 21 грудня 2022 року апробована технологія виробництва комбінованого ін'єкційного розчину на основі гіалуронової кислоти, дигідрокверцетину та L-аргініну в ампулах по 2 мл під умовною назвою «ХІАЛАРІКС-2». Напрацьовані зразки лікарського засобу «ХІАЛАРІКС-2», комбінований ін'єкційний розчин для застосування в мезотерапії за якістю відповідали показникам специфікації проекту методів контролю якості (МКЯ). Препарат включено до перспективного плану виробництва на 2023-2024 роки.

Від ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ»:

Головний технолог

Олександр Баранник

Директор з якості

Ганна Аргатюк

Від НФаУ:

Аспірант

Ксенія Семенова

Науковий керівник

Максим Алмакаєв

Продовж. дод. Е

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової
роботи та інноваційНаціонального медичного
університету

імені О.О.Богомольця

д.мед.н., професор С.В.Земсков



«20» _____ 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу та стандартизація технології комбінованого ін'єкційного розчину з гіалуроновою кислотою.
- 2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра косметології і ароматології, аспірант Семенова К.М.
- 3. Джерела інформації:**
1. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій: патент на винахід. № 124473 України / Алмакаєва Л.Г., Семенова К.М. № а 2019 08004; заявл. 12.07.2019; опубл. 22.09.2021. - Бюл. № 38.
 2. Семенова, К. М. Етапи розробки антиоксидантного ін'єкційного препарату з гіалуроновою кислотою / К. М. Семенова, Л. Г. Алмакаєва // Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. : у 2 т. – Харків : НФаУ, 2019. – Т. 1. – С. 149-150.
- 4. Впроваджено:** У навчальний та науковий процес кафедри аптечної та промислової технології ліків за темою «Виробництво ін'єкційних лікарських засобів».
- 5. Термін впровадження:** 2022-2023 н.р.
Затверджено на засіданні кафедри, протокол №1 від «12» січня 2023 р.
- 6. Ефективність впровадження:** Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.
- 7. Зауваження:** немає.

Відповідальний за впровадження:
завідувачка кафедри
аптечної та промислової технології ліків,
д.фарм.н., професорка

Жанна Полова

Продовження додатку Е

ЗАТВЕРДЖУЮ
 Перший проректор
 з науково-педагогічної роботи
 Львівського національного
 медичного університету
 імені Данила Галицького
 доц. І. І. Солонинко

[Signature]
 «22» 02 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу та стандартизація технології комбінованого ін'єкційного препарату з гіалуроновою кислотою.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра косметології і ароматології, аспірант Семенова К. М.
3. **Джерела інформації:**
 1. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій. Патент, № 1349923 України / Алмакаєва Л. Г., Семенова К. М. № u 2019 08006; заявл. 12.07.2019; опубл. 27.01.2020. Бюл. № 2.
 2. Семенова К. М., Алмакаєва Л. Г. Мезотерапія. Розробка складу сучасного препарату для мезотерапії. MODERN ASPECTS OF SCIENCE. 28-th volume of the international collective monograph. Česká republika Zveřejněno rozhodnutím akademické rady Mezinárodní Ekonomický Institut s.r.o. (Zápis č. 26/2023 ze dne 8. Únor2023). 2023. С 584-606.
4. **Впроваджено:** У навчальний та науковий процес кафедри технології ліків і біофармації при вивченні теми з промислової технології лікарських засобів «Лікарські засоби для парентерального застосування».
5. **Термін впровадження:** 2022-2023 н.р.
6. **Ефективність впровадження:** Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.

Відповідальні за впровадження:

Доцент кафедри технології ліків і біофармації
 ЛНМУ імені Данила Галицького

[Signature] К. Ф. Ващенко

Завідувач кафедри технології ліків і біофармації
 ЛНМУ імені Данила Галицького, професор

[Signature] С. Б. Білоус

Продовж. дод. Е

ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Професор, наукової роботи
 ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
 доктор мед. наук, професор Іван МИРОНІЮК

2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу та стандартизація технології комбінованого ін'єкційного препарату з гіалуроновою кислотою.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра косметології і ароматології, аспірант Семенова К.М.
3. **Джерела інформації:**
 1. Антиоксидантна композиція для ін'єкцій: патент на винахід. № 124473 України / Алмакаєва Л.Г., Семенова К.М. № а 2019 08004; заявл. 12.07.2019; опубл. 22.09.2021. - Бюл. № 38.
 2. Семенова, К. М. Етапи розробки антиоксидантного ін'єкційного препарату з гіалуроновою кислотою / К. М. Семенова, Л. Г. Алмакаєва // Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. 2 т. – Харків : НФаУ, 2019. – Т. 1. – С. 149-150.
 3. Semenova K., Almackaieva L. Research of anti-collective activity of a vitro dihydroquercetin solution. Danish Scientific Journal (DSJ). 2020. VOL 2. No 35. С.66-69
4. **Впроваджено:** У навчальний та науковий процес кафедри фармацевтичних дисциплін при вивченні теми з промислової технології лікарських засобів «Виробництво ін'єкційних лікарських засобів».
5. **Термін впровадження:** 2022-2023 н.р.
6. **Ефективність впровадження:** Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.

Завідувач кафедри фармацевтичних дисциплін
 ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
 к.фарм.н., доцент



Олег ДЕВИНЯК

Продовж. дод. Е



ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної
роботи та навчальної роботи
Запорізького державного медичного
університету
доцент С.А. Моргунцова
» 14 листопада 2023 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Розробка складу та стандартизація технології комбінованого інекційного лікарського засобу з гіалуроновою кислотою.

2. Установа, автор: Національний фармацевтичний університет, кафедра косметології та аромології, аспірант Семенова К.М.

3. Джерела інформації:

1.К.М. Семенова. Обґрунтування цільового профілю якості та оцінювання ризиків для розробки комбінованого препарату для ін'єкцій / Вісник Фармації № 1 (103) 2022. С. 1-7.

2. Алмакаева, Л. Г. Разработка препаратов на основе гиалуроновой кислоты для биоревитализации / Л. Г. Алмакаева, К. Н. Семенова // Актуальні проблеми розвитку галузевої економіки та логістики : матеріали VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 25-26 жовт. 2018 р. - Х., 2018. - С. 119-121.

4. Впроваджено: У навчальний та науковий процес кафедри технології ліків за темою «Виробництво рідких лікарських засобів».

5. Термін впровадження: 2022-2023 н.р.

6. Ефективність впровадження відповідно до критеріїв, що викладені в джерелах інформації:

Показники	За даними	
	розробників	установи, що затверджує
Результати наукових досліджень впроваджені до навчального процесу та використовуються викладачами кафедри під час підготовки лекцій та слухачами/інтернами.		

7. Зауваження, пропозиції: розповсюдити отримані позитивні результати впровадження для застосування у навчальному процесі закладів вищої освіти України.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри технології ліків

Запорізького державного медичного університету

доктор фармацевтичних наук, професор

«14» листопада 2023 року

В. В. ГЛАДИШЕВ